鲐鱼暗色肉肽锌螯合物的制备及结构表征

王 晴[1]，邵 珺[2]，李勇勇[1]，石 娟[1]，周丽萍[1]，李超群[1]，娄永江[*1]
（1.宁波大学 食品与药学学院，浙江 宁波 315211；2. 宁波南衡进出口有限公司，浙江 宁波 315000）

摘要：为生产易被人体消化吸收的锌补充剂，提高鲐鱼暗色肉的附加值，本研究将鲐鱼暗色肉寡肽与锌进行螯合。以鲐鱼暗色肉蛋白肽（相对分子质量小于 3 000）为原料，采用超声法制备鲐鱼暗色肉肽螯合锌。以螯合得率和螯合率为指标，采用单因素与响应面结合的方法，对螯合工艺进行优化，并对螯合物进行氨基酸、能谱分析。结果表明，最佳螯合工艺条件为：螯合时间 51 min、螯合温度 72 ℃、肽锌质量比 1:2、肽质量分数 5.35%、螯合 pH 值 7.9 时，在该工艺条件下测得肽锌螯合得率与螯合率分别为 55.86%、65.12%，与模型预测值相符。本研究为锌螯合物的制备以及鲐鱼暗色肉的高值化利用提供了理论依据。

关键词：鲐鱼暗色肉；螯合锌；响应面法；优化
中图分类号：S 986.1　**文章编号：**1673-1689(2021)05-0078-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.05.010

Preparation and Structure Characterization of Dark-Colored Peptide Zinc Chelate of Mackerel

WANG Qing[1]，*SHAO Jun*[2]，*LI Yongyong*[1]，*SHI Juan*[1]，*ZHOU Liping*[1]，*LI Chaoqun*[1]，*LOU Yongjiang*[*1]
(1.College of Food and Pharmacy, Ningbo University,Ningbo 315211,China; 2. Ningbo Nanheng Import and Export Co., Ltd.,Ningbo 315000,China)

Abstract: In order to produce zinc supplements easily digested and absorbed by the human body and to increase the added value of dark meat of mackerel, the oligopeptide of dark meat mackerel was chelated with zinc. The mackerel dark-colored meat peptide chelated zinc was prepared by the ultrasonic method using the peptide (<3 000) of dark meat mackerel as raw material. The chelation process was optimized by single factor combined with response surface methodology based on the chelation yield and chelation rate, and the amino acid compositions and energy spectrum of the chelate were further analyzed. The results showed that the optimal chelating process conditions were set as chelating time of 51 min, chelating temperature of 72 ℃, peptide zinc mass ratio of 1:2, peptide concentration of 5.35%, and chelating pH value of 7.9. Under this condition, the zinc chelation yield and chelation rate were 55.86% and 65.12%, respectively, consistent with the predicted values. This study could provide a theoretical basis for the preparation of zinc chelates and the high-value utilization of mackerel dark meat.

Keywords: mackerel dark meat, chelated zinc, response surface method, optimization

收稿日期：2020-07-16
基金项目：国家“十三五”海洋经济创新发展示范项目（NBHY-2017-S1）。
*通信作者：娄永江（1965—），男，硕士，教授，硕士研究生导师，主要从事水产品加工与保鲜研究。E-mail：louyongjiang@nbu.edu.cn

鲐鱼,俗称鲐巴鱼、青花鱼,为中上层鱼类。目前鲐鱼主要被加工成罐头食品[1],加工过程有 10%左右暗色肉被剔除。鲐鱼暗色肉营养丰富[2-4],是优质蛋白质资源[5],但目前鲐鱼暗色肉资源仅作为饲料鱼粉的加工原料,几乎无高值化利用。以鲐鱼暗色肉为原料制备了相对分子质量小于 3 000 的鲐鱼暗色肉蛋白肽,为研究提了充足的原料。

锌是人体必需的微量金属元素,在人体生长发育、生殖遗传、维持上皮细胞正常形态[6]、蛋白质合成及代谢等方面有至关重要的作用。锌缺乏会导致生殖功能障碍、性成熟延迟[7]、异食癖,并会影响神经、精神、味觉、血糖等方面,且与缺铁性贫血、原发性高血压、动脉粥样硬化、消化性溃疡、神经性耳聋等都有着密切关系[8]。从饮食中摄入的锌元素容易与植酸形成不溶性络合物,从而导致锌的生物利用度降低[9]。我国不同年龄组居民锌缺乏情况较为普遍,尤其是儿童、孕妇。因此必须采用有针对性的方法来改善锌缺乏。而小分子寡肽与微量元素螯合可提高机体对微量元素的吸收利用率且无副作用[10]。赵洪雷等[11]以小鼠为实验材料,研究出鲢鱼蛋白螯合锌有生物活性且能促进机体吸收;顾冰飞等[12]以杏鲍菇为原料,通过水提法提取杏鲍菇多糖,研究了杏鲍菇多糖锌螯合物的制备工艺并发现其抗氧化性。

螯合反应有反应温度高、周期长等缺点,而用超声螯合能有效提高化学反应速率,缩短反应时间,同时超声技术已在食品工业领域被广泛研究[13]。相对分子质量小于 3 000 的蛋白肽具有小分子寡肽的特性:胶原蛋白活性较强,好吸收且酶解产物中有最丰富的相对分子质量小于 3 000 的组分,生产成本较低。因此本研究以相对分子质量小于 3 000 的鲐鱼暗色肉蛋白肽为原料,通过超声法制备肽锌螯合物,以期获得同时具有锌和寡肽双重功能的新产品,促进水产品深加工业的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

蛋白质质量分数为 99%的鲐鱼暗色肉小分子寡肽粉末(相对分子质量小于 3 000)、硫酸锌、EDTA、HCl、NaOH、铬黑 T、NH_3-NH_4Cl 缓冲溶液:均购于阿拉丁试剂公司(上海)。

1.2 试验仪器

Biosafer SB-4200DTS 超声槽:购自南京赛飞生物科技有限公司;3H16RH 智能高速冷冻离心机:购自湖南赫西仪器装备有限公司;Spectramax i3x 酶标仪:购自美谷分子仪器(上海)有限公司;X 射线能谱仪(EDS):购自日本电子株式会社;日立 L-8900 全自动氨基酸分析仪:购自沈阳奇特尔科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小分子寡肽与硫酸锌的超声螯合反应

1)螯合工艺鲐鱼暗色肉小分子寡肽(相对分子质量小于 3 000)→温水溶解→加硫酸锌溶液→调 pH→调超声温度→超声螯合反应→浓缩→乙醇析出→离心→干燥→肽锌螯合物

2)螯合得率测定取冻干后的肽粉,加去离子水充分溶解,分别用少量蒸馏水溶解,配制质量浓度为 5 mg/mL 的肽溶液,按一定体积比加入质量浓度为 5 mg/mL 的硫酸锌溶液,调 pH 后,开始在一定温度下进行一定时间的螯合,待反应完毕,进行冷却,加入 8 倍体积的无水乙醇,在 4 500 r/min 的转速下离心 10 min,除去上清液,并用无水乙醇洗涤离心 1~2 次。将沉淀物置于 45 ℃电热鼓风干燥箱中烘干,得肽锌螯合物,测定其螯合物得率。

$$螯合得率(\%)=\frac{W_1}{W_2}\times 100\% \quad (1)$$

式(1)中:W_1 为初始反应物的总质量,g;W_2 为反应后肽锌螯合物的总质量,g。

3)螯合率测定采用 EDTA 滴定法[14]。称量每份肽锌复合物,加入 10 mL NH_3-NH_4Cl 缓冲溶液溶解,再滴 2 滴铬黑 T 指示剂,用浓度为 0.01 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠滴定,当溶液由紫色变为淡蓝色时停止滴定,记录消耗乙二胺四乙酸二钠的体积,按式(2)、(3)计算锌的螯合率。

$$X(\%)=\frac{M\times C\times V\times 5}{m}\times 100\% \quad (2)$$

式(2)中:X 为肽锌复合物质量分数,%;M 为锌的摩尔质量,g/mol;C 为乙二胺四乙酸二钠的摩尔浓度,mol/L;V 为滴定乙二胺四乙酸二钠的体积,L;m 为称取肽锌复合物的质量,g。

$$Y(\%)=\frac{m\times X}{n}\times 100\% \quad (3)$$

式(3)中:Y 为锌的螯合率,%;X 为肽锌复合物的质量分数,%;m 为肽锌复合物的质量,g;n 为锌的投入量,g。

$$锌螯合率(\%)=\frac{W_3}{W_4}\times 100\% \quad (4)$$

式(4)中:W_3为螯合物中锌的质量,mg;W_4为初始反应体系的锌及寡肽的质量,mg。

4)超声螯合反应的单因素试验主要将鲐鱼暗色肉小分子寡肽与硫酸锌在一定的螯合肽质量分数、时间、温度、pH、肽与硫酸锌质量比水平下,以螯合率、螯合得率为指标,在超声功率为 250 W,频率为 40 000 Hz 的超声槽内进行螯合[15]。

5)超声螯合反应的响应面优化试验在单因素试验的基础上,选取时间、温度、pH、肽质量分数为试验因素,以螯合物得率、螯合率为评价指标,采用 Box-Behnken 方法设计四因素三水平响应面试验,试验设计因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 1 Design factors and levels of Box-Behnken experiment

因素	编码水平		
	-1	0	1
A(时间)/min	30	50	70
B(温度)/℃	60	70	80
C(pH)	7	8	9
D(肽质量分数)/%	4	5	6

1.3.2 能谱分析 用双面胶将肽与肽锌螯合物粉末分别粘贴于铝制样品台上,然后获取检测微区,用 EDX 仪测定微区主要元素的质量分数和原子数百分含量,重复 3 次。EDX 仪技术指标:电压 10 000 V,电子束 6.0 eV,工作距离 10.0 mm[16]。

1.3.3 氨基酸成分分析 取适量鲐鱼暗色肉酶解液冷冻干燥产品及鲐鱼暗色肉肽锌螯合物,加入摩尔浓度为 6 mol/L 的 HCl,充氮气后,热融密封,110 ℃烘箱中水解 24 h,脱酸后用水定容至适宜浓度,上样,用 L-8900 全自动氨基酸分析仪测定[17]。

1.4 数据处理

实验平行 3 次,使用 Origin8.0 及 SPSS 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 鲐鱼暗色肉锌螯合物制备的单因素试验

2.1.1 螯合 pH 值对寡肽锌螯合得率及螯合率的影响

由图 1 可知,螯合反应开始,随着 pH 的不断增加,肽锌螯合能力逐渐增强,在 pH 值为 8 时,其螯合能力达最大值,其螯合得率和螯合率达到最高值分别为 53.32%、63.35%,随后缓慢下降。这是因为:氢离子与金属离子为竞争关系,体系中的氢离子解离较多,寡肽解离的氢离子较少,能与金属阳离子结合的位点就少,螯合率低。随 pH 加大,酸性减弱,体系中寡肽解离产生的氢离子增加,螯合率上升,当 pH 继续加大,碱性提高,氢氧根离子增多,就产生了氢氧化锌沉淀,螯合率下降[18-21]。

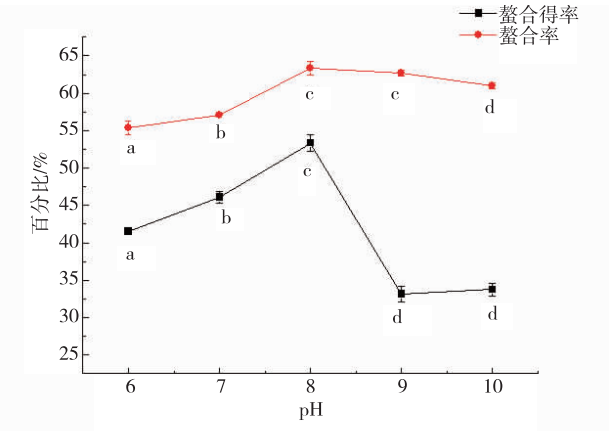


图 1 pH 对螯合能力的影响

Fig. 1 Effect of pH on the chelating ability

2.1.2 螯合时间对寡肽锌螯合得率及螯合率的影响

从图 2 可知,随着螯合时间增长,肽锌螯合能力有所提高($P<0.05$),当反应时间达到 50 min 左右时,肽锌螯合能力达最大值,随着反应时间继续延长,其螯合得率基本稳定($P>0.05$)。主要是因为:随着时间延长,螯合反应基本达到平衡,螯合得率基本保持稳定,但是随着时间延长,体系的稳定性被破坏,其副反应的发生率提高,导致部分配合物开始解离,螯合率下降[22]。

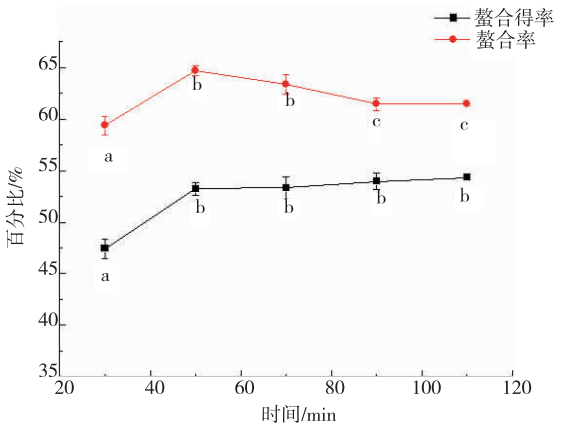


图 2 螯合时间对螯合能力的影响

Fig. 2 Effect of chelating time on chelating ability

2.1.3 螯合肽质量分数对寡肽锌螯合得率及螯合率的影响 由图 3 可知,肽质量分数为 5%时,螯合得率及螯合率达最大值,之后趋于稳定(P>0.05)。主要是因为:肽与锌浓度低,由热运动引起的螯合碰撞少,随着肽质量分数增加,蛋白肽分子与锌离子分布密集,碰撞概率提升,从而减弱螯合效果。

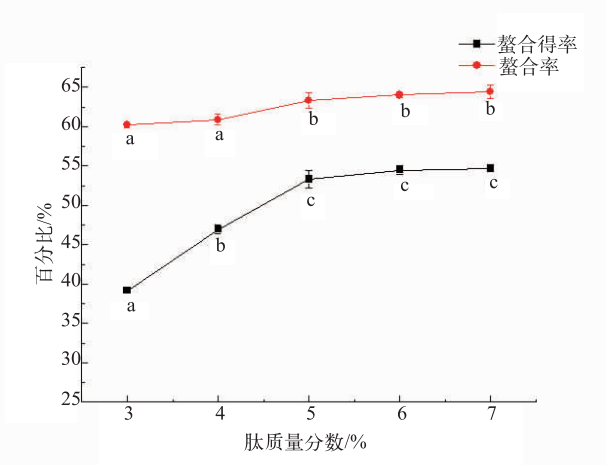


图 3 肽质量分数对螯合能力的影响

Fig. 3 Effect of peptide concentration on chelating ability

2.1.4 螯合温度对寡肽锌螯合得率及螯合率的影响 由图 4 可知,螯合能力随着反应温度的上升出现先升高后下降的趋势,在反应温度达到 70 ℃时,其螯合能力达到最大,随后开始下降(P<0.05)。这是因为:溶液中的锌离子会随着温度升高而加速溶出,这增大了锌离子与肽的碰撞频率[23],有利于螯合反应的进行,但高温易破坏肽类结构[24-25],使反应活性位点不易暴露,寡肽锌的结合位点减少,不利于螯合能力提升。

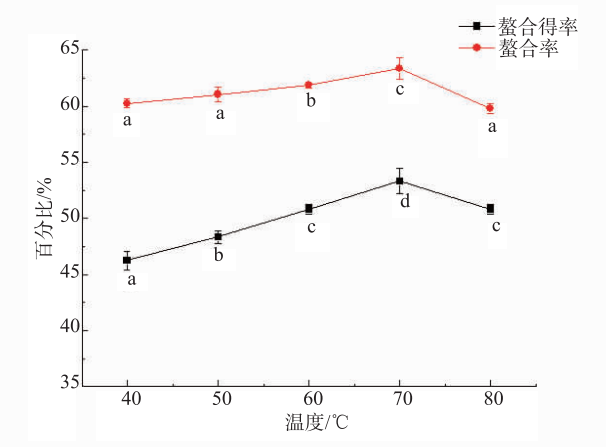


图 4 温度对螯合能力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the chelating ability

2.1.5 硫酸锌与肽质量比对寡肽锌螯合得率及螯合率的影响 由图 5 可知,硫酸锌与肽的质量比为 2:1 时,螯合效果最佳。原因是:当硫酸锌与肽的质量比过小时,寡肽团聚暴露点减少,肽的有效利用率下降,过量的寡肽不利于螯合反应的发生,还会造成资源浪费;当硫酸锌与肽的质量比过大时,锌离子浓度占优势,有较强的争夺供电基团能力,而溶液中的寡肽无法生成稳定的环状结构且肽浓度低,大量的锌离子未参与螯合反应[26],螯合效果下降,故曲线呈现先逐渐上升后下降的趋势。

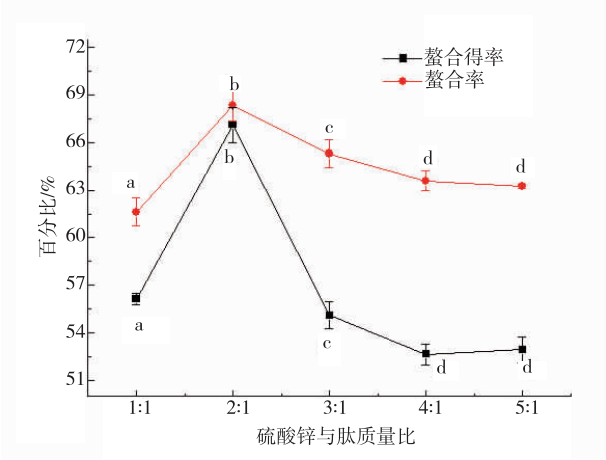


图 5 硫酸锌与肽质量比对螯合能力的影响

Fig. 5 Effect of the mass ratio of zinc sulfate to peptide on the chelating ability

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应试验模型的建立与试验结果分析 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合,得到的螯合得率(%)、螯合率(%)对时间 A(min)、温度 B(℃)、pH C、肽质量分数 D(%)的四元二次回归方程分别为:$Y_{螯合得率}$=56.20−1.75A−1.50B +2.75C +1.67D −0.25AB +3.75AC −2.75AD +1.00BC +3.25BD +2.00CD −4.47A^2 −3.60B^2 −4.73C^2 −4.10D^2;$Y_{螯合率}$=65.40−0.50A −0.42B +2.17C +2.25D +1.25AB +1.5AC −3.25AD +1.50BC +4.00BD −2.00CD −5.62A^2−3.49B^2−4.37C^2−3.47D^2。

由表 3 和表 4 可知,对该回归方程进行方差分析,模型项达到极显著(P<0.01),失拟项不显著(P>0.05),说明该模型构建成功。螯合得率模型的决定系数 R^2=0.836 5,螯合率模型的决定系数为 R^2=0.824 1,这证明响应面回归模型与实际试验拟合度较高,模型的精密度较高,可用此回归方程对螯合得率和螯合率进行理论预测。表 3 中 4 个试验因素

表 2 Box-Behnken 试验设计及响应值

Table 2 Box-Behnken test design and response value

试验号	A(时间)	B(温度)	C(pH)	D(肽质量分数)	螯合得率/%	螯合率/%
1	−1	−1	0	0	52	59
2	1	−1	0	0	46	52
3	0	0	0	0	58	67
4	0	0	0	0	53	65
5	0	0	−1	−1	43	50
6	0	0	1	−1	47	56
7	1	0	−1	0	41	53
8	0	0	1	1	58	60
9	0	1	−1	0	42	52
10	0	0	0	0	55	63
11	0	−1	0	1	48	55
12	0	1	0	1	50	65
13	0	−1	0	−1	53	60
14	0	0	0	0	57	66
15	1	0	0	1	42	53
16	0	−1	1	0	50	61
17	1	0	1	0	54	63
18	1	1	0	0	46	55
19	0	1	0	−1	42	54
20	−1	0	1	0	45	55
21	−1	0	0	−1	46	54
22	−1	0	0	1	53	63
23	0	0	−1	1	46	62
24	0	0	0	0	58	66
25	−1	0	−1	0	47	51
26	0	−1	−1	0	49	60
27	1	0	0	−1	46	57
28	−1	1	0	0	53	57
29	0	1	1	0	47	59

表 3 螯合得率回归模型方差分析

Table 3 ANOVA of chelation yield regression model

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
Model	638.04	14	45.57	5.12	0.002 1	**
A	36.75	1	36.75	4.13	0.061 7	
B	27.00	1	27.00	3.03	0.103 6	
C	90.75	1	90.75	10.19	0.006 5	**
D	33.33	1	33.33	3.74	0.073 5	
AB	0.25	1	0.25	0.03	0.869 4	
AC	56.25	1	56.25	6.31	0.024 8	*
AD	30.25	1	30.25	3.40	0.086 6	
BC	4.00	1	4.00	0.45	0.513 7	
BD	42.25	1	42.25	4.74	0.047 0	*
CD	16.00	1	16.00	1.80	0.201 5	
A^2	129.90	1	129.90	14.58	0.001 9	**
B^2	84.06	1	84.06	9.44	0.008 3	**
C^2	144.81	1	144.81	16.26	0.001 2	**
D^2	109.04	1	109.04	12.24	0.003 5	**
残差	124.72	14	8.91			
失拟项	105.92	10	10.59	2.25	0.225 3	
纯误差	18.80	4	4.70			
总和	762.76	28				

注:* 表示在 0.05 水平上显著;** 表示在 0.01 水平上极显著。

表 4 螯合率回归模型方差分析

Table 4 ANOVA of chelation rate regression model

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
Model	590.71	14	42.19	4.68	0.003 3	**
A	3.00	1	3.00	0.33	0.573 0	
B	2.08	1	2.08	0.23	0.638 0	
C	56.33	1	56.33	6.25	0.025 4	*
D	60.75	1	60.75	6.74	0.021 1	*
AB	6.25	1	6.25	0.69	0.418 9	
AC	9.00	1	9.00	1.00	0.334 5	
AD	42.25	1	42.25	4.69	0.048 1	*
BC	9.00	1	9.00	1.00	0.334 5	
BD	64.00	1	64.00	7.10	0.018 5	*
CD	16.00	1	16.00	1.78	0.203 9	
A^2	204.63	1	204.63	22.72	0.000 3	**
B^2	79.08	1	79.08	8.78	0.010 3	*
C^2	123.68	1	123.68	13.73	0.002 4	**
D^2	79.08	1	79.08	8.78	0.010 3	*
残差	126.12	14	9.01			
失拟项	116.92	10	11.69	5.08	0.065 5	
纯误差	9.20	4	2.30			
总和	716.83	28				

注:* 表示在 0.05 水平上显著;** 表示在 0.01 水平上极显著。

对螯合得率的影响从小到大依次为:温度(B)、肽质量分数(D)、时间(A)、pH(C)。一次项 C 和二次项 A^2、B^2、C^2、D^2 对螯合得率的影响极显著(P<0.01);交互项 AC、BD 对螯合得率的影响显著(P<0.05),其余项对指标影响不显著。表 4 中 4 个试验因素对螯合率的影响从小到大依次为:温度(B)、时间(A)、pH(C)、肽质量分数(D)。二次项 A^2、C^2 对螯合率的影响极显著(P<0.01);一次项 C、D、交互项 AD、BD 及二次项 B^2、D^2 对螯合率的影响显著(P<0.05),其余项对指标影响不显著。

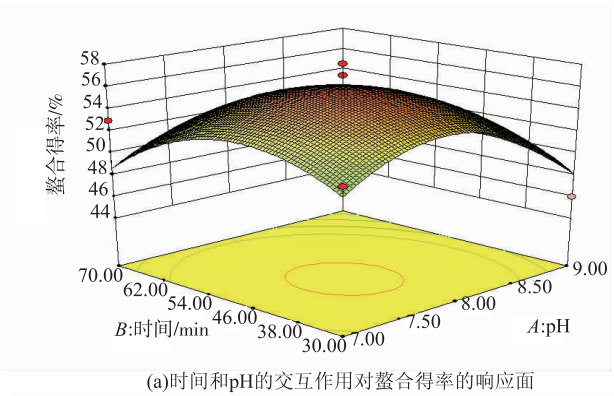
2.2.2 响应面分析 响应面交互作用分析通过响应面图和等高线图可以直观反映研究因素及其交互作用对螯合得率及螯合率的影响,响应面图 6、7、8、9、10、11 中曲线越弯曲说明对研究因素影响越大,等高线呈椭圆形说明试验因素之间的交互作用显著,等高线呈圆形说明试验因素之间的交互作用不显著。从等高线形状看,pH 值和温度沿着弯曲表面上升的斜率陡峭,并且轴向轮廓致密,故反应 pH 值和反应温度存在显著的交互作用,且明显可以看出反应 pH 值对肽锌螯合能力的影响相比温度较大。可能是因为随着温度升高,分子运动活跃,碰撞机会多,且相互之间团聚的可能性变大,螯合物就会絮凝下来。pH 值较低时,溶液中的 H^+较多,易于与寡肽中的羧基或氨基结合;值较高时,容易形成氢氧化锌溶液中的 Zn^{2+}减少,也不利于胶原寡肽螯合锌的生成。

根据 Design Expert 试验设计软件分析得到佳螯合条件为肽锌质量比为 1:2、反应温度 72.37 ℃、反应 pH 7.85、肽质量分数 5.35%、反应时间 51.33 min,此时得到的响应预测螯合得率与螯合率分别 56.98%、66.00%。

2.2.3 验证试验 结合实验的可行性,验证试验采取的工艺条件适当调整为:螯合时间 51min、螯合温度 72 ℃、肽锌质量比 1:2、肽质量分数 5.35%、螯合 pH 值 7.9,在该工艺条件下测得肽锌螯合得率与螯合率分别为 55.86%、65.12%,与预测值相比,误差较小,说明该模型可行。

2.3 氨基酸成分分析

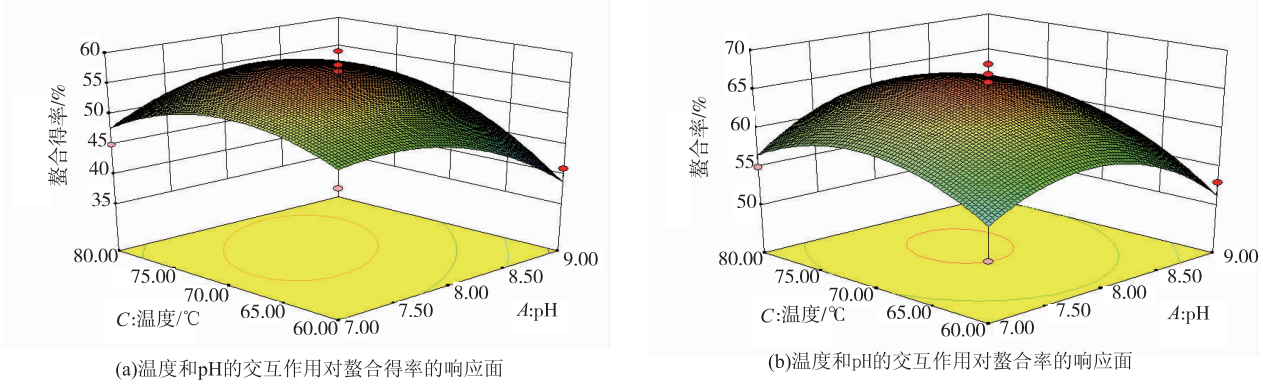
由表 5 可知,鲐鱼暗色肉蛋白寡肽与鲐鱼暗色肉肽锌螯合物共检出 17 种氨基酸,与鲜味氨基酸有关的氨基酸如谷氨酸、天门冬氨酸,这两者的质量分数均较高。其中呈中性、碱性的氨基酸两者均占了较大的比例。但各种氨基酸的质量分数有所变化。此外,构成胶原蛋白的脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸和精氨酸的质量分数之和在鲐鱼暗色肉蛋白寡肽与其肽锌螯合物中分别为 43.78%和 35.35%。研究



(a)时间和pH的交互作用对螯合得率的响应面　(b)时间和pH的交互作用对螯合率的响应面

图 6　时间和 pH 的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

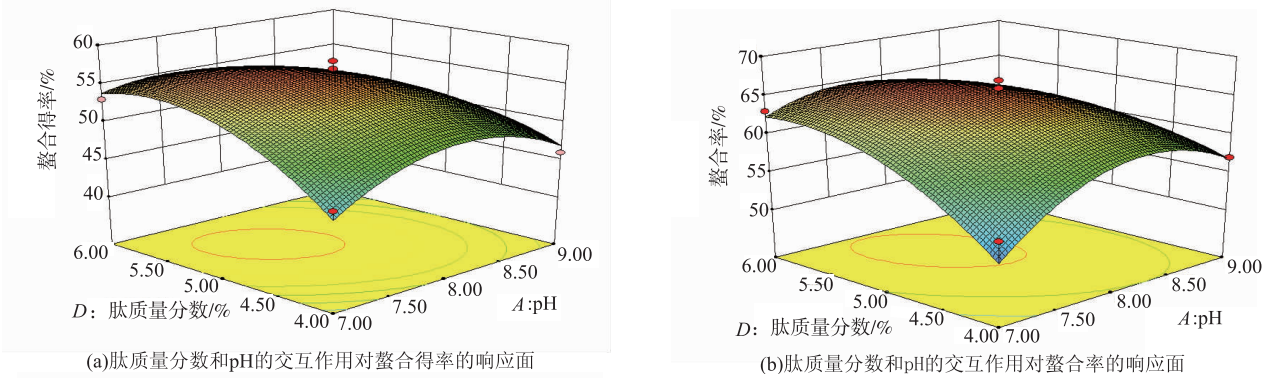
Fig. 6　Response surface diagram of the interaction between time and pH on chelation rate and chelation yield



(a)温度和pH的交互作用对螯合得率的响应面　(b)温度和pH的交互作用对螯合率的响应面

图 7　温度和 pH 的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

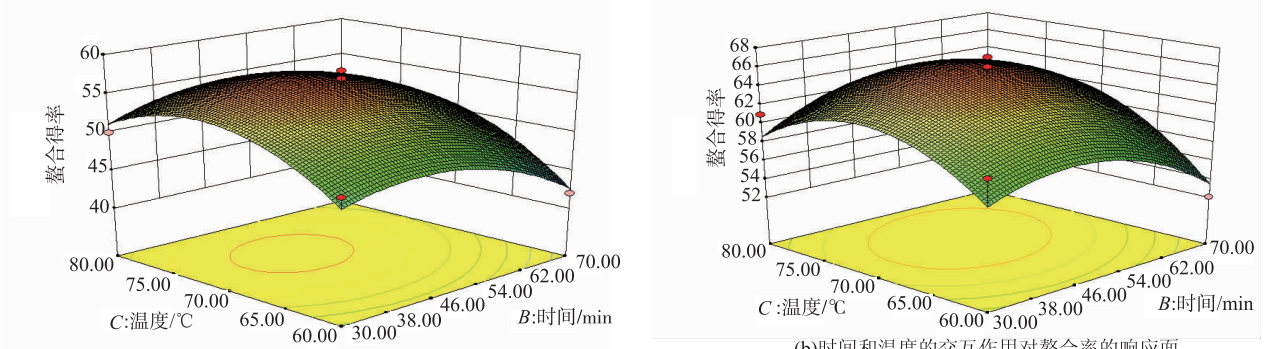
Fig. 7　Response surface diagram of the interaction between temperature and pH on chelation rate and chelation yield



(a)肽质量分数和pH的交互作用对螯合得率的响应面　(b)肽质量分数和pH的交互作用对螯合率的响应面

图 8　肽质量分数和 pH 的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

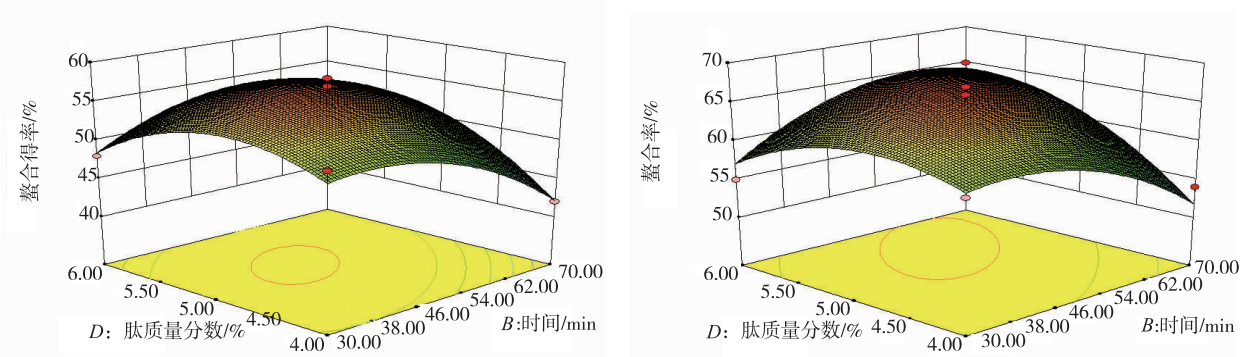
Fig. 8　Response surface diagram of the interaction between peptide concentration and pH on chelation rate and chelation yield



(a)时间和温度的交互作用对螯合得率的响应面　(b)时间和温度的交互作用对螯合率的响应面

图 9　时间和温度的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

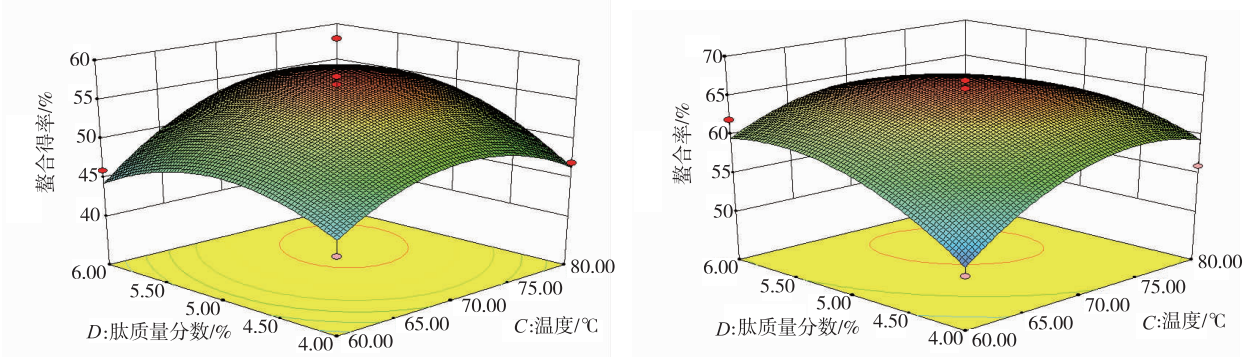
Fig. 9　Response surface diagram of the interaction between time and temperature on chelation rate and chelation yield



(a)时间和肽质量分数的交互作用对螯合得率的响应面　(b)时间和肽质量分数的交互作用对螯合率的响应面

图 10　时间和肽质量分数的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

Fig. 10　Response surface diagram of the interaction between time and peptide concentration on chelation rate and chelation yield



(a)温度和肽质量分数的交互作用对螯合得率的响应面　(b)温度和肽质量分数的交互作用对螯合率的响应面

图 11　温度和肽质量分数的交互作用对螯合率和螯合得率的响应面

Fig. 11　Response surface diagram of the interaction between temperature and peptide concentration on chelation rate and chelation yield

表明,肽的氨基酸组成、羧基和酸性氨基酸的侧链氨基与肽的金属离子螯合能力有关且赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、脯氨酸(Pro)等有较高的金属螯合活性[15],尤其是金属离子Cu^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}等易与肽或蛋白质表面的组氨酸咪唑基结合,且组氨酸残基越多,肽的锌螯合率越大[27]。

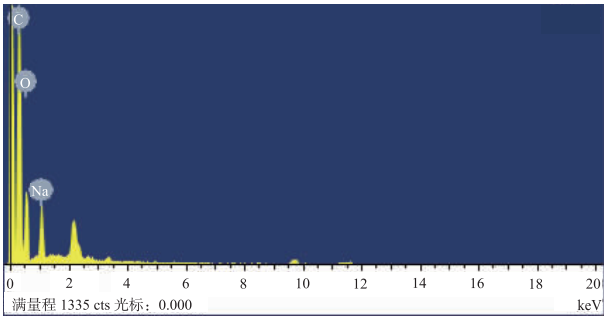
表 5 氨基酸成分分析

Table 5 Amino acid composition analysis

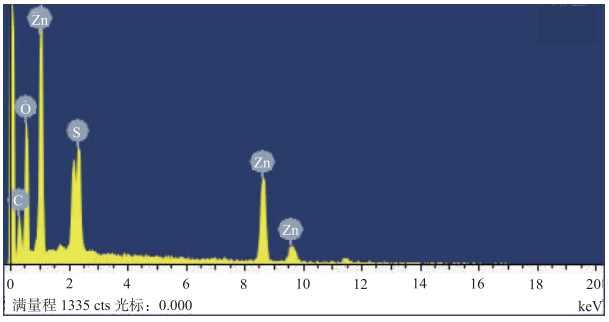
氨基酸成分	寡肽		螯合肽	
	每 100 g 寡肽的氨基酸质量/g	质量分数/%	每 100 g 螯合肽的氨基酸质量/g	质量分数/%
天门冬氨酸	3.61	11.34	5.55	9.41
苏氨酸	1.28	4.02	2.82	4.78
丝氨酸	1.23	3.86	2.53	4.29
谷氨酸	5.69	17.87	8.41	14.25
甘氨酸	1.09	3.42	2.10	3.56
丙氨酸	1.18	3.71	2.99	5.07
胱氨酸	0.28	0.88	0.30	0.51
缬氨酸	0.96	3.02	3.04	5.15
甲硫氨酸	0.52	1.63	1.65	2.80
异亮氨酸	0.79	2.48	2.63	4.46
亮氨酸	1.27	3.99	4.99	8.46
酪氨酸	0.73	2.29	1.91	3.24
苯丙氨酸	0.68	2.14	2.25	3.81
赖氨酸	3.57	11.21	5.32	9.02
组氨酸	1.80	5.65	2.17	3.68
精氨酸	2.33	7.32	3.38	5.73
脯氨酸	4.83	15.17	6.97	11.81
总计	31.84	100.00	59.01	100.00

2.4 能谱分析

对制备的样品用能谱仪进行面扫描,见图 12。由表 6 可知,鲐鱼暗色肉寡肽无 Zn 原子,肽锌螯合物中 Zn 原子数百分含量为 15.59%,Zn 质量分数增至 44.94%。C 的原子数百分含量和质量分数分别从 67.82%、60.14%降至 40.48%、21.44%,O 的原子数百分含量由 28.6%提升至 40.21%,而 O 的质量分数从 33.78%下降至 28.37%。此外肽锌螯合物中多了 S 元素,这可能是因为寡肽在螯合过程中,添加了硫酸锌,继而导致螯合物中有硫酸根离子的残留。肽锌螯合物酶解液寡肽能谱图中,没有 Zn 峰,而肽锌螯合物能谱图(b)中有 3 个 Zn 峰,这说明 Zn^{2+}与寡肽在 3 个位点发生了螯合,能谱分析结果表明:大量 Zn^{2+}与鲐鱼暗色肉寡肽发生了螯合。



(a)鲐鱼暗色肉蛋白肽的能谱分析



(b)鲐鱼暗色肉肽锌螯合物的能谱分析

图 12 鲐鱼暗色肉蛋白肽及肽锌螯合物的能谱分析

Fig. 12 Energy spectrum analysis diagram of mackerel dark meat protein peptide and peptide zinc chelate

表 6 鲐鱼暗色肉蛋白肽及肽锌螯合物的能谱分析结果

Table 6 Energy spectrum analysis results of mackerel dark-colored meat protein peptide and peptide zinc chelate

元素	蛋白肽		肽锌螯合物	
	质量分数/%	原子数百分含量/%	质量分数/%	原子数百分含量/%
C	60.14	67.82	21.44	40.48
O	33.78	28.60	28.37	40.21
S	—	—	5.25	3.72
Zn	—	—	44.94	15.59
Na	6.08	3.58	—	—
总量	100	100	100	100

3 结 语

本研究将酶解后的鲐鱼暗色肉与锌离子进行螯合,以螯合得率和螯合率为指标,考察反应时间、温度、pH、肽质量分数、硫酸锌与肽的质量比对螯合能力的影响。通过响应面结合实际应用得出最佳工艺条件为螯合时间 51 min、螯合温度 72 ℃、肽锌质量比 1:2、肽质量分数 5.35%、螯合 pH 值 7.9,螯合

得率与螯合率分别为55.86%、65.12%，这为鲐鱼暗色肉肽锌螯合物制备提供了较为理想的工艺模型。对鲐鱼暗色肉肽锌螯合物进行氨基酸、能谱分析，结果表明肽与锌结合后，形成了含锌量较高的物质，为鲐鱼暗色肉的高值化利用提供了依据。

参考文献:

[1] 朱碧英,毛秀珍. 鲢鱼蛋白酶解肽分子组成及其降血脂作用的初步研究[J]. 营养学报,2005,27(5):422-424.
[2] 陈季旺,夏文水,胡畔,等. 鱼肽的酶法制备工艺及其特性的研究[J]. 食品科学,2007,28(6):218-221.
[3] 尤娟,罗永康,沈慧星. 酶法制备鲢鱼蛋白抗氧化肽研究[J]. 渔业现代化,2010,37(3):42-47.
[4] LIASETB,LIED E,ESPE M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry chemical characterisation and nutritional evaluation[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2016,80(5):581-589.
[5] 马超月. 燕麦多肽的制备及其降血脂和降血压效果研究[D]. 镇江:江苏大学,2018.
[6] 牟雪姣,马广薇. 玉米蛋白水解物螯合锌的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(16):8677-8679.
[7] 孙金峤. 特殊健康状态儿童预防接种专家共识之三——原发性免疫缺陷病的预防接种[J]. 中国实用儿科杂志,2018,33(10):740-742.
[8] 曹继琼,何长华. 锌缺乏对人体健康的影响[J]. 现代医药卫生,2014,30(7):1016-1019.
[9] LAKSHAMI A J,KAUL P. Nutritional potential,bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) seeds[J]. **LWT – Food Science and Technology**,2011,44(8):1821-1826.
[10] 林谢凤. 鱼类副产物胶原肽螯合锌的制备及其性质研究[D]. 厦门:集美大学,2015.
[11] 赵洪雷. 鲢鱼蛋白小肽螯合锌的制备及其生物活性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
[12] 顾冰飞,赵圆圆,陈义勇. 杏鲍菇多糖锌螯合物的制备工艺及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发,2019,40(4):97-103.
[13] 胡爱军,马立新,郑捷,等. 超声法制备鱼胶原蛋白肽锌螯合物的研究[J]. 食品工业,2014,35(7):9-12.
[14] 汪婵,陈敏,李博. 芝麻蛋白制备金属螯合肽的酶解工艺研究[J]. 食品科技,2011,36(9):184-189.
[15] 刘晓鹏,张俊霞,姜宁,等. 响应面试验优化超声辅助提取连钱草多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2016,37(4):13-19.
[16] 玄依凡. 乳清蛋白肽—锌离子螯合物的制备及特性研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2017.
[17] 冯倩,曾里,冉旭,等. 低分子量鲶鱼蛋白肽的酶解工艺优化及氨基酸分析[J]. 中国调味品,2020,45(1):84-89.
[18] 富天昕,张舒,盛亚男,等. 绿豆多肽锌螯合物的制备及其结构与体外消化的分析[J]. 食品科学,2020,41(4):59-66.
[19] 刘永,黎彬庆,韦寿莲. 罗非鱼鳞胶原蛋白肽锌螯合物制备工艺优化[J]. 食品与发酵工业,2013,39(4):125-129.
[20] 陈义勇,张阳. 杏鲍菇多糖羧甲基化修饰工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2016,42(7):119-127.
[21] LIN J,CAI X,TANG M,et al. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2015,63(44):9704-9714.
[22] 段秀,杨成涛,孙云,等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽亚铁螯合修饰及螯合物性质的研究[J]. 食品工业科技,2014,35(18):157-166.
[23] WANG H X,NG T B. Examination of lectins,polysaccharopeptide,polysaccharide,alkaloid,coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases[J]. **Planta Medica**,2001,67(7):669-672.
[24] JUNGWK,KARAWITAR,HEOSJ,et al. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack(*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis[J]. **Process Biochemistry**,2006,41(9):2097-2100.
[25] HOU H,WANG S,ZHU X,et al. A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex[J]. **Food Chemistry**,2018,243:389-395.
[26] 张亚茹. 榛子螯合肽的制备、分离纯化及性质研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2016.
[27] 王晓萍. 小麦胚芽蛋白源锌螯合肽的分离纯化、表征及生物活性研究[D]. 无锡:江南大学,2014.