

罗非鱼蛋白酶解液的多肽与钙复合物的制备及其抑菌分析

丁利君, 危雪如

(广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 采用木瓜蛋白酶和风味酶的复合酶解罗非鱼蛋白, 制取富含多肽的酶解液; 并将酶解液中的多肽与 Ca^{2+} 反应制备多肽-钙螯合物, 探讨反应液的 pH 值、反应温度、反应时间、多肽与 CaCl_2 的质量比对螯合反应的影响, 并对产物进行抑菌实验。结果表明: 多肽液与 Ca^{2+} 的最佳螯合工艺为反应 pH7.13, 反应温度 29.5℃, 反应时间 24.05min, 多肽与 CaCl_2 的质量比 2.68:1, 在此最佳条件下钙的螯合率为 87.5%; 产物对多种微生物, 特别是对细菌的生长有良好的抑制作用。

关键词: 罗非鱼; 钙离子; 螯合物; 抑菌

Preparation and Antibacterial Activity of Chelate Complex of Ca^{2+} and Polypeptides from Tilapia Proteins

DING Li-jun, WEI Xue-ru

(Faculty of Light and Chemical Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Hydrolysates rich in polypeptides was obtained from enzymatic hydrolysis of tilapia proteins using papain and subtilisin. A Ca^{2+} chelate was prepared using the hydrolysates and calcium. Effects of pH, temperature, time, and ratio of hydrolysates to CaCl_2 on chelation reaction were explored. Apart from this, the Ca^{2+} chelate was evaluated for antibacterial activity. Results indicated that the optimal chelation reaction between hydrolysates and CaCl_2 conducted for 24.05 min at 29.5 °C and pH 7.13 with a polypeptide/calcium mass ratio of 2.68:1 yielded 87.5% of Ca^{2+} chelating rate. The chelated products exhibited an effective inhibition against a majority of microorganisms, especially against *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Candida albicans*.

Key words: tilapia; Ca^{2+} ; chelate; antibacterial activity

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0198-05

罗非鱼属鲈形目, 丽鱼科, 具有适应性强、繁殖力高、食性广杂、抗病力强及肉味鲜美等特点。罗非鱼是我国淡水重要养殖对象, 每年罗非鱼粗加工品的出口数量都有大幅增长, 罗非鱼出口呈逐年上升的趋势。但是罗非鱼加工以初级产品较多, 深加工、精加工产品很少。出口产品主要是冻鱼片和冻全鱼两大类, 其中罗非鱼冻鱼片在国际市场很受欢迎, 其出肉率不到 40%^[1]。本研究将罗非鱼蛋白酶解, 制取多肽复合物, 提高其生理功能^[2]; 并将钙离子与多肽在一定条件下形成螯合物, 使其具有更多的生物活性^[3]。虽然人们对活性肽的抗菌活性的认识有了很大进展, 但活性肽与金属螯合物的抗菌活性, 国内外鲜有报道, 因此研究活性肽螯合物的抗菌效果意义重大。

收稿日期: 2009-07-02

基金项目: 广东省科技厅计划项目(2006B20401012)

作者简介: 丁利君(1965—), 女, 教授, 硕士, 主要从事食品化学、食品加工研究。E-mail: ddddli@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼购于广州大学城南亭菜市场。将鱼头、鱼尾及内脏等部分去掉, 洗干净后, 加入与鱼等量的水, 在 80℃水浴恒温 30min, 去骨后, 用组织捣碎机捣碎制成鱼糜备用。

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌、啤酒酵母 本校微生物实验室; 白色念珠菌、黑曲霉 中科院微生物研究所。

木瓜蛋白酶 PA2(9000U/g, 配成 0.1% 的酶溶液) 广州仟壹生物技术有限公司; 风味酶(4000U/g, 配成 0.1% 的酶溶液) 诺维信公司; 无水 CaCl_2 、三氯乙酸(TCA)、

水杨酸、邻苯三酚、 H_2O_2 、 $FeSO_4$ 等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HVIS-7220 可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；SW-CJ-2F 洁净工作台 苏净集团安泰公司；SPX-250 生化培养箱 上海悦丰仪器仪表有限公司。

1.3 方法

1.3.1 罗非鱼酶解液的制备

将预处理过的罗非鱼鱼肉按肉水比为 1:2(m/V, 溶液 pH7.5)，木瓜蛋白酶和风味酶为 1:3 的比例在 65℃ 的恒温水浴锅中酶解 4h。酶解完成后，将温度升高至 85℃ 继续加热 10min 以使酶失去活性。接着在离心机以 4000r/min 的转速离心 15min，取上清液即为所需的酶解液^[4]。

1.3.2 多肽-钙螯合物的工艺

工艺流程：酶解液→加入 Ca^{2+} 反应→离心分离→无水乙醇洗涤→分级沉淀→抽滤→干燥→多肽- Ca^{2+} 螯合物。

操作要点：通过浓缩或稀释的方法将酶解液多肽含量调整为 1.00mg/ml，然后在不同时间、不同温度、不同 pH 值条件下向该酶解液中加入不同体积的 0.1mol/L 的无水 $CaCl_2$ 溶液进行反应，可以观察到有颗粒状的固形物析出，以 4000r/min 的转速离心 15min 将析出的固形物进行分离，并对其进行性质及抗菌活性分析。

1.3.3 多肽-钙螯合率测定

采用 EDTA 络合滴定法^[5]。

$$\text{螯合率}(\%) = \frac{V_1}{V_0} \times 100$$

式中： V_1 为滴定螯合态钙离子所消耗的 EDTA 溶液体积(ml)； V_0 为滴定钙离子总量所消耗的 EDTA 溶液体积(ml)。

1.3.4 多肽含量测定

采用双缩脲比色法^[6]。

1.3.5 多肽-钙螯合率的影响因素分析

多肽-钙螯合物制备工艺的影响因素较多，本实验分别选用 $Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 、 CaO 及无水 $CaCl_2$ 为 Ca^{2+} 的来源，与多肽液进行反应，观察沉淀的生成情况，并在不同时间：10、20、30、40、50、60min；不同温度：20、30、40、50、60、70、80、90℃；不同 pH 值：3、4、5、6、7、8、9；不同多肽与 $CaCl_2$ 质量比：10:1、4:1、2:1、1.33:1、1:1、0.8:1、0.67:1(即在质量浓度为 1.00mg/ml 的 20ml 多肽液中加入质量浓度为 0.01g/ml 的无水 $CaCl_2$ 溶液 0.2、0.5、1、1.5、2、2.5、3ml)4 种影响因素情况下测定其螯合率。

1.3.6 四元二次通用旋转组合设计试验

考虑到多因素之间可能存在交互作用，在单因素试验的基础上，选取时间、温度、pH 值及多肽与无水 $CaCl_2$ 质量比这 4 个因素进行四元二次通用旋转组合设计试验。

表 1 多肽-钙螯合物制备的旋转设计

Table 1 Variables and levels in rotation design for optimizing preparation process of polypeptide-calcium chelate

编码	多肽-钙螯合物质量比	pH	时间(min)	温度(℃)
+2	5:1	5	15	20
+1	4:1	6	20	25
0	3:1	7	25	30
-1	2:1	8	30	35
-2	1:1	9	35	40

1.3.7 多肽-钙螯合物的抗菌实验

将菌种活化，制备菌悬液，样品液稀释，以 0.05% 山梨酸钾溶液为阳性对照，滤纸片法测定样品的抑菌效果^[7]。

1.3.8 多肽-钙螯合物的性质研究

热稳定性：将制得的多肽-钙螯合物分别在 50、60、70、80、90、100℃ 水浴锅里加热 10min 后，再进行抗菌活性的研究；溶解性：将产物溶解在不同 pH 值的溶液中，观察其溶解性。

2 结果与分析

2.1 最佳 Ca^{2+} 来源的确定

表 2 钙离子源的选择

Table 2 Choice of calcium ion sources for high chelating rate

Ca^{2+} 的来源	$Ca(OH)_2$	$CaCO_3$	CaO	无水 $CaCl_2$
生成沉淀情况	微量	微量	几乎没有	较多
螯合率(%)	34	25	20	86

分别选 $Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 、 CaO 及无水 $CaCl_2$ 为 Ca^{2+} 的来源，与多肽液进行反应，观察沉淀生成情况。由表 2 可知，由于 $Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 、 CaO 均不易溶于水，不能直接与多肽液反应析出沉淀，与多肽的螯合率低，而无水 $CaCl_2$ 易溶于水，且能与多肽液反应形成沉淀，螯合率达到 86%，故选择无水 $CaCl_2$ 为 Ca^{2+} 的来源。

2.2 多肽-钙螯合物制备的单因素试验

2.2.1 多肽与 $CaCl_2$ 质量比对螯合率的影响

表 3 多肽与氯化钙质量比对螯合率的影响

Table 3 Effect of polypeptide/calcium chloride ratio on chelating rate

多肽与氯化钙质量比	0.67:1	0.8:1	1:1	1.33:1	2:1	4:1	10:1
螯合率(%)	39.5	50.2	63.8	70.1	86.0	61.4	28.7

表4 旋转组合设计结构矩阵及试验结果

Table 4 Structural matrix and experimental results of rotation design for optimizing preparation process of polypeptide-calcium chelate

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1X_2	X_1X_3	X_1X_4	X_2X_3	X_2X_4	X_3X_4	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_4^2	y
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	73.6
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	68.8
3	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	69.1
4	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	68.6
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	76.8
6	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	75.7
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	72.5
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	73.6
9	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	70.4
10	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	72.4
11	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	74.7
12	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	68.5
13	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	72.9
14	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	69.5
15	1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	68.6
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.2258	0.2258	0.2258	0.2258	70.8
17	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.2258	-0.7742	-0.7742	-0.7742	71.5
18	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.2258	-0.7742	-0.7742	-0.7742	73.6
19	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	3.2258	-0.7742	-0.7742	71.9
20	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	3.2258	-0.7742	-0.7742	73.2
21	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	3.2258	-0.7742	81.9
22	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	3.2258	-0.7742	82.4
23	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	3.2258	83.5
24	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	3.2258	84.3
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	86.0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	86.9
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	85.4
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	84.9
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	85.8
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	87.2
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.7742	-0.7742	-0.7742	-0.7742	86.7

2.4 多肽-钙螯合物的抗菌活性

表5 复合物的抑菌效果

Table 5 Inhibitory effects of polypeptide-calcium chelate against *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and bacteria (inhibition zone diameter: mm)

微生物	抑菌圈直径(mm)						
	黑曲霉	啤酒酵母	白色念珠菌	大肠杆菌	枯草杆菌	荧光假单胞菌	金黄色葡萄球菌
多肽-钙复合物	7.4	9.2	15.3	15.1	16.2	15.6	20.2
多肽原液	—	4.1	8.8	11.0	10.3	11.4	12.2
0.05%山梨酸钾	14.2	16.1	16.4	18.3	18.6	17.4	19.5

由表5可知,多肽-钙复合物与多肽原液比较,对实验中的各种微生物都有更好的抑制效果,但其抑菌效果比山梨酸钾溶液略差。目前对螯合物抗菌的作用机理尚无定论,部分研究表明,螯合物的肽分子可能和细菌细胞膜受体蛋白结合,改变细胞质膜通透性,造成膜结构破坏,引起膜内水溶性物质大量渗出,从而导致细菌死亡^[9]。

2.5 多肽-钙螯合物的性质

2.5.1 热稳定性

将制得的多肽-钙螯合物分别在50、60、70、80、90、100℃水浴锅里加热10min后,再进行抗菌活性的研究。实验表明,多肽-钙螯合物有一定的热稳定性,在温度不超过90℃时的水浴锅中加热一定时间后,仍然具有较好的抗菌活性。但当温度高于90℃时,其抗菌活性显著降低,因此该多肽-钙螯合物的应用过程中要避免高温对它的影响。

2.5.2 溶解性

将产物溶解在不同pH值溶液中,观察其溶解性。多肽-钙螯合物的溶解性受pH值的影响,当pH值大于8时,其溶解性很小,溶液几乎没有抗菌活性;当pH值小于4时,呈现出非常好的溶解性,并有很好的抑菌效果。

3 结 论

综上所述,罗非鱼蛋白酶解成多肽液,制取多肽-

钙螯合物的最佳工艺条件为:以无水 CaCl_2 为 Ca^{2+} 的来源,多肽与无水 CaCl_2 的质量比为 2.68:1, pH7.13, 反应时间 24.05min、反应温度 29.5℃。多肽-钙螯合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、荧光假单胞菌、啤酒酵母、白色念珠菌、黑曲霉等都有一定的抑制作用,特别是对各种细菌的抑制效果比较明显。这为罗非鱼的深加工与综合利用提供了一定的科学依据。

参考文献:

- [1] 周燕侠. 我国罗非鱼产业的现状和市场前景[J]. 科学养鱼, 2002(6): 57-60.
- [2] 吴建平. 生物活性肽的研究进展[J]. 食品与机械, 1998, 63(1): 6-8.
- [3] 黄泽元, 王海滨, 王亚林, 等. 食品营养强化剂蛋氨酸亚铁螯合物合成工艺研究[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(4): 25-27.
- [4] MEISEL H. Overview on milk protein-derived peptides[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(5/6): 363-373.
- [5] 李健, 徐忠, 张亚丽. 复合氨基酸微量元素络合盐的制备工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(3): 38-40.
- [6] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
- [7] 杨荣, 邓尚贵. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 201-206.
- [8] 东方人华, 周皓. 统计基础和 SPSS11.0 入门和提高[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 314.
- [9] DESTOUMIEUX D, BULET P, LOEW D, et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the *Penaeus vannamei* (Decapoda)[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 272(45): 28398-28406.

欢迎订阅 2010 年《宁夏大学学报(自然科学版)》

- 《中文核心期刊要目总览》(2008 年版)、《全国报刊索引》(科技版)确定的综合性科学技术类核心期刊
- 中国科技核心期刊和“中国科技论文统计源期刊”
- “中国学术期刊综合评价数据库”、“中国科学引文数据库”首批来源
- ChinaInfo 基础科技期刊群学术核心期刊
- 中国期刊方阵“双效期刊”
- 俄罗斯《文摘杂志》(AJ),《中国学术期刊文摘》固定引用期刊
- 美国《数学评论》(MR),《现代数学文摘》固定引用期刊
- 德国《数学评论》(Zbl. Math),《中国数学文摘》固定引用期刊
- 《中国物理文摘》,《中国力学文摘》固定引用期刊
- 美国《化学文摘》(CA),《中国化学化工文摘》,《中国无机分析化学文摘》固定引用期刊
- 《中国地科学文摘》,《中国国土资源文摘》固定引用期刊
- 《中国地理》(中国人民大学复印报刊资料),《中国地质文摘》固定引用期刊
- 美国《物理评论》(ZR),《中国生物科学文摘》,《中国医学文摘》固定引用期刊
- “美国柯尔比科学文化信息中心全球信息网(WWW)数据库”选刊期刊
- 中国科学院“中国科学文献数据库”、“中文科技期刊数据库”固定引用期刊
- “中国科技期刊精品数据库”、“中国科学技术期刊文摘(CSTA)数据库”首批来源

主要刊登工业技术、数学、物理学、化学、地理学等学科的基础理论研究和应用研究方面的研究报告、简报、快报等学术论文。

重点专栏:函数论研究、应用化学研究、可持续发展研究。

季刊:每季末月下旬出版 大 16 开 96 页 定价:10.00 元/册 全年订价 40 元。

全国各地邮局(所)均可订阅。发行部常年办理邮购。

邮发代号:74-7

国内刊号:CN 64-1006/S

国际刊号:ISSN 0253-2328

通讯地址:宁夏银川西夏区文萃北街 217 号 宁夏大学学术期刊中心 自然科学版编辑室

邮政编码:750021

网址: <http://ajc.nxu.edu.cn>

Email: xuebaoz@nxu.edu.cn

联系电话:0951-2061948, 2061928

传真:0951-2061793

联系人:张刚