

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.020

蚌肉肽—锌螯合物制备工艺及其保肝作用研究

Preparation of mussel meat peptide-Zinc chelate and its effect on liver protection

王常麟 王升光 刘晓美

WANG Chang-lin WANG Sheng-guang LIU Xiao-mei

代龙 高鹏

DAI Long GAO Peng

(山东中医药大学, 山东 济南 250355)

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

摘要:以蚌肉为原料,采用优化酶解工艺制备蚌肉肽。以螯合率为指标,对蚌肉肽的富锌工艺进行优化并评价其溶液保肝作用。结果显示,蚌肉肽—锌的最佳螯合工艺参数为螯合温度 70 °C,螯合 pH 8.0,蚌肉肽与锌溶液质量浓度比 2:1 (g/mL),螯合反应 1.5 h。该工艺条件下螯合率为 58.55%;制备的富锌蚌肉肽保肝作用显著,当灌胃剂量为 400 mg/kg·BW 时,SOD 与 GSH-Px 的活性分别为(142.78±7.73),(258.16±8.52) IU/L。

关键词:蚌肉肽;酶解;锌;螯合工艺;保肝作用

Abstract: With the mussel meat as raw material, mussel meat peptide was prepared by optimum enzymatic hydrolysis process. Using the chelation rate as the index, the single factor experiment and response surface method were used to study the zinc-rich process of mussel meat peptide, and the optimal chelation process was optimized and to evaluate the liver protective effect of zinc-rich mussel meat peptide. The results showed that the optimal chelating process parameters were the chelating temperature was 70 °C, the chelating pH value was 8.0 and the concentration ratio was 2.0 for 1.5 h, and chelation rate was 58.55%; The zinc-rich mussel meat peptide prepared under optimized technological conditions has a significant effect on protecting liver. When the dose was 400 mg/kg·BW, the activity of SOD and GSH-Px were (142.78±7.73) and (258.16±8.52) IU/L, respectively.

Keywords: mussel meat peptide; enzymatic hydrolysis; Zinc; chelation; liver protection

蚌为软体动物门瓣鳃纲蚌科,多个品种能在淡水中用于养殖生产珍珠。由于蚌肉蛋白呈角质化,不易嚼碎、消化,因此在取珠后多被废弃,造成极大的资源浪费及环境污染问题^[1-2]。河蚌肉蛋白质含量丰富、脂肪含量低,含有较多的核黄素,具有解酒、保肝、提高免疫力等功效^[3-5]。

刘仁平等^[6]发现蚌肉可明显改善肝细胞的水样变和脂肪变,阻遏炎性反应。民间自古就有“蚌肉煮水代茶饮来解酒毒,保肝护肝”的习俗。锌被近代医学界、营养学界喻为人体的“生命之花”,对人体中的脂肪、糖类和蛋白质起调节作用^[7-8]。富锌蚌肉肽不仅能发挥蚌肉的保肝护肝作用,且能作为补锌剂,提高锌元素的生物利用率^[9]^[10-12]。目前研究^[10-12]主要集中在采用超声波—微波或高压脉冲电场辅助酶解蚌肉并对其工艺进行优化,在蚌肉肽螯合微量元素及其保肝作用方面研究较少,刘佳彤^[13]采用蚌肉酶解制得的氨基酸与蚌壳提取的可溶钙直接螯合制备可食性氨基酸螯合钙;周龙^[9]^[15-21]将蚌肉通过蛋白酶水解成分子量较小的多肽分子,在一定条件下,与无机锌盐络合产生多肽锌螯合物并制备了多肽锌制剂,但均未涉及螯合物的药效作用。

试验拟以河蚌肉为原料,通过最佳酶解工艺制备活性肽,再与微量元素锌相螯合,通过响应面法优化螯合工艺得到富锌蚌肉肽并评价其保肝作用,旨在加大蚌肉的深入开发研究,为蚌肉护肝制品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料、动物与试剂

河蚌肉:浙江省诸暨市养殖场;

KM 小鼠:100 只,雌雄各半,济南朋悦实验动物繁育有限公司;

碱性蛋白酶、胰蛋白酶等:酶活 $\geq 1.0 \times 10^5$ U/g,上海

基金项目:国家自然科学基金(编号:81073031)

作者简介:王常麟,男,山东中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:高鹏(1978—),男,山东中医药大学副教授,博士后,硕士生导师。E-mail:48395504@qq.com

收稿日期:2019-04-23

源叶生物科技有限公司；

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

组织捣碎机:DS-1 型,无锡沃信仪器有限公司；

胶体磨:JM-L50 型,上海诺尼轻工机械有限公司；

立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-50FBS 型,上海申安医疗器械厂；

pH 计:FE-20 型,梅特勒-托利多仪器有限公司；

离心机:DT5-2 型,北京时代北利离心机有限公司；

冷冻干燥机:JM-L50 型,北京博医康实验仪器有限公司；

磁力搅拌器:CL-85-2 型,江苏金怡仪器科技有限公司；

旋转蒸发器:R-301 型,上海申顺生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 蚌肉肽的制备 将河蚌肉洗净,加入少量纯水用组织捣碎机高速捣碎,加入适量的纯水使底物浓度为 10%,胶体磨对其进行匀浆处理,煮沸 20 min,进行高温杀菌,待温度升至 45℃,调节 pH 至 8.0,分别加入质量分数为 2.0%的碱性蛋白酶和胰蛋白酶(即加酶量占生药量的百分比)酶解 3 h 后,煮沸,高温灭酶 15 min,迅速冷却至室温,于冰箱冷藏过夜,4 500 r/min 离心 10 min,取上清液,浓缩,-24℃预冷冻 5 h(或-80℃预冷冻 1 h),冷冻干燥,得蚌肉肽冻干粉。

1.3.2 蚌肉肽—锌螯合单因素试验

(1) 时间:将蚌肉肽与锌溶液按质量浓度比 2:1 (g/mL)混合均匀,螯合 pH 8.0,螯合温度 70℃,分别螯合反应 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h,考察螯合时间对螯合率的影响。

(2) 螯合温度:将蚌肉肽与锌溶液按质量浓度比 2:1 (g/mL)混合均匀,螯合 pH 8.0,螯合温度分别为 50,60,70,80,90℃,螯合反应 2 h,考察螯合温度对螯合率的影响。

(3) 蚌肉肽与锌溶液质量浓度比:将蚌肉肽与锌溶液分别按质量浓度比 1:2,2:2,3:2,4:2,5:2 (g/mL)混合均匀,螯合 pH 8.0,螯合温度 70℃,螯合反应 2 h,考察蚌肉肽与锌溶液质量浓度比对螯合率的影响。

(4) pH 值:将蚌肉肽与锌溶液按质量浓度比 2:1 (g/mL)混合均匀,螯合 pH 分别为 6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,螯合温度 70℃,螯合反应 2 h,考察 pH 对螯合率的影响。

1.3.3 蚌肉肽—锌螯合响应面优化试验 在单因素试验基础上,选取螯合时间、螯合温度、蚌肉肽与锌溶液质量比及 pH 值为因素,以螯合率为响应值,采用四因素三水平进行响应面分析试验。

1.3.4 螯合率的测定 采用乙二胺四乙酸(EDTA)络合

滴定法^[14]。

1.3.5 保肝作用研究

(1) 小鼠 CCl₄ 急性肝损伤模型的建立:根据文献[15],将 KM 小鼠随机分成 7 组,每组 10 只,分别为正常对照组、CCl₄ 模型组、蚌肉肽组、富锌蚌肉肽低剂量组、富锌蚌肉肽中剂量组、富锌蚌肉肽高剂量组、阳性对照水飞蓟素组。各组均以小鼠标准饲料喂养,自由饮水,25℃下适应 1 周后,正常对照组和 CCl₄ 模型组按 10 mL/kg·BW 剂量每天灌胃生理盐水 1 次,蚌肉肽组按 200 mg/kg·BW 剂量每天灌胃蚌肉肽样品 1 次,富锌蚌肉肽低、中、高剂量组分别按 100,200,400 mg/kg·BW 剂量每天灌胃富锌蚌肉肽样品 1 次,阳性对照组按 50 mg/kg·BW 剂量每天灌胃水飞蓟素 1 次。灌胃 15 d 后,正常对照组腹腔注射 10 mL/kg·BW 剂量橄榄油,其余组注射体积分数为 0.125% CCl₄—橄榄油溶液 10 mL/kg·BW。

(2) 生化指标检测:根据文献[16]按试剂盒说明书方法测定肝组织匀浆中 SOD、GSH-Px 活力。

1.4 数据分析

试验结果以(平均值±标准差)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析,P<0.05 表示差异显著,P<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 蚌肉肽—锌螯合工艺优化

2.1.1 螯合时间对螯合率的影响 由图 1 可知,螯合率随螯合反应的进行先快速增加后趋于平稳。可能是反应前期肽与锌接触面积大,反应快,后期反应逐渐达饱和,螯合率基本不变,因此最佳螯合时间为 2 h。

2.1.2 螯合温度对螯合率的影响 由图 2 可知,螯合率随螯合温度的升高先增加后减小,可能是温度过高,部分螯合物不稳定^[17],故最佳螯合温度为 70℃。

2.1.3 蚌肉肽与锌溶液质量浓度比对螯合率的影响 由图 3 可知,螯合率随蚌肉肽与锌溶液质量浓度比的增加先增加后趋于平稳,可能是前期肽与锌溶液质量浓度比逐渐增大有利于生成稳定的螯合物,螯合率增加,但蚌肉肽浓

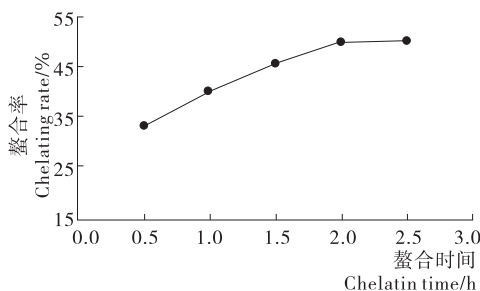


图 1 螯合时间对蚌肉肽—锌螯合的影响

Figure 1 Effect of chelating time on chelating technology of mussel meat peptide-Zinc

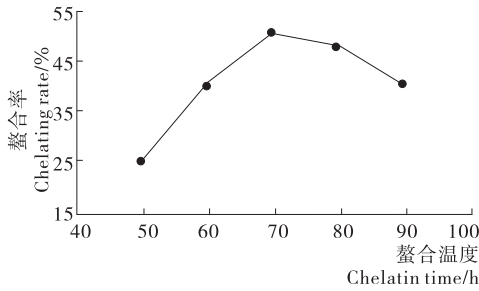


图2 螯合温度对蚌肉肽-锌螯合的影响

Figure 2 Effect of chelating temperature on chelating technology of mussel meat peptide-Zinc

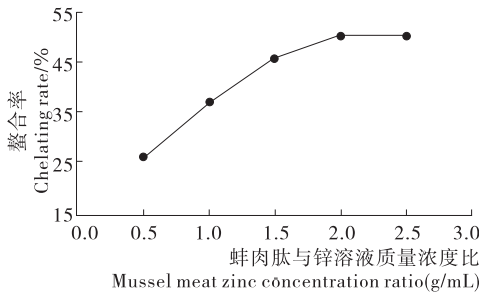


图3 蚌肉肽与锌溶液质量浓度比对蚌肉肽-锌螯合的影响

Figure 3 Effect of mussel meat peptide and zinc concentration ratio on chelating technology of mussel meat peptide-Zinc

度过大,溶解度降低,所以最佳质量浓度比为 2 : 1 (g/mL)。
 2.1.4 pH 值对螯合率的影响 由图 4 可知,螯合率随 pH 的增加先增加后减少, pH 为 8.0 时可能接近螯合物等电点,受酸碱影响较小^[18],螯合率最高。

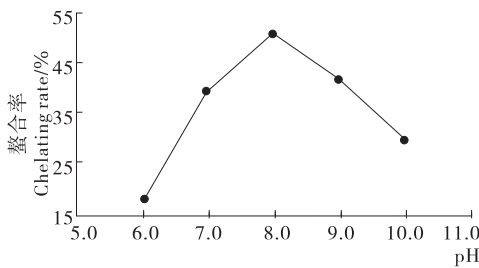


图4 pH 值对蚌肉肽-锌螯合的影响

Figure 4 Effect of chelating pH value on chelating technology of mussel meat peptide-Zinc

2.1.5 蚌肉肽-锌螯合工艺响应面优化试验 根据 Box-Benhnken 中心组合试验设计原理进行优化试验,因素设计及方案见表 1,试验及结果见表 2,方差分析见表 3。

各因素与螯合率之间的多元二次响应面回归模型为:

$$Y = 58.10 - 0.21X_1 + 1.13X_2 + 4.21X_3 - 0.72X_4 + 0.15X_1X_2 - 2.44X_1X_3 + 0.22X_1X_4 - 0.26X_2X_3 - 0.055X_2X_4 - 2.41X_3X_4 - 2.58X_1^2 - 6.67X_2^2 - 10.70X_3^2 - 19.27X_4^2 \quad (1)$$

表 1 螯合工艺响应面试验水平编码表

Table 1 Response surface test level and coding table of chelating process

水平	X ₁ 螯合时间/h	X ₂ 螯合温度/℃	X ₃ 蚌肉肽与锌溶液质量浓度比(g/mL)	X ₄ pH
-1	1.0	60	3 : 2	7.0
0	1.5	70	4 : 2	8.0
1	2.0	80	5 : 2	9.0

表 2 响应面组合设计试验及结果

Table 2 Response surface combined design test and results

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	螯合率/%
1	0	-1	1	0	41.35
2	0	0	0	0	55.23
3	0	1	-1	0	38.17
4	-1	1	0	0	49.73
5	0	0	0	0	58.42
6	1	0	1	0	46.08
7	0	-1	-1	0	35.19
8	0	1	0	-1	33.72
9	-1	0	0	-1	34.59
10	0	0	1	1	29.02
11	0	0	-1	1	24.08
12	0	0	-1	-1	23.98
13	1	0	0	-1	35.08
14	1	-1	0	0	49.26
15	1	1	0	0	51.72
16	-1	0	0	1	34.52
17	0	1	0	1	33.62
18	-1	-1	0	0	47.86
19	0	0	0	0	60.06
20	0	-1	0	1	31.59
21	0	-1	0	-1	31.47
22	-1	0	-1	0	39.56
23	0	0	0	0	58.55
24	1	0	0	1	35.89
25	-1	0	1	0	54.29
26	1	0	-1	0	41.12
27	0	0	1	-1	38.57
28	0	0	0	0	58.25
29	0	1	1	0	43.29

表 3 回归模型方差分析结果[†]

Table 3 Results of variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	3 093.87	14	220.99	42.12	<0.000 1
X ₁	0.16	1	0.16	0.031	0.862 5
X ₂	15.26	1	15.26	2.91	0.110 3
X ₃	212.52	1	212.52	40.50	<0.000 1
X ₄	6.29	1	6.29	1.20	0.291 9
X ₁ X ₂	0.09	1	0.09	0.02	0.899 4
X ₁ X ₃	23.86	1	23.86	4.55	0.051 1
X ₁ X ₄	0.19	1	0.19	0.04	0.850 4
X ₂ X ₃	0.27	1	0.27	0.05	0.823 7
X ₂ X ₄	0.01	1	0.01	2.31E-03	0.962 4
X ₃ X ₄	23.28	1	23.28	4.44	0.053 7
X ₁ ²	43.11	1	43.11	8.22	0.012 4
X ₂ ²	288.52	1	288.52	54.99	<0.000 1
X ₃ ²	743.07	1	743.07	141.62	<0.000 1
X ₄ ²	2 409.73	1	2 409.73	459.25	<0.000 1
残差	73.46	14	5.25		
失拟项	61.05	10	6.11	1.97	0.268 6
纯误差	12.41	4	3.10		
总和	3 167.33	28			

[†] R²=0.992 4; R²_{adj}=0.978 9。

由表 3 可知,模型 P<0.05,表示该模型显著,各因素中一次项 X₃和二次项 X₁²、X₂²、X₃²、X₄²为极显著影响(P<0.01),二次项 X₁²为显著影响(P<0.05),影响螯合率的因素主次顺序为蚌肉肽与锌溶液质量浓度比>螯合温度>pH>螯合时间。

由图 5 可知,螯合温度与螯合时间两因素交互作用较强,但由方差分析结果可知,两因素间交互作用对螯合率影响并不显著;螯合温度与蚌肉肽与锌溶液质量浓度比两因素交互作用较强,随着螯合温度和蚌肉肽与锌溶液质量浓度比的增加,螯合率先增大后减小,与温度过高,螯合物稳定性受影响有关;螯合温度与 pH 两因素交互作用较强,随着螯合温度和 pH 的增加,螯合率先逐渐增大后减少,可能是温度升高,螯合率增加过快,当温度过高时螯合反应受限制;pH 与蚌肉肽与锌溶液质量浓度比两因素交互作用较强,随着 pH 和蚌肉肽与锌溶液质量浓度比的增加,螯合率逐渐增大,进一步增加时,螯合率又减少。

2.1.6 最佳螯合工艺验证实验 经优化最佳螯合工艺为:螯合温度 70 °C, pH 8.0, 蚌肉肽与锌溶液质量浓度比 2 : 1 (g/mL), 螯合反应 1.5 h, 该条件下响应面分析预测

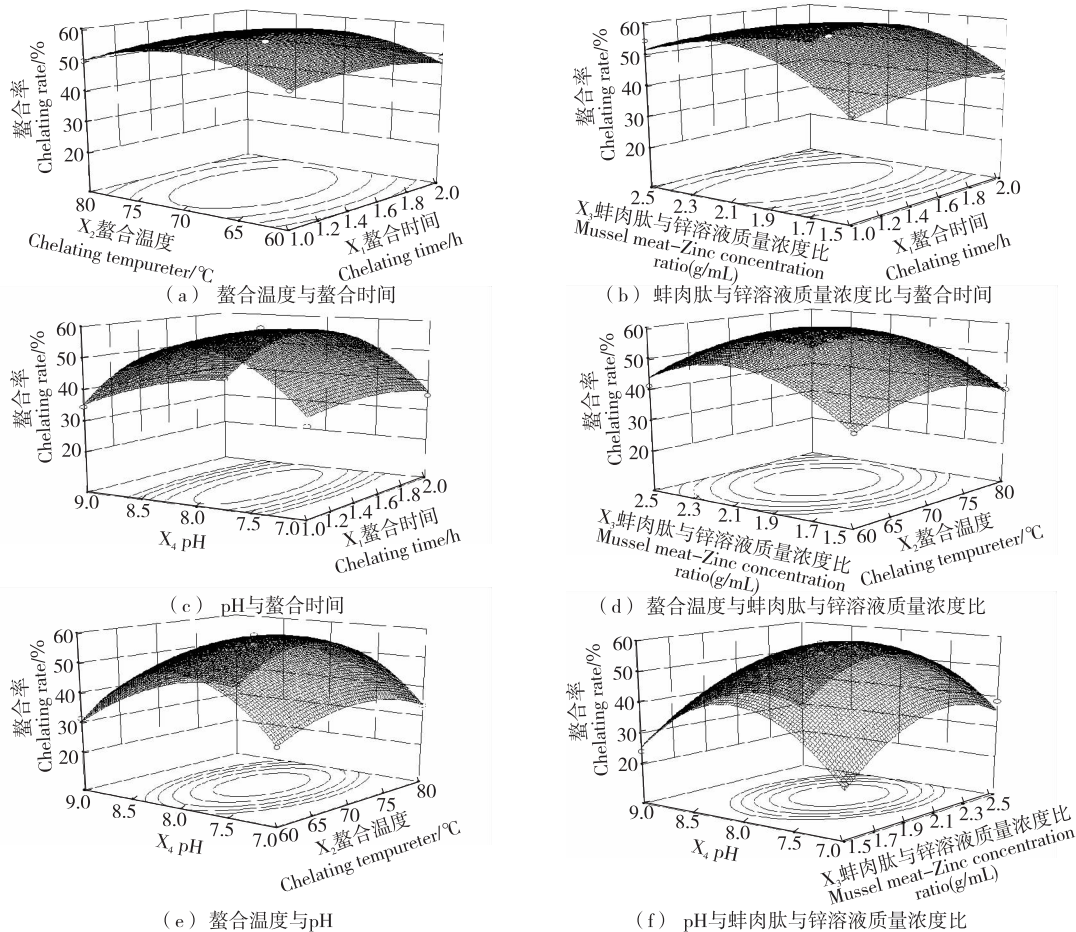


图 5 不同螯合因素对蚌肉肽-锌螯合率影响的响应曲面

Figure 5 Response surface of different chelating factors on chelating rate of mussel peptide-Zinc

螯合率为 58.61%，实测螯合率为 58.55% ($n=3$)，相对误差 $<5\%$ ，表明此模型可行有效。

2.2 保肝作用研究

由表 4 可知，与正常对照组相比， CCl_4 模型组小鼠肝组织中 SOD 活性、GSH-Px 活性有极显著差异 ($P<0.01$)；与 CCl_4 模型组相比，蚌肉肽组 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$)，富锌蚌肉肽各剂量组 SOD、GSH-Px 活性均极显著升高 ($P<0.01$)，且呈剂量一效应关系，表明蚌肉肽具有良好的保肝作用但作用较富锌蚌肉肽稍差；与阳性对照组水飞蓟素组相比，灌胃高剂量组 SOD、GSH-Px 活性相当，表明富锌蚌肉肽具有良好的保肝效果。

表 4 不同组别对 CCl_4 肝损伤小鼠肝匀浆中 SOD、GSH-Px 的影响[†]

Table 4 Effects of different groups on SOD and GSH-Px in liver homogenate of CCl_4 liver injured mice ($n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹ · BW)	SOD/(IU · L ⁻¹)	GSH-Px/(IU · L ⁻¹)
正常对照组	—	139.15±4.56	287.45±9.56
CCl_4 模型组	—	107.98±2.35	190.68±7.24
蚌肉肽组	200	117.23±2.78*	217.33±8.58*
富锌蚌肉肽低剂量组	100	129.55±3.48**	230.47±5.51**
富锌蚌肉肽中剂量组	200	134.16±6.29**	244.73±4.88**
富锌蚌肉肽高剂量组	400	142.78±7.73**	258.16±8.52**
阳性对照水飞蓟素组	50	140.62±6.77**	251.21±7.29**

† * 表示 $P<0.05$ ；** 表示 $P<0.01$ 。

3 结论

采用最佳酶解工艺制备出蚌肉肽，以螯合率为指标，对蚌肉肽—锌螯合物的制备工艺进行了研究，通过单因素试验及响应面优化，得出蚌肉肽—锌的最佳螯合工艺参数为螯合温度 70 °C，pH 8.0，蚌肉肽与锌溶液质量浓度比 2 : 1 (g/mL)，螯合反应 1.5 h，螯合率为 58.55%。对小鼠 CCl_4 肝损伤模型进行药效学试验应用研究可知，富锌蚌肉肽具有较好的保护肝脏作用。由于时间限制，药效学跟踪还需进一步进行；富锌蚌肉肽稳定性仍需进一步研究。

参考文献

[1] 张缓, 姜启兴, 许艳顺, 等. 采珠后河蚌副产物的营养成分分析及评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 346-349.

[2] LIU Cheng-chu, ZHOU Hai-yan, SU Yi-cheng, et al. Chemical compositions and functional properties of protein isolated from by-product of triangle shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Aquatic Food Product

Technology, 2009, 18(3): 193-208.

- [3] FUENTES A, FERNANDEZSEGOVIA I, ESCRICHE I, et al. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from different Spanish origins [J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 295-302.
- [4] GOULAS A E, CHOULIARA I, NESSI E, et al. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(3): 752-760.
- [5] VERNOCCHI P, MAFFEI M, LANCIOTTI R, et al. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic sea (Italy) [J]. Food Control, 2007, 18(12): 1575-1583.
- [6] 刘仁平, 杨旭, 张维娅, 等. 蚌肉多糖对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2015, 39(6): 602-605.
- [7] 张莹, 刘树芳. 微量元素锌与人体健康[J]. 科技资讯, 2019, 17(5): 253-254.
- [8] 胡焰, 韩光宇, 王健. 微量元素锌与人体健康初探[J]. 当代医学, 2011, 17(31): 152-153.
- [9] 周龙. 珍珠蚌肉酶解液多肽锌螯合研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- [10] 王静雅, 杨琦, 安苏苏, 等. 响应面法优化高压脉冲电场辅助酶解河蚌肉工艺[J]. 肉类研究, 2019, 33(2): 25-31.
- [11] 伊小丽. 超声波—微波辅助酶解河蚌肉制备调味料工艺研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [12] 贺琴. 高压脉冲电场辅助酶解河蚌蛋白粉的制备及特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [13] 刘佳彤. 河蚌肉/大豆粕酶解氨基酸螯合钙的制备及特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [14] 包怡红, 王芳, 王文琼. 大豆多肽硒螯合物的制备及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 27-32.
- [15] 张海燕, 温韬, 卢静, 等. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 161-163, 224.
- [16] 王传鹏, 杨超, 赵骏, 等. 芹菜素对雄性小鼠肝脏 SOD、GSH-Px、CAT 活力影响[J]. 中国实用医药, 2013, 8(6): 21-22.
- [17] 姜良萍, 李博, 罗永康, 等. 鲢鱼源多肽锌螯合物对冷藏草鱼的保鲜作用[J]. 食品科技, 2013, 38(12): 144-149.
- [18] 邱冬玲, 胡长利, 崔建云. 丝素肽与锌螯合工艺条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 38-42.