

不同方法纯化的尼罗罗非鱼下脚料 蛋白酶解物锌螯合盐的理化特性

杨 萍, 李同刚, 余春霞, 洪鹏志*, 周春霞

(广东海洋大学食品科技学院, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 研究罗非鱼下脚料蛋白酶解物锌螯合盐(CH-0)及乙醇纯化(CH-I)与透析纯化组分(CH-II)的理化特性及体外自由基的清除能力,为多肽螯合盐的纯化研究提供理论基础。结果表明,CH-0的蛋白质含量(干基计)为71.86%,CH-I和CH-II分别为75.94%与78.83%;CH-0的锌含量为16.08%,CH-I和CH-II分别为14.49%与12.20%;凝胶层析结果显示,CH-I、CH-II与CH-0相比,有3个相同的主吸收峰,且大分子与小分子杂峰减少;氨基酸分析结果表明CH-II中的Asp、Glu、Gly、Lys、Arg和His的含量均高于CH-I,且都高于CH-0,与透析纯化相比,乙醇纯化必需氨基酸与支链氨基酸损失较大;CH-0、CH-I和CH-II对羟基自由基与DPPH自由基的清除率随浓度增强而增强,以IC₅₀值计,CH-I、CH-II比CH-0的清除能力分别提高了8.92%、24.01%与38.06%、46.13%。罗非鱼下脚料,蛋白酶解物(EH10K)有较好的超氧阴离子自由基清除能力,浓度为10.00 mg/mL时清除率为69.27%,而CH-0、CH-I与CH-II则显示了负清除作用。纯化方法对罗非鱼下脚料蛋白酶解物锌螯合盐的理化特性有影响。

关键词: 尼罗罗非鱼下脚料; 酶解物; 锌螯合盐; 纯化; 抗氧化

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

我国罗非鱼产量2012年达144.1万t,约占当年世界总产量的40%,居第一位^[1]。目前罗非鱼主要加工为冷冻鱼片,在加工过程中会产生大量的罗非鱼下脚料包括鱼头、鱼鳞、鱼骨、鱼皮等,约占总重量的45%~55%。数量庞大的罗非鱼下脚料缺乏高值化利用的有效途径,是制约罗非鱼养殖与加工业进一步发展的主要原因之一。如何充分利用罗非鱼下脚料,国内很多研究者开展了大量的工作,其中以蛋白酶水解利用下脚料蛋白研究最多^[2-3]。金属离子与多肽螯合之后,其稳定性、吸收利用率及生物活性提高^[4-5]。国内有关肽或氨基酸螯合物的研究报告不少,主要有螯合物的制备工艺与结构特征研究^[6-7]、体外活性研究^[8-9]、体内生物活性研究^[10-11],而关于螯

物的分离纯化的报道不多。据报道将螯合物与未螯合的金属离子、肽或氨基酸分开的方法一是乙醇沉淀法,杨燊等^[12]采用不同浓度乙醇沉淀得到3种鱼蛋白多肽钙螯合物,发现它们的钙含量、抗氧化和抗菌活性都不相同;二是透析法,Bao等^[7]采用500 u截留限的透析袋分离得到2种大豆蛋白多肽钙螯合物并分析了它们的钙含量以及螯合肽的分子量,但分离方法对螯合物理化特性的影响未见报道。本实验室研究了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)下脚料蛋白酶解物锌螯合盐的制备工艺^[13-14]及其乙醇纯化与透析纯化组分的理化性质及清除自由基的活性,旨在为多肽螯合盐的研究提供基础数据,为罗非鱼下脚料的综合利用提供新途径。

收稿日期:2014-10-21 修回日期:2014-12-15

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2013AA102201);广东省高校重大科研项目培育计划(2014KZDXM039);省部产学研合作专项(2013B090800021)

通信作者:洪鹏志,E-mail:hongpengzhi@126.com

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

EH10K:罗非鱼下脚料蛋白酶解液经 10 ku 超滤的透过液,称为未螯合酶解蛋白;CH-0:未经纯化的锌螯合盐;CH-I:95%乙醇一次纯化的锌螯合盐;CH-II:透析纯化的锌螯合盐,均为冻干粉。 α -脱氧核糖,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),谷胱甘肽(GSH),标准品 Gly-Gly-Gly(189 u),杆菌肽(bacitracin 1 243 u),牛胰岛素(insulin from bovine pancreas 5 733 u),细胞色素 C(Cytochrome C 12 327 u)均购于 Sigma 公司。透析袋(截留分子量:100~500 u),美国光谱医学产品。

Mini pellicon 超滤器与膜包(美国 Minipore 公司),N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),FDU-1100 冷冻干燥机(日本东京理化器械株式会社),UV-2102 紫外-可见分光光度计(上海尤尼科仪器厂),原子吸收分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 罗非鱼下脚料蛋白酶解液锌螯合盐的制备与纯化

按照文献[13-14]制备罗非鱼下脚料蛋白酶解液锌螯合盐,参考陈亚房^[15]的方法采用 95%乙醇沉淀对锌螯合盐进行纯化。参考 Bao 等^[7]的方法采用透析法对锌螯合盐进行纯化。

1.3 锌螯合盐及其纯化组分的理化性质分析

锌离子含量测定 原子吸收法^[16]。

蛋白质 微量凯氏定氮法^[16]。

水分 直接干燥法^[16]。

氨基酸组成分析 氨基酸仪分析法^[17]。

锌螯合盐及其纯化组分的凝胶层析分析利用 Sephadex G-25(3.0 cm × 60 cm)层析柱分析,以蒸馏水作为洗脱液,洗脱流速为 0.8 mL/min,每管收集 4 min;分子量标准品是甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸、杆菌肽、牛胰岛素和细胞色素 C,根据洗脱体积(x)和分子量(M)大小的对数作分子量标准线性回归方程:

$$\text{Lg}M = -0.024x + 6.8848 (R^2 = 0.9857)$$

样品的分子量根据其洗脱体积和标准曲线求得。

1.4 锌螯合盐及其纯化组分的抗氧化活性

对羟基自由基清除能力 参考 Halliwell 等^[18]采用脱氧核糖法测定。

对 DPPH 自由基清除能力 参考 Shimada 等^[19]的方法。

对超氧阴离子自由基的清除能力 参考 Marklund 等^[20]采用邻苯三酚自氧化体系测定。

2 结果与分析

2.1 锌螯合盐及纯化组分的紫外光谱特性分析

在螯合物中,过渡金属离子会吸收可见或紫外区的某一部分波长的光而发生跃迁,配合体内部也可能因吸收可见或紫外区的光而发生电子的跃迁。形成新物质时中央离子与配位体的键合使配位体内部有关轨道的能量改变,因此新物质中的配合体内部电子的跃迁与游离配位体内部电子的跃迁时要求的能量不相同,即吸收光的波长或者峰形不相同^[21]。CH-0、CH-I 和 CH-II 在波长 250~300 nm 处,吸收峰发生明显变化,不同于 EH10K,形成了新的吸收峰,表明有新物质产生,证实 EH10K 与锌离子可能发生了螯合反应,其中 CH-II 与 CH-I 相比,吸收峰的变化更明显(图 1)。

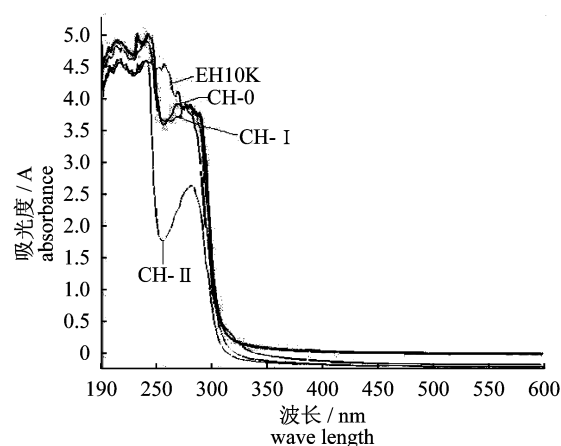


图 1 锌螯合盐及纯化组分的紫外光谱
Fig.1 The ultraviolet spectrogram of zinc chelating salts and its purified components

2.2 锌螯合盐及纯化组分的主要成分

锌螯合盐及其纯化组分蛋白质含量均在 70% 以上,其中透析纯化的 CH-II 粗蛋白质含量最高,为 78.83%,比乙醇纯化的 CH-I 高 3.81%,比未纯化的 CH-0 高 9.70%;锌离子含量在 12%~16% 之间,乙醇和透析纯化后的 CH-I、CH-II 锌离子含量较 CH-0 有所降低,分别是 CH-0 的 90.11% 与 75.87%;其他(主要是灰分与脂肪)物质含量由 CH-0 的 12.06% 减少到 CH-II 的

8.97% (表 1)。说明纯化方式影响纯化组分主要成分含量,纯化可以去掉未整合的锌离子及其他

杂质,从而使纯化品蛋白质含量增加,锌含量减少。

表 1 锌整合盐及纯化组分的成分分析(干基)

成分 component	EH10K	CH-0	CH- I	CH- II
粗蛋白质 crude protein	87.30 ± 0.46	71.86 ± 0.14	75.94 ± 0.18	78.83 ± 0.27
锌离子 zinc ion		16.08 ± 0.25	14.49 ± 0.38	12.20 ± 0.17
其他 others	13.70	12.06	9.57	8.97

2.3 锌整合盐及纯化组分的凝胶层析分析

EH10K 在 43、53 管出峰;CH-0 在 38、43、53、59 以及 62 管出峰;CH- I 在 38、43、53 以及 62 管出峰;CH- II 在 38、43 与 53 管出峰(图 2)。可见 CH-0、CH- I 和 CH- II 均在 38、43、53 管处(即 9 245、3 753、741 u)出现了吸收峰。EH10K 与锌发生整合反应后,呈现出了较多的吸收峰(图 2-b),纯化后的 CH- I 与 CH- II 吸收峰较 CH-0 有

所减少,这说明纯化去除了游离氨基酸或小肽等杂质。同时,CH- II 与 CH- I 相比,在 60 管后未出峰,可能透析去除游离氨基酸或小肽更为彻底。根据回归方程计算得到 CH- II 主要分子量分布:大于 9 245 u 的占 10.03%,5 383 ~ 9 245 u 的占 21.45%,1 272 ~ 5 383 u 的占 51.67%,189 ~ 1 272 u 的占 15.36%,也就是说 CH- II 中 5 000 u 以下的寡肽约占 67%。

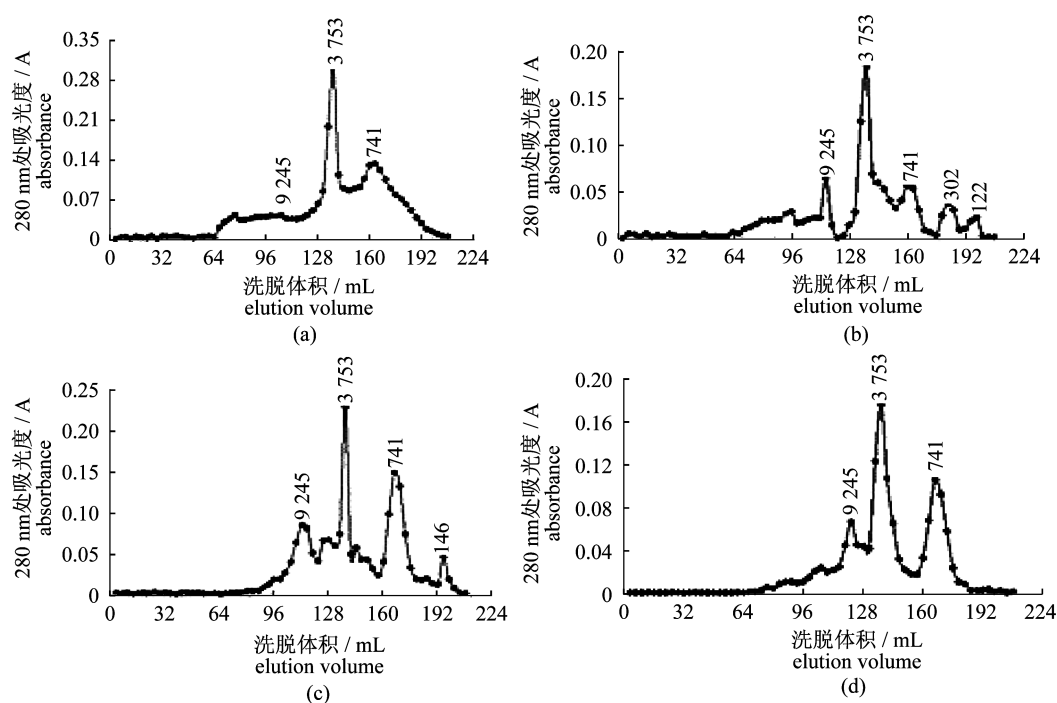


图 2 整合盐及纯化组分的层析图(a-EH10K;b-CH-0;c-CH- I ;d-CH- II)

Fig.2 The chromatographic profile of zinc chelating salts and its purified components

2.4 锌整合盐及纯化组分氨基酸组成分析

实验共检测了 16 种氨基酸的含量,由表 2 可知,以干基计,CH- II 的氨基酸总量最高,且高于 EH10K,为 67.45%,CH-0 与 CH- I 的氨基酸总量相仿且低于 EH10K。比较 EH10K 及其锌整合盐的氨基酸含量,发现 CH- II 中必需氨基酸 Met、

Leu、Ile 和 Phe 的含量高于 CH- I,而与 EH10K 和 CH-0 相近,说明这些氨基酸在乙醇纯化中容易丢失;CH- II 中的 Asp、Glu、Gly、Lys、Arg 和 His 的含量均高于 CH- I,且两者都高于 CH-0 而与 EH10K 相近,说明这些氨基酸更容易存在整合盐中。Lu 等^[22]在大豆蛋白铁螯合肽、Torres 等^[23]

在鸡肉蛋白螯合肽的研究中均发现螯合肽富含 Asp、Glu、Arg 和 His。EH10K 中,必需氨基酸占总氨基酸的 34.79% (不含色氨酸),支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)占总氨基酸的 16.00%;CH-0、CH-I 和 CH-II 必需氨基酸占总氨基酸比例分别为 34.45%、29.19% 和 33.24%,支链氨基酸占必需氨基酸的比例分别为 15.87%、11.97% 和 15.00%。可见,与透析相比,乙醇纯化中必需氨基酸与支链氨基酸损失较大。

2.5 锌螯合盐及纯化组分清除自由基的能力

清除羟基自由基 EH10K、CH-0、CH-I 以及 CH-II 对羟基自由基的清除能力均随着浓度的增大而逐渐增强(表 3), IC_{50} 相应的浓度分别为 9.34、9.08、8.27 和 6.90 mg/mL,清除能力大小顺序为 CH-II > CH-I > CH-0 > EH10K,且 6.00 mg/mL 的 EH10K、CH-0、CH-I 及 4.00 mg/mL 的 CH-II 的清除能力与 4.00 mg/mL GSH 的相当。可见 EH10K 及其螯合盐对羟基自由基有一定的清除效果,螯合盐 CH-0 比未螯合的 EH10K 清除能力提高了 2.78%,纯化后的螯合盐 CH-I、CH-II 比未纯化的分别提高了 8.92% 和 24.01%。

表 2 锌螯合盐及纯化组分的氨基酸组成(干基)

Tab.2 Amino acid composition and content analysis of zinc chelating salts and its purified components (dry basis) %

氨基酸 amino acid	EH10K	CH-0	CH-I	CH-II
天冬氨酸 Asp	6.21	5.41	6.18	6.67
苏氨酸 Thr	3.00	2.63	2.59	3.00
丝氨酸 Ser	2.84	2.38	2.51	2.62
谷氨酸 Glu	9.56	8.54	9.42	10.32
甘氨酸 Gly	7.14	6.58	7.15	7.46
丙氨酸 Ala	5.93	5.43	5.38	5.97
缬氨酸 Val	3.17	2.75	2.25	3.21
蛋氨酸 Met	1.65	1.44	0.71	1.44
异亮氨酸 Ile	2.69	2.37	1.80	2.70
亮氨酸 Leu	4.69	4.18	2.89	4.21
酪氨酸 Tyr	1.56	1.35	1.20	1.46
苯丙氨酸 Phe	2.60	2.24	1.67	2.18
组氨酸 His	1.24	0.98	1.10	1.23
赖氨酸 Lys	5.15	4.57	5.03	5.69
精氨酸 Arg	4.46	4.02	4.58	4.90
脯氨酸 Pro	4.05	3.72	3.58	4.39
氨基酸总量 total amino acid	65.92	58.57	58.03	67.45

表 3 锌螯合盐及纯化组分对羟基自由基的清除率

Tab.3 Hydroxyl radical scavenging activity of zinc chelating salts and its purified components %

浓度/(mg/mL) concentration	羟基自由基清除率 hydroxyl radical scavenging rate				
	GSH	EH10K	CH-0	CH-I	CH-II
4.00		34.96 ± 0.74	44.73 ± 0.96	36.75 ± 0.38	40.78 ± 0.97
6.00		41.92 ± 0.82	42.30 ± 0.37	44.84 ± 0.98	49.14 ± 0.98
8.00		47.17 ± 0.55	46.97 ± 0.30	50.51 ± 0.19	54.06 ± 0.53
10.00		53.57 ± 0.66	53.58 ± 0.41	54.43 ± 0.02	57.59 ± 0.48
12.00		55.16 ± 0.63	56.98 ± 0.09	59.75 ± 0.17	59.64 ± 0.93
0.25	23.05 ± 0.33				
0.50	24.25 ± 0.21				
1.00	28.64 ± 0.41				
2.00	32.26 ± 0.53				
4.00	40.47 ± 0.12				

清除 DPPH 自由基 随着浓度的提高, EH10K、CH-0、CH-I 以及 CH-II 对 DPPH 自由基清除率逐渐增大(表 4),当浓度为 12.00 mg/mL 时,CH-I 和 CH-II 的清除率均超过了 90%,明显高于 EH10K 和 CH-0。 IC_{50} 值表明, EH10K、CH-0、CH-I 和 CH-II 对应的浓度分别为 6.79、6.07、3.76 和 3.27 mg/mL,相当于 0.10 mg/mL GSH 的清除能力。同样可见,螯合盐 CH-0 比未螯合

的 EH10K 清除能力提高了 10.60%,纯化后的螯合盐 CH-I、CH-II 比未纯化的清除能力分别提高了 38.06% 和 46.13%,而且透析纯化的 CH-II 清除能力提高更为明显。汪学荣等^[24] 也发现猪血多肽亚铁螯合盐比猪血多肽的自由基清除活性高。

清除超氧阴离子自由基 EH10K 有较好的超氧阴离子自由基清除能力,当浓度由 2.00

mg/mL 增加到 10.00 mg/mL 时,其清除率近线性增加,最高为 69.27% (图 3)。然而整合盐 CH-0 及其纯化组分 CH- I 以及 CH- II 在低浓度下有一定的超氧阴离子自由基清除能力,但随着浓度的提高,出现负清除作用,且浓度大于 6.00 mg/mL 时,CH-0、CH- I 比 CH- II 的负清除作用更明

显。这可能是由于整合盐中有游离态的锌或者螯合态的锌在一定条件下被释放出来,而游离的锌对体系有催化氧化作用。郭延熙等^[25]研究脱脂米糠蛋白酶解物、韩华等^[26]研究羊栖菜 (*Sargassum fusiforme*) 提取物对超氧阴离子自由基清除能力时均发现有同样结果。

表 4 锌整合盐及纯化组分对 DPPH 的清除率

Tab. 4 DPPH radical scavenging activity of zinc chelating salts and its purified components %

浓度/(mg/mL) concentration	DPPH 自由基清除率 DPPH scavenging rate				
	GSH	EH10K	CH-0	CH- I	CH- II
4.00		35.70 ± 0.72	34.87 ± 0.45	47.43 ± 0.50	55.19 ± 0.99
6.00		46.92 ± 0.19	51.67 ± 0.34	64.36 ± 0.72	73.65 ± 0.96
8.00		58.97 ± 0.95	64.49 ± 0.40	78.21 ± 0.91	85.90 ± 0.73
10.00		69.81 ± 0.90	78.01 ± 0.59	86.99 ± 0.23	91.09 ± 0.17
12.00		72.82 ± 0.44	84.36 ± 0.62	92.12 ± 0.26	92.66 ± 0.25
0.01	10.38 ± 0.89				
0.05	20.19 ± 0.22				
0.10	50.45 ± 0.65				
0.20	75.00 ± 0.44				
0.50	95.90 ± 0.06				

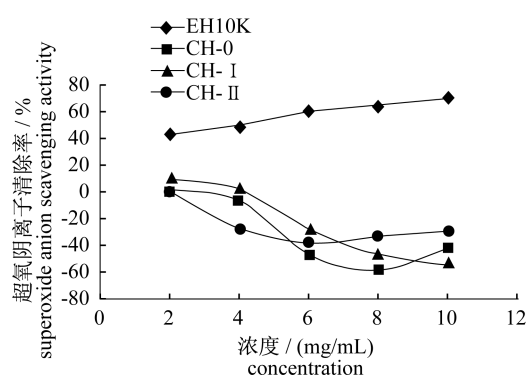


图 3 锌整合盐及纯化组分对超氧阴离子自由基的清除率

Fig. 3 Superoxide radical scavenging activity of zinc chelating salts and its purified components

3 结论

本研究结果显示,纯化方法影响罗非鱼下脚料蛋白酶解物锌整合盐的理化特性及其自由基清除活性。紫外吸收光谱表明罗非鱼下脚料蛋白酶解物与锌形成了螯合盐;乙醇纯化组分 CH- I 和透析纯化组分 CH- II 的蛋白质含量比未纯化组分 CH-0 的 71.86% 高 5.68% 与 9.70%, 锌含量比 CH-0 的 16.08% 低 9.82% 与 24.13%; 凝胶层析分析结果表明 CH- I 、CH- II 与 CH-0 相比,有 3

个相同的主吸收峰,但大分子与小分子杂峰减少;氨基酸分析结果表明,CH- II 中的 Asp、Glu、Gly、Lys、Arg 和 His 的含量均高于 CH- I,且前两者都高于 CH-0,与透析纯化相比,乙醇纯化必需氨基酸与支链氨基酸损失较大。CH-0、CH- I 和 CH- II 对羟基自由基与 DPPH 自由基的清除率随浓度增强而增强,以 IC_{50} 值计,CH- I 、CH- II 比 CH-0 的清除能力分别提高了 8.92%、24.01% 与 38.06%、46.13%。罗非鱼下脚料蛋白酶解物 EH10K 有较好的超氧阴离子自由基清除能力,浓度为 10.00 mg/mL 时清除率为 69.27%,CH-0、CH- I 与 CH- II 则显示了负清除作用。从减少氨基酸损失与提高自由基清除能力方面考虑,透析法比较适合罗非鱼下脚料蛋白酶解物锌整合盐的纯化,从产业化方面考虑,透析可用纳滤替代,相比乙醇沉淀法,操作简单易行,又无需耗费大量的乙醇,更有优势。

参考文献:

- [1] Cui H, Xiao L. Development of production and trading of tilapia in 2012 and Prospect in 2013 of China[J]. China Fisheries, 2013(1): 36 - 37. [崔和,肖乐. 2012 年我国罗非鱼生产与贸易状况及 2013 年展望. 中国水产, 2013(1): 36 - 37.]

- [2] Yang P, Xia Y J, Fan W Q. Enzymatic hydrolysis of protein from tilapia scraps using papain[J]. Fisheries Science, 2008, 27(6): 290 - 292. [杨萍, 夏永军, 范伟群. 木瓜蛋白酶对罗非鱼下脚料的水解作用[J]. 水产科学, 2008, 27(6): 290 - 292.]
- [3] Zhang Z, Yang X Q, Ma H X. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Waste by Plackett-Burman Design and Central Composite Design[J]. Food Science, 2011, 32(18): 1 - 5. [张桢, 杨贤庆, 马海霞. Plackett-Burman 法和中心组合法优化罗非鱼下脚料酶解工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 1 - 5.]
- [4] Miquel E, Farre R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability[J]. Trends in Food Science and Technology, 2007, 18(3): 139 - 143.
- [5] Xie J, Li Z J. Theoretical innovation on calcium reinforcement-combination of collagen polypeptide and calcium[J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 30(1): 69 - 71. [谢静, 李宗军. 补钙理论创新—胶原多肽与钙结合物. 国际中医中药杂志, 2008, 30(1): 69 - 71.]
- [6] Lu J F, Meng C W, Li J, et al. Preparation and characterization of collagen polypeptide chelated calcium from fish bone powder of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 314 - 320. [陆剑锋, 孟昌伟, 李进, 等. 斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽螯合钙的制备及其特征. 水产学报, 2012, 36(2): 314 - 320.]
- [7] Bao X L, Lv Y, Yang B C, et al. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): 117 - 121.
- [8] Huo J C, Deng S G, Xie C, et al. Study on compound enzymic peptides iron from hairtail off-chuts and its activity of antioxidation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(4): 267 - 270. [霍健聪, 邓尚贵, 谢超. 带鱼下脚料蛋白多肽亚铁螯合物的制备及抗氧化活性研究. 食品工业科技, 2009, 30(4): 267 - 270.]
- [9] Zhang L, Li J, Zhou K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2084 - 2089.
- [10] Yang J, Zhao H L, Xu S F, et al. Antioxidant and zinc supplementation effect of zinc chelating small peptides from fish protein in mice [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(4): 516 - 520. [杨杰, 赵洪雷, 徐淑芬, 等. 鱼蛋白小肽螯合锌对小鼠的补锌效果及抗氧化作用. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 516 - 520.]
- [11] Carlson M S, Boren C A, Wu C, et al. Evaluation of various inclusion rate of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs [J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(5): 1359 - 1366.
- [12] Yang S, Deng S G, Qin X M. Study on synthesis of peptides calcium chelation from low-value fish and antioxidation and antibacterial activities [J]. Food Science, 2008, 29(1): 202 - 206. [杨燊, 邓尚贵, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究. 食品科学, 2008, 29(1): 202 - 206.]
- [13] Li T G, Chen K J, Hong P Z, et al. Study on preparation of multiple-enzyme hydrolysate of tilapia scraps chelating with zinc [J]. Packaging and Food Machinery 2013, 31(3): 13 - 17. [李同刚, 陈康健, 洪鹏志, 等. 罗非鱼下脚料复合酶水解物锌螯合盐的制备. 包装与食品机械, 2013, 31(3): 13 - 17.]
- [14] Li T G, Hong P Z, Yang P, et al. Optimization of echnological conditions of ilapia scraps enzymatic hydrolysates chelated with zinc by quadratic regression orthogonal rotary [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(2): 234 - 237. [李同刚, 洪鹏志, 杨萍, 等. 二次回归正交旋转组合优化罗非鱼下脚料酶解液螯合锌的工艺条件. 食品工业科技, 2013, 34(2): 234 - 237.]
- [15] Chen Y F. Study on preparation of soy oligo-peptide, function of ACE inhibitory activity and metal-chelate [D]. Beijing: China academy of agricultural science, 2009. [陈亚房. 大豆低聚肽制备及其 ACE 抑制活性和螯合特性的研究. 北京: 中国农业科学院, 2009.]
- [16] Wang Z T. Methods of food hygienic analysis (physical and chemical section I) [M]. Beijing: Standards Press of China, 2012. [王竹天. 食品卫生检验方法(理化部分 1). 北京: 中国标准出版社, 2012.]
- [17] Wang Z T. Methods of food hygienic analysis (physical and chemical section II) [M]. Beijing: Standards Press of China, 2012. [王竹天. 食品卫生检验方法(理化部分 2). 北京: 中国标准出版社, 2012.]
- [18] Halliwell B, Gutteridge J M, Aruoma O I. The

- deoxyribose method: A simple of “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions hydroxyl radicals[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 165(1):215 – 219.
- [19] Shimada K, Fujikawa K, Tahara K, *et al.* Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(6):945 – 948.
- [20] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3):469 – 474.
- [21] Guan H Y. Study on synthesis and characterization of chelate of glycine with trace element [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. [管海跃. 甘氨酸微量元素螯合物的合成与表征研究. 杭州:浙江大学, 2007.]
- [22] Lu Y, Liu Q, Bao X, *et al.* Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺ [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(11):4593 – 4597.
- [23] Torres F C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2):485 – 490.
- [24] Wang X R, Peng X W, Kan J Q. Study on antioxidant activity of chelated pig blood polypeptide ferrite in vitro [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(10):135 – 138. [汪学荣, 彭祥伟, 阚建全. 猪血多肽亚铁螯合盐的体外抗氧化作用研究. *食品工业科技*, 2011, 32(10):135 – 138.]
- [25] Guo Y X, Lin Q L, Wu W. Study on antioxidant properties of defatted rice bran protein by enzymatic hydrolysis [J]. *Cereals & Oils*, 2012(10):15 – 19. [郭延熙, 林亲录, 吴伟. 酶法水解脱脂米糠蛋白抗氧化性质研究. *粮食与油脂*, 2012(10):15 – 19.]
- [26] Han H, Zhan S M, Shan L G, *et al.* Studies on the free radical scavenging activity of bioactive substances from *Sargassum fusiforme* [J]. *China Journal Marine Drugs*, 2008, 27(8):31 – 34. [韩华, 战松梅, 单联刚, 等. 羊栖菜中清除自由基活性物质的研究. *中国海洋药物*, 2008, 27(8):31 – 34.]

Physicochemical properties of zinc chelating purified components by different method of tilapia scraps protein hydrolysate

YANG Ping, LI Tonggang, SHE Chunxia, HONG Pengzhi*, ZHOU Chunxia

(Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution,
College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Tilapia scraps were hydrolyzed by neutral protease and flavourzyme, and the hydrolysate was fractionated through ultrafiltration membranes with a range of molecular weight cutoffs (MWCO) of 10 ku, to yield the fraction EH10K with MW distribution < 10 ku. The zinc chelating salts (CH-0) was produced by EH10K chelating with ZnSO₄. CH- I and CH- II were the purified components from CH-0 by using 95% ethanol and dialysis (FW = 500 u) respectively. The formation of Zn²⁺ chelating salts of hydrolysate was confirmed by the UV-VIS spectra. The physicochemical properties of CH-0, CH- I and CH- II were analysed and their free radical scavenging activities were evaluated also. The results showed that CH-0 contained 71.86% of protein (on dry basis), 16.08% of Zn, CH- I and CH- II were 75.94% and 14.49%, 78.83% and 12.20% respectively. The gel chromatography results showed that CH- I and CH- II had three same main absorption peaks compared to CH-0 but had little impurity peaks. The contents of Asp, Glu, Gly, Lys, Arg and His in CH- II were high than those of CH- I, and all were high than those of CH-0. The content of essential amino acid and branched chain amino acid in CH- II were high than that in CH- I. CH-0, CH- I and CH- II showed evident radical scavenging activity in a dose-dependent manner with the IC₅₀ values for hydroxyl radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical being 9.08 and 6.07, 8.27 and 3.76, 6.90 and 3.27 mg/mL respectively. The superoxide radical scavenging activity of EH10K was 69.27% at 10.00 mg/mL, CH-0, CH- I and CH- II showed no effect on superoxide radical scavenging but to promote the oxidation.

Key words: tilapia scraps; enzymatic hydrolysate; zinc chelating salts; purification; antioxidation

Corresponding author: HONG Pengzhi. E-mail: hongpengzhi@126.com