

# 罗非鱼骨胶原钙螯合肽的酶解制备

廖婉雯<sup>1,2</sup>, 苗建银<sup>1,2</sup>, 陈雨馨<sup>1</sup>, 康梦<sup>3</sup>, 刘善学<sup>4</sup>, 余招龙<sup>5</sup>, 曹庸<sup>1,2</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

(3. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (4. 茂名新洲海产有限公司, 广东茂名 525400)

(5. 广东冠利达海洋生物有限责任公司, 广东茂名 525400)

**摘要:** 本研究以罗非鱼骨胶原蛋白为原料酶解制备具有良好钙螯合能力的活性肽。以钙螯合活性为指标, 将罗非鱼骨架经过脱肉、脱钙等前处理获得的罗非鱼骨胶原蛋白通过木瓜蛋白酶酶解制备得到罗非鱼骨胶原蛋白肽, 通过单因素及正交试验对制备罗非鱼骨胶原螯合肽的酶解工艺进行优化。同时对最优条件下酶解获得的罗非鱼骨胶原钙螯合肽的分子量及氨基酸组成进行分析。结果表明, 最优酶解工艺条件为: 酶解时间 4.5 h, pH 6.5, 酶解温度 62 ℃, 酶底比 0.6%。罗非鱼骨胶原钙螯合肽是一类小分子功能活性肽。同时通过对比罗非鱼骨胶原钙螯合肽及其钙-肽螯合物氨基酸组成, 发现胱氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸和赖氨酸等氨基酸对活性肽的钙螯合能力起到重要作用。

**关键词:** 罗非鱼骨; 酶解; 钙螯合肽; 钙-肽螯合物; 分子量分布; 氨基酸组成

文章编号: 1673-9078(2019)01-129-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.019

## Preparation of Tilapia Bone Collagen Calcium Chelating Peptides by Enzymatic Hydrolysis

LIAO Wan-wen<sup>1,2</sup>, MIAO Jian-yin<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-xing<sup>1</sup>, KANG Meng<sup>3</sup>, LIU Shan-xue<sup>4</sup>, YU Zhao-long<sup>5</sup>, CAO Yong<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Province

Engineering Research Center for Bioactive Natural Products, Guangzhou 510642, China) (3. Food College of Northeastern

Agricultural University, Harbin 150030, China) (4. Maoming Xinzhou Marine Products Co., Ltd., Maoming 525400, China)

(5. Guangdong Guanli Marine Biological Co. Ltd., Maoming 525400, China)

**Abstract:** The purpose of this paper was to prepare collagen peptides with calcium-chelating ability from tilapia fish bone. Bone collagen was used as experimental material after pre-meal including removing meat from the skeleton and decalcification. With calcium chelation activity as the index, papain was selected as the acting enzyme. The single factor and orthogonal test were employed to optimize the enzymolysis process of preparation of tilapia bone collagen. The Tilapia calcium chelating peptide, obtained by enzymatic hydrolysis under optimal conditions, was used as the target for the determination of their molecular weight and amino acid composition. The results showed that the optimum enzymolysis process conditions were as follows: Enzymolysis time (4.5 h), pH (6.5), enzymolysis temperature (62 ℃), enzyme to substrate ratio (0.6%). Tilapia bone collagen calcium chelating peptide was a kind of function substance composed of small molecular peptides; By comparing the amino acid composition of tilapia bone collagen calcium chelating peptide and its calcium-peptide chelated, it is found that amino acids such as cystine, aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine and lysine played an important role in the calcium chelating capacity of the active peptide.

**Key words:** Tilapia bone; enzymolysis; calcium chelating peptide; molecular weight distribution; amino acid composition

罗非鱼又名非洲鲫鱼, 具有生长快、繁殖力强、食性杂、病害少、抗病力强等特点, 是联合国粮食及  
收稿日期: 2018-08-28

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2016A030310442); 国家自然科学基金资助项目 (31601474); 广州市科技计划资助项目 (201707010415)

作者简介: 廖婉雯 (1994-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性物及食品功能成分

农业组织向世界各国推广养殖的鱼类之一, 被称为“21世纪之鱼”。我国的罗非鱼养殖产量和出口量居世界首位<sup>[1]</sup>。罗非鱼骨在加工过程中产生大量的鱼骨、鱼皮和鱼鳞等富含胶原蛋白的加工副产物, 约占全鱼重 65%。其中, 每加工 30 万吨罗非鱼, 约可得到 4.29 万吨鱼骨<sup>[2]</sup>。鱼骨含有丰富的胶原蛋白 (约 30%<sup>[2]</sup>) 以及钙元素 (含钙量达 26.95%<sup>[3]</sup>), 是良好的蛋白源和钙源<sup>[4]</sup>。近些年来, 鱼骨胶原蛋白已经获得国内外

学者的广泛关注<sup>[5]</sup>。

钙是人体含量最多的矿物质,对人体生理健康的维持起着至关重要的作用。由于我国居民的膳食结构存在缺陷,国人缺钙现象尤为严重。因而开发易于被人体吸收的补钙剂是当务之急。根据人体的钙代谢机理,可以将目前的钙制剂分成两大类:离子钙和分子钙<sup>[6]</sup>。离子钙是指传统的补钙剂,此类补钙剂被人体摄入后,在消化道系统内转变为钙离子再参与钙的吸收过程,如:碳酸钙、羟基磷酸钙、乳酸钙、柠檬酸钙等。而分子钙则无需在消化系统内解离出钙离子,而是以分子的形式被肠道吸收。此类补钙剂有:氨基酸螯合钙<sup>[7]</sup>、酪蛋白磷酸肽<sup>[8]</sup>、胶原蛋白螯合钙<sup>[9]</sup>等。

本实验以罗非鱼加工的下脚料鱼排为原料制备罗非鱼骨胶原钙螯合肽为目的,通过单因素实验及正交实验获得最优的酶解工艺条件,以充分提高罗非鱼骨胶原蛋白的利用率。随后,对最优工艺条件酶解出的罗非鱼骨胶原螯合肽的分子量分布进行分析,同时对罗非鱼骨胶原螯合肽及其与钙螯合后所得的钙-肽螯合物进行氨基酸组成分析。本研究将大大提高罗非鱼加工副产物的附加值,所得钙螯合肽在补钙方面兼具补钙和补充骨胶原的优势,具有重要的应用价值和社会经济效益。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料试剂与仪器

#### 1.1.1 原料

罗非鱼工厂加工后剩余下脚料,去头、尾、鳍,取骨架切段,用0.5%中性蛋白酶酶解脱肉2h(55℃,pH为7.5),在0.1 mol/L NaOH溶液中搅拌24h除杂蛋白,用自来水清洗至中性,后置于10% EDTA-2Na(pH为7.2, W/V=1:10)中4℃下搅拌脱钙处理5d,待鱼骨呈透明状,洗净,4%的盐酸处理18h后得到柔软有韧性的罗非鱼骨胶原蛋白,-20℃下保存备用。

#### 1.1.2 试剂

木瓜蛋白酶(酶活力 $6 \times 10^4$  U/mL),南宁庞博生物工程有限公司;胰蛋白酶(酶活力 $1.3 \times 10^6$  U/g)、碱性蛋白酶(酶活力 $5.7 \times 10^4$  U/mL)、中性蛋白酶(酶活力 $3.13 \times 10^4$  U/mL),诺维信(中国)生物技术有限公司;邻甲酚络合剂,山东西亚化工有限公司;8-羟基喹啉,天津大茂化学试剂厂;其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.3 主要仪器设备

数显恒温水浴锅:型号HH-4,金坛市华城海龙实验仪器厂;多管架自动平衡离心机:型号L530,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;电子天平:型号

AL104,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;pH计,赛多利斯科学北京有限公司;多功能酶标仪:型号2300,PerkinElmer;微量振荡器:型号MH-2,海门其林贝尔仪器制造有限公司;冷冻干燥机:Modulyo系列,Thermo Fisher;梯度高效液相色谱仪:型号LC-1000T,深圳德谱仪器有限公司;全自动氨基酸分析仪:型号S-433D,SKYAM。

## 1.2 方法

### 1.2.1 钙螯合活性肽的酶法制备及工艺优化

#### 1.2.1.1 工艺流程

称取一定量脱钙后的鱼骨胶原蛋白→按一定料液比加入蒸馏水→调pH至特定的pH→按照不同酶底比加入蛋白酶→在水浴锅中酶解反应→沸水浴10min灭酶→4000 r/min离心20min→取上清液进行冷冻干燥→鱼骨胶原蛋白肽冻干粉

#### 1.2.1.2 最优酶解作用酶类的选择

胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶是酶解胶原蛋白的常用酶。根据厂家提供的不同酶类的理论最适酶解工艺条件,对罗非鱼骨胶原蛋白作酶解处理,并对其酶解产物进行钙螯合活性测定,由此选出最优酶解作用酶。各蛋白酶的理論最适酶解工艺条件如下表1:

表1 四种酶的理论最适酶解条件

Table 1 The theoretical optimum conditions for enzymolysis of the four enzymes

酶种类	因素			
	pH	温度/℃	酶底比/%	时间/h
胰蛋白酶	8.0	37	1	7
碱性蛋白酶	8.0	50	1	7
中性蛋白酶	7.0	50	1	7
木瓜蛋白酶	7.0	60	1	7

#### 1.2.1.3 单因素实验

选用木瓜蛋白酶作为工具酶,其理论最优酶解条件为:pH为7.0,温度60℃,酶底比1%。在其基础上分别调节酶解时间(1、2、3、4、5、6、7h)、pH(6.0、6.5、7.0、7.5)、温度(45、50、55、60、65℃)、酶底比(0.3%、0.5%、1.0%、1.5%)进行单因素实验。

#### 1.2.1.4 正交实验优化

表2 正交实验设计表

Table 2 Factors and levels in L9 (3<sup>4</sup>) orthogonal array design

水平	因素			
	A 时间/h	B pH	C 温度/℃	D 酶底比/%
1	3.5	5.5	58	0.4
2	4	6.0	60	0.5
3	4.5	6.5	62	0.6

在单因素实验的基础上,以酶解时间、pH、温度、酶底比为影响因素,各取3个水平值,以多肽的钙螯合活性为指标确定罗非鱼骨胶原肽的最佳酶解工艺,实验因素及水平见表2。

## 1.2.2. 钙螯合活性肽的螯合活性测定

### 1.2.2.1 配制贮备试剂

0.5 mol/L HCl 溶液; 10 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液; 200 mM 磷酸氢二钠溶液; 200 mM 磷酸二氢钠溶液; 200 mM 磷酸缓冲液; 乙醇胺-硼酸盐缓冲液; 邻-甲酚酞溶液 (40.0 mg 邻甲酚酞络合剂于 50 mL 棕色容量瓶中,加 12.5 mL 蒸馏水, 0.2 mL KOH (1 M), 摇晃至完全溶解, 加 37.5 mL 蒸馏水定容, 加 0.25 mL 冰乙酸, 混匀, 在室温下稳定两个月); 8-羟基喹啉溶液 (2.5 g 8-羟基喹啉于 50 mL 棕色容量瓶中, 加 95% 乙醇定容, 在 4 °C 下稳定两周); 1000 μg/mL 贮备钙标准液。

### 1.2.2.2 制备钙-肽螯合物

将冻干粉样品与 10 mM CaCl<sub>2</sub>、200 mM 磷酸盐缓冲液混合于 10 mL 离心管中 (终浓度分别为: 待测样品浓度 500 mg/L, 5 mM 的 CaCl<sub>2</sub> 和 100 mM 的磷酸钠缓冲液, pH 为 7.8), 置于 37 °C 水浴锅中反应 120 min, 持续振荡。配平后置于离心机中 4000 r/min 离心 20 min, 上清液即为钙-肽螯合物溶液。将此上清液冷冻干燥即得肽钙螯合物干粉。

### 1.2.2.3 测定螯合活性

参照文献<sup>[10-12]</sup>所述方法, 取 1.2.2.1 钙-肽螯合上清液 250 μL 至 25 mL 容量瓶中定容, 制得样品稀释液。用钙贮备液稀释 400 倍成 0.25 μg/mL 标准钙工作液, 并分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于不同的 4 mL 离心管中, 分别再加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mL 一级水补足至 1 mL, 摇匀, 配制成钙标准液, 用于钙标准曲线的制作。取 6 mL 乙醇胺-硼酸盐缓冲液, 1.8 mL 的 8-羟基喹啉贮备液, 6 mL 邻-甲酚酞溶液定容于 100 mL 容量瓶中, 制得工作显色液。

吸取 30 μL 标准钙工作液或样品稀释液至 96 孔板中, 再分别在相应孔中加 150 μL 的工作显色液。将 96 孔板置于微量振荡器上摇匀后, 用酶标仪测定在 570 nm 波长下的吸光值, 作为标准曲线或样品测定数据。整个步骤在 15 min 内完成。

### 1.2.2.4 钙螯合肽分子量分布的测定

参照文献<sup>[13,14]</sup>所述方法, 利用高效液相色谱仪进行测定。色谱柱为 TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm, 流动相为水/乙腈/三氟乙酸 (80:20:0.1, V/V/V), 在柱温为室温、流速为 0.5 mL/min 条件下, 以检测波长 220 nm 对样品 (1.6 mg/mL) 进行测定。其中绘制分子量标准曲线所选取的蛋白标准品为: 细胞色素 C

(12500 u)、胰岛素 (5808 u)、杆菌肽 (1422 u)、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸 (451 u)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (189 u), 制得标准曲线 ( $Y=-0.311x+8.7296$ ,  $R^2=0.9972$ )。

### 1.2.2.5 钙螯合肽的氨基酸组成分析

根据 GB5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》, 取 10~20 mg 的样品冻干粉于水解管内, 加入 10~15 mL 6 M 盐酸溶液后滴入苯酚 3~4 滴, 将水解管冷冻 5 min。接到真空泵的抽气管上, 抽真空, 充入 N<sub>2</sub>, 重复 3 次后, 封口, 置于 110 °C±1 °C 下酸水解 22 h。冷却至室温后, 将水解液过滤至 50 mL 容量瓶内, 定容, 振荡混匀。准确吸取 1.0 mL 滤液移入到 15 mL 试管内, 用平行蒸发仪在 40 °C 加热环境下减压干燥, 干燥后残留物用 1.5 mL 水溶解, 重复至蒸干。加入 1.5 mL 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH=2.2) 溶解, 振荡混匀后, 过 0.22 μm 滤膜, 滤液采用氨基酸分析仪进行分析。

## 1.2.3. 数据统计分析

采用 Excel 2017 软件结合 SPSS version 21.0 软件进行数据处理和分析, 结果以平均值±标准差表示,  $p<0.05$  认为差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最优酶的选择分析

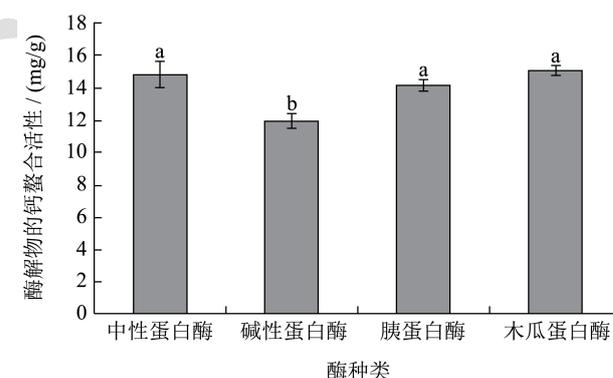


图1 不同酶酶解后活性肽的钙螯合活性

Fig.1 Effect of different kinds of enzyme on the calcium-binding ability of Tilapia collagen peptide ( $p<0.05$ )

注: 不同字母表示数据差异显著,  $p<0.05$ 。

根据厂家提供的不同酶类的理论最适酶解工艺条件, 对罗非鱼骨进行酶解处理, 结果如图1所示, 中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶对酶解物的钙螯合活性影响无显著性差异 ( $p<0.05$ )。木瓜蛋白酶属于巯基蛋白酶, 底物特异性较宽, 以甘氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的羧基端、精氨酸的羧基端为酶切位点, 其中主要的是甘氨酸, 又能优先水解氨基端有2个羧基的

氨基酸,如天冬氨酸和谷氨酸这两种对钙螯合能力贡献较大的氨基酸<sup>[15]</sup>。考虑到木瓜蛋白酶的酶切位点的特殊性对多肽的钙螯合活性的积极影响,以及其所得酶解物具有良好的钙结合活性,本实验选择木瓜蛋白酶为最优酶解作用酶。

## 2.2 不同酶解时间对肽的钙螯合活性的影响

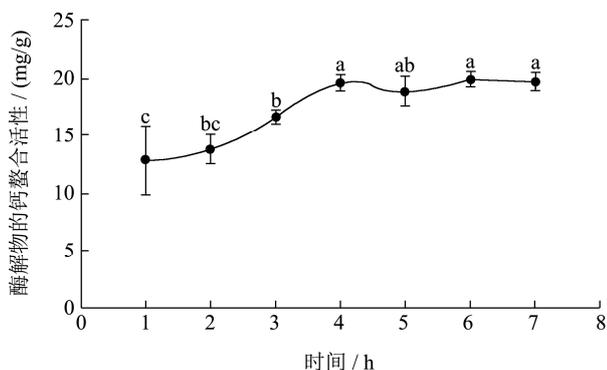


图2 不同酶解时间下酶解物螯合钙的能力

Fig.2 Effect of different time of Hydrolysis on the calcium-binding ability of Tilapia collagen peptide

注: 不同字母表示数据差异显著,  $p < 0.05$ 。

根据酶筛选实验结果,选用木瓜蛋白酶作为工具酶,在其理论最优酶解条件(pH为7.0,温度60℃,酶底比1%)进行不同时间的酶解。如图2所示,从1到4 h酶解物的钙螯合活性持续增强,即酶解效果持续增强;4~7 h内酶解物的钙螯合活性差异不明显,此时钙螯合活性处于18.76~19.68 mg/g之间。出现这种现象的原因可能是:如前文所述木瓜蛋白酶的酶切位点与钙螯合位点种类相似,随着酶解的进行,钙螯合位点持续大量增加;到后期,即使仍有骨胶原蛋白水解生成新的罗非鱼骨胶原钙螯合肽,同时也有钙螯合肽被降解成为游离的氨基酸,生成与降解的速度相当,酶解物的钙螯合活性相应几乎持平。因此,选取4 h为后续正交试验的中心试验点。同时,考虑到单因素实验中4 h酶解物钙螯合活性显著优于相邻的3 h和5 h酶解物的钙螯合活性,在正交设计时将时间因素的低水平点和高水平点选在更接近中心试验点的3.5 h和4.5 h(详见表2)。

## 2.3 不同酶解 pH 对肽的钙螯合活性的影响

由于木瓜蛋白酶为中性蛋白酶,考虑到偏酸及偏碱性条件对蛋白酶的抑制作用,本实验选取6.0~7.5的pH区间。结果如图3所示,虽然木瓜蛋白酶的理论最优pH为7.0,但随着pH的降低,酶解物的钙螯合活性逐渐升高,当pH为6.0时,酶解物钙螯合活性最强,达到25.81 mg/g。这可能是因为酶的分子结构,

特别是活性部位的结构受pH改变的影响,从而影响了罗非鱼鱼骨胶原蛋白的水解作用方式和效果。故选取6.0为后续正交试验的中心试验点。考虑到优化设计时因素的低水平试验点和高水平试验点原则上应分布在中心试验点左右,pH因素的水平定为5.5,6.0和6.5(详见表2)。

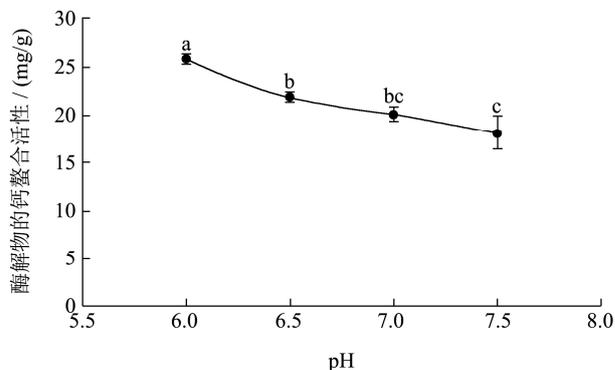


图3 不同pH下酶解物的钙螯合活性

Fig.3 Effect of different pH of Hydrolysis on the calcium-binding ability of Tilapia collagen peptide

注: 不同字母表示数据差异显著,  $p < 0.05$ 。

## 2.4 不同酶解温度对肽的钙螯合活性的影响

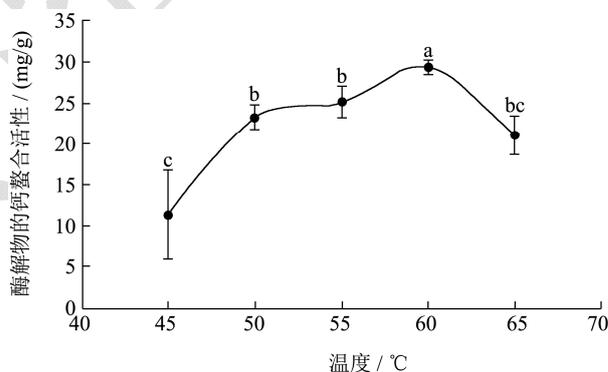


图4 不同酶解温度下酶解物的钙螯合活性

Fig.4 Effect of different temperature of Hydrolysis on the calcium-binding ability of Tilapia collagen peptide

注: 不同字母表示数据差异显著,  $p < 0.05$ 。

如图4所示,45~60℃时酶解物的钙螯合活性逐渐增强,这是因为随着温度上升,蛋白酶分子活性逐渐增强,底物与酶的分子运动也变得更加剧烈,接触机会增加,水解反应速度随之不断提高;60℃时,酶解物的钙螯合活性最强,达到29.28 mg/g;60℃以上时,酶解物的钙螯合活性迅速减弱,这可能是因为随着温度的进一步上升,木瓜蛋白酶分子结构对热变得敏感,酶活性或对罗非鱼胶原蛋白的作用方式受到影响。故选取60℃为后续正交试验的中心试验点,即该酶的理论最适酶解温度。同时考虑到中心试验点(60℃)酶解物的钙螯合活性显著高于左右温度点

(55 °C 和 65 °C)，这说明木瓜蛋白酶酶解罗非鱼骨胶原蛋白制备钙螯合肽工艺在 60 °C 附近对温度变化较为敏感，因此在温度单因素的水平设置时将步长设置选取在更接近中心点，即 58 °C、60 °C 和 62 °C (详见表 2)。

### 2.5 不同酶底比对肽的钙螯合活性的影响

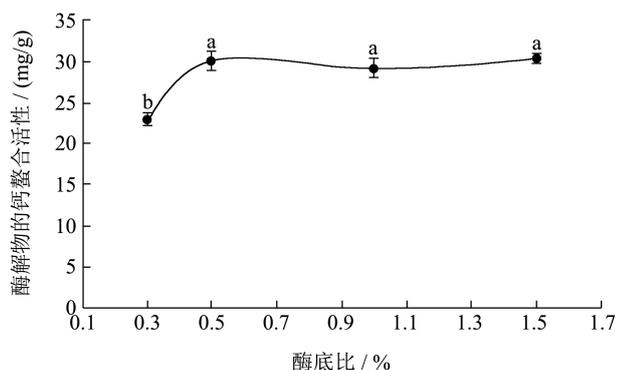


图 5 不同酶底比下活性肽的钙螯合活性

Fig.5 Effect of different weight ratio of hydrolysis on the calcium-binding ability of Tilapia collagen peptide

注：不同字母表示数据差异显著， $p < 0.05$ 。

如图 5 所示，酶底比为 0.3%~0.5% 时，酶解物的钙螯合活性增强；大于 0.5% 时，酶解物的钙螯合活性趋于稳定，在 29.10~30.13 mg/g 区间内。产生该现象的原因可能是：酶底比 0.5% 以下，骨胶原蛋白的浓度一定时，酶解反应并未达到饱和状态，随着酶底比增大，酶解反应趋于饱和。故将 0.5% 定为后续正交试验的中心试验点。考虑到酶底比为 0.5% 时酶解效果显著优于 0.3%，而与 1% 没有显著差异，因此将因素的低水平点和高水平点选在更接近中心试验点的 0.4% 和 0.6% (详见表 2)。

### 2.6 正交试验的结果分析

在单因素基础上，以钙螯合活性为指标，选用四因素三水平的正交实验 (见表 2) 对罗非鱼骨胶原钙螯合肽的酶解制备条件进行进一步优化，结果如表 3 所示。由直观分析法分析得出：4 个因素均对酶解物的钙螯合活性有影响，影响罗非鱼骨胶原钙螯合肽制备的 4 个因素的主次顺序为：温度 > pH > 酶底比 > 时间；得出的最优酶解工艺条件为：酶解时间：4.5 h，pH：6.5，酶解温度：62 °C，酶底比：0.6%。

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment for  $L_9 (3^4)$

试验号	因素				试验结果
	时间/h	pH	温度/°C	酶底比/%	
1	3.5	5.5	58	0.4	15.43
2	3.5	6	60	0.5	28.79
3	3.5	6.5	62	0.6	36.55
4	4	5.5	60	0.6	26.93
5	4	6	62	0.4	25.99
6	4	6.5	58	0.5	27.55
7	4.5	5.5	62	0.5	28.79
8	4.5	6	58	0.6	22.27
9	4.5	6.5	60	0.4	31.58
$K_1$	80.770	71.150	65.250	73.000	
$K_2$	80.470	77.050	87.300	85.130	
$K_3$	82.640	95.680	91.330	85.750	
$k_1$	26.923	23.717	21.750	24.333	
$k_2$	26.823	25.683	29.100	28.377	
$k_3$	27.547	31.893	30.443	28.583	
极差 R	0.723	8.177	8.693	4.250	
主次顺序	温度 > pH > 酶底比 > 时间				
优水平	4.5	6.5	62	0.6	
优组合	4.5 h, pH 6.5, 62 °C, 0.6%				

## 2.7 罗非鱼骨胶原钙螯合肽的分子量分布分析

凝胶渗透色谱分析法(GPC)是蛋白质常用的分析手段,其中最主要的原因是它能对分子量分布数据进行定量表征。由于其成本低,操作简便,稳定好,准确性高,我国的GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽》、SB/T 10634-2011《淡水鱼胶原蛋白肽粉》、GB/T 22492-2008《大豆肽粉》等标准中,已将其列为判断肽段分子量的检测方法,且应用广泛<sup>[13,14]</sup>。最优酶解条件下制备的罗非鱼骨胶原钙螯合肽的分子量分布分析如表4所示。低于2000 u的肽占活性肽总量的74.7%;而1000 u以下的寡肽占总量的49.07%,接近一半;酶解物中大部分肽的分子量集中在180~2000 u的区间内。可推测具有钙螯合活性的肽分子量较小,主要在2000 u以下。在目前的很多研究中,具有强钙螯合活性的肽单体分子量集中在2000 u以下,如陈东等<sup>[16]</sup>从阿拉斯加鱼皮中分离得的GPAGPHGPPG(842.41 u)、曹庸等<sup>[8]</sup>从牛奶酪蛋白中提取的P5(1890.74 u)、蔡茜茜等<sup>[10]</sup>从海生真菌*Schizochytrium* sp.获得的Phe-Tyr(328.17 u)、孙娜<sup>[17]</sup>等从鸡蛋蛋白中获取的Asp-His-Thr-Lys-Glu(628.6321 u)等。可能是因为分子量较短的肽链的空间位阻较小,较容易与钙离子发生配合反应;亦可能是较短的肽链有更多的钙结合位点暴露,从而可以螯合更多的钙离子。

表4 罗非鱼骨胶原钙螯合肽的分子量分布

Table 4 the molecular weight distribution of Tilapia collagen calcium-binding peptide

分子量/u	含量/%
>5000	5.7361
3000~5000	8.4958
2000~3000	11.0643
1000~2000	25.6384
500~1000	20.2900
180~500	23.5373
<180	5.2381

## 2.8 罗非鱼骨胶原钙螯合肽及其钙-肽螯合物氨基酸组成分析

在最优酶解条件下制备罗非鱼骨胶原钙螯合肽,并按照1.2.2.1操作制备相应钙-肽螯合物,罗非鱼骨胶原钙螯合肽及钙-肽螯合物中的氨基酸组成如表5所示。罗非鱼骨胶原钙螯合肽检测到16种氨基酸,其

中甘氨酸含量最高,占17.618%。同时,含量较高的氨基酸种类还有:丙氨酸(11.464%)、脯氨酸(10.104%)、羟脯氨酸(8.130%)、谷氨酸(6.183%)、精氨酸(6.183%)和天冬氨酸(3.783%),符合典型的胶原蛋白氨基酸的组成特征<sup>[18]</sup>。骨胶原活性肽中含有7种必需氨基酸(11.567%),唯一未检测的一种必需氨基酸-色氨酸因在检测前处理的酸水解步骤中完全被破坏,不能说明活性肽中不含有该氨基酸。因此,罗非鱼骨胶原钙螯合肽是一种氨基酸均衡的优质蛋白补充物。

表5 钙螯合活性肽和钙-肽螯合物的氨基酸组成分析数据表  
Table 5 Comparison of amino acids in Tilapia collagen peptide and Tilapia collagen peptide chelated calcium

氨基酸种类	活性肽中的含量/%	螯合物中的含量/%
天冬氨酸(Asp)**	3.783	5.469
苏氨酸(Thr)*	2.270	2.190
丝氨酸(Ser)	2.751	3.054
谷氨酸(Glu)**	6.183	8.991
甘氨酸(Gly)**	17.422	17.618
丙氨酸(Ala)**	11.464	10.212
缬氨酸(Val)*	1.618	1.271
胱氨酸(Cys)	0	0.187
蛋氨酸(Met)*	0.958	0.594
异亮氨酸(Ile)*	0.998	0.675
亮氨酸(Leu)*	1.815	1.276
酪氨酸(Tyr)	0.860	0.628
苯丙氨酸(Phe)*	1.684	1.325
组氨酸(His)	0.841	0.895
赖氨酸(Lys)*	2.224	2.848
精氨酸(Arg)**	6.075	5.617
羟脯氨酸(Hyp)	8.130	7.504
脯氨酸(Pro)	10.104	8.342
合计	79.180	78.696

注: \*: 必需氨基酸; \*\*: 鲜味氨基酸。

同时,对比发现,钙-肽螯合物与罗非鱼骨胶原钙螯合肽的氨基酸组成存在明显差异。钙-肽螯合物比罗非鱼骨胶原钙螯合肽多检测出了胱氨酸,一种在检测前处理的酸水解步骤中会被部分破坏的氨基酸<sup>[19]</sup>,这可能是胱氨酸在钙-肽螯合物中得到富集(0.187%),而在罗非鱼骨胶原钙螯合肽含量较低且酸水解时遭到破坏的原因。这同时也说明胱氨酸具有良好的钙结合能力。除胱氨酸外,钙-肽螯合物含量提高的氨基酸还有:天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸,其中大幅增加的氨基酸是天冬氨酸(增加

1.686%)、谷氨酸(增加2.808%),这表明这些氨基酸的存在对罗非鱼骨胶原钙螯合肽结合钙的能力起到了重要作用。本结果也与部分报道相吻合,根据文献报道,木瓜蛋白酶在水解过程中能优先释放天冬氨酸和谷氨酸,两者均为酸性氨基酸,其侧链上的羧基在对钙螯合有很大帮助<sup>[12]</sup>,有效提高了钙螯合肽的钙螯合活性。丝氨酸也是对钙螯合活性有重要影响的氨基酸<sup>[20]</sup>,在典型的促钙吸收肽-酪蛋白磷酸肽中,丝氨酸是磷酸化位点<sup>[21]</sup>。再者,其余含量较高的氨基酸,如精氨酸、甘氨酸,及小幅增加的赖氨酸(增加0.624%)和组氨酸(增加0.054%)都是与钙螯合活性相关的特别基团<sup>[11,17,22-25]</sup>。此外,肽链中的亚氨基能与钙离子形成配位,而具有亚氨基的氨基酸是脯氨酸和羟脯氨酸,在罗非鱼骨胶原活性肽中含量较高<sup>[22]</sup>。

### 3 结论

本文用蛋白酶法从罗非鱼骨胶原蛋白中获取钙螯合肽,得到了酶解的最优工艺条件;所得罗非鱼骨胶原钙螯合肽70%以上分子量在小于2000u,属于小分子活性肽;对比了最优酶解条件下制得的罗非鱼骨胶原钙螯合肽及其钙-肽螯合物的氨基酸组成,其胱氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸等含量较高,对罗非鱼骨胶原钙螯合肽结合钙的能力有一定的贡献。本文为水产加工副产物-罗非鱼骨架的精深加工利用提供了新思路,为开发罗非鱼骨补钙产品提供了理论支撑和技术支持。

### 参考文献

- [1] 张红燕,袁永明,贺艳辉,等.世界罗非鱼生产和贸易现状分析[J].农业展望,2016,5:77-80  
ZHANG Hong-yan, YUAN Yong-ming, HE Yan-hui, et al. Current situation on global tilapia production and trade [J]. Agricultural Outlook, 2016, 5: 77-80
- [2] 易美华,杨仕生,谢福美.罗非鱼骨制备活性钙的技术研究[J].食品研究与开发,2008,29(12):85-88  
YI Mei-hua, YANG Shi-sheng, XIE Fu-mei. Technical study on operation activated ca from tilapia bone [J]. Food Research and Development, 2008, 29(12): 85-88
- [3] 吴燕燕,李来好,林洪,等.罗非鱼骨制备CMC活性钙的工艺及生物利用的研究[J].食品科学,2005,2:114-117  
WU Yan-yan, LI Lai-hao, LIN Hong, et al. Studies on preparation technology of CMC actived calcium and its bioavailability from tilapia bone [J]. Food Science, 2005, 2: 114-117
- [4] 毛毛,衣美艳,郭红.真鳕鱼骨胶原肽及鱼骨钙联产工艺的优化设计[J].食品科技,2017,10:138-141  
MAO Mao, YI Mei-yan, GUO Hong. Design and optimization of multi-trunk fishbone clock tree structure [J]. Food Science and Technology, 2017, 10: 138-141
- [5] 张志胜,韩晴,齐文聪,等.胶原多肽螯合钙的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(8):3222-3227  
ZHANG Zhi-sheng, HAN Qin, QI Wen-chong, et al. Research progress of collagen polypeptide chelated calcium [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(8): 3222-3227
- [6] 孟昌伟.斑点叉尾鮰鱼骨钙制剂的制备及其生物活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2012  
MENG Chang-wei. Study on the preparation of calcium supplements from channel catfish and its properties [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
- [7] 王俊,程薇,文莉,等.复合氨基酸螯合钙对大鼠生物利用率的研究[J].湖北农业科学,2008,47(12):1492-1494  
WANG Jun, CHENG Wei, WEN Li, et al. Study on bioavailability of calcium complex amino acid on rat [J]. Hubei Agricultural Science, 2008, 47(12): 1492-1494
- [8] CAO Y, MIAO J, LIU G, et al. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in caco-2 cell monolayers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(11): 2307-2314
- [9] 王珊珊.鳕鱼骨胶原肽与活性钙的制备及其抗骨质疏松活性研究[D].青岛市:中国海洋大学,2013  
WANG Shan-shan. The preparation of collagen peptides and active calcium from cod bone and its preventive effects on osteoporosis [D]. Qingdao City: Ocean University of China, 2013
- [10] CAI X, LIN J, WANG S. Novel Peptide with specific calcium-binding capacity from *Schizochytrium* sp. protein hydrolysates and calcium bioavailability in caco-2 cells [J]. Marine Drugs, 2017, 15(1): 3
- [11] HUANG S, ZHAO L, CAI X, et al. Purification and characterisation of a glutamic acid-containing peptide with calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate [J]. Journal of Dairy Research, 2015, 82(1): 29-35
- [12] ZHAO L, HUANG S, CAI X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10(3): 46-53
- [13] WANG J Z, YUE J Y, ZHANG C H, et al. Preparation of peptone from chicken bone residue by using natural pancreas as catalyst [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016, 91(11): 2852-2861

- [14] JIA J, ZHOU Y, LU J, et al. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(4): 635-640
- [15] SUN N, WU H, DU M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 140-148
- [16] CHEN Q, GUO L, DU F, et al. The chelating peptide (GPAGPHGPPG) derived from Alaska pollock skin enhances calcium, zinc and iron transport in Caco-2 cells [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(5): 1283-1290
- [17] SUN N, CUI P, JIN Z, et al. Contributions of molecular size, charge distribution, and specific amino acids to the iron-binding capacity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 627-636
- [18] BAE I, OSATOMI K, YOSHIDA A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 49-54
- [19] 李梅,王桂荣.酸水解-氨基酸分析前处理方法的应用实践[J].安徽农业科学,2014,10:2846-2847  
LI Mei, WANG Gui-rong. Practice on pretreatment of acid hydrolysis of protein for amino acids analysis [J]. Anhui Agricultural Science, 2014, 10: 2846-2847
- [20] WANG L Z Y L. Purification of algal calcium-chelating peptide and its physical chemical properties [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2018, 8
- [21] Wada Y, Lönnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins-mechanisms of action [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014, 25(5): 503-514
- [22] 卢玉坤.鳕鱼皮胶原蛋白肽的促钙吸收作用研究[D].青岛:中国海洋大学,2013  
LU Yu-kun. Study on increasing calcium absorption effect with collagen peptide from skin of walleye Pollock [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013
- [23] PENG Z, HOU H, ZHANG K, et al. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 373-378
- [24] SUN N, JIN Z, LI D, et al. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide, Asp-His-Thr-Lys-Glu, and *in vitro* calcium absorption studies of peptide-calcium complex [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(44): 9782-9789
- [25] LIU F, WANG L, WANG R, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(31): 7537-7544

---

(上接第 156 页)

- [8] Peng H, Dong W, Gu C, et al. Transcriptome analysis reveals global regulation in response to CO<sub>2</sub> supplementation in oleaginous microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 [J]. Biotechnol Biofuels, 2016, 9(1): 151
- [9] Chiu S Y, Kao C Y, Chen C H, et al. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3389-3396
- [10] Beardall J, Raven J A. Limits to phototrophic growth in dense culture: CO<sub>2</sub> supply and light [J]. Algae for Biofuels and Energy, 2013, 91-97
- [11] Estévezlandazábal L L, Barajassolano A, Barajasferreira C, et al. Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate [J]. CT y F - Ciencia, Tecnologia y Futuro, 2013, 5(5): 113-126
- [12] 刘香华,刘雷,曾慧卿.不同碳源及光照对小球藻生长和产油脂的影响[J].安全与环境学报,2012,12(3):8-12  
LIU Xiang-hua, LIU lei, ZENG hui-qin. Effects of different carbon sources and light on growth and lipid production of *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of Safety and Environment, 2012, 12(3): 8-12
- [13] 张森,杨勋,郝宗娣,等.三种有机碳源对微藻 *O.multisporus* hk12.的生长及油脂含量的影响[C]//中国藻类学会第八次会员代表大会暨第十六次学术讨论会论文摘要集,2011  
ZHANG Sen, YANG Xun, HAO Zong-di, et al. Effects of three organic carbon sources on growth and oil content of microalgae *O. multisporus* hk12 [C] // Abstracts of Eighth Symposium and Sixteenth Symposium on Chinese Algae Society, 2011