

文蛤多肽粉的成分分析

康劲翮, 郑国兴, 范成成, 冷波, 蒋哲, 王勤, 陈清西*

(厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:以文蛤肉为原料,采用复合胰蛋白酶酶解,通过喷雾干燥工艺得到文蛤多肽粉.根据检验标准 GB1519.3-2003 食品急性毒性试验中最大耐受剂量法,对清洁级 KM 小鼠无毒害作用,作用后小鼠均健康无异常反应,解剖无明显病变,其 $LD_{50} > 15$ g/kg 体质量.对文蛤多肽粉组成成分进行分析,测定了其总氮、蛋白质、氨基酸、总糖、还原糖、脂肪、灰分及 Na、K、Ca、Mg、Fe、Cu、Zn、Cd、Ag、Pb 等金属元素的含量.应用基质辅助激光解吸飞行时间质谱法 (MALDI-TOF) 分析了文蛤多肽粉分子量的分布范围.结果表明,该文蛤多肽粉中蛋白质、氨基酸和对人体有益金属元素含量丰富,对人体有害的重金属含量都大大低于国家食品检验标准的安全剂量,氨基酸种类齐全;多肽分子量均小于 5 200 u,其中分子量小于 1 000 u 的多肽占总多肽含量的 69.03%.

关键词:文蛤多肽;急性毒理实验;成分分析;质谱

中图分类号: Q 516

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0138-04

文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 属软体动物门、双壳纲、真瓣鳃目、帘蛤科、文蛤属,是我国滩涂传统养殖的主要贝类之一.文蛤具有很高的营养价值和药用价值,《本草纲目》记载,文蛤能治“疮疖肿毒,消积块,解酒、散毒”等病.张仲景在《伤寒杂病论》中有 3 处提到文蛤,并立出文蛤散、文蛤汤二方,主治均不离“渴”字.孟诜在《食疗本草》中言“文蛤润五脏治消渴、可食之”.近代《中药大辞典》记载文蛤的功效:清热、利湿、化痰、软坚.治渴烦热,咳逆胸痹,痰核,崩漏,痔瘕.现代研究表明,它具有清热利湿、化痰、散结、抗肿瘤的功 效,而且还能够发挥降糖、降血脂,抗突变、抗衰老等多种生理功能^[1-2].文蛤提取物对小鼠的体液免疫和细胞免疫具有明显的增强作用,而且使用剂量较大时能够促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能^[3].天然存在的多肽含量小、提取困难,而酶法降解制备的多肽具有保持和提高营养、不产生有毒物质、产品质量容易控制等优势,它已成为制备多肽类保健品的最佳方法.在本文中,我们采用酶解法得到文蛤多肽粉,并对其一些基本成分进行测定,以期 为文蛤保健品的开发及应用提供理论基础.

1 材料与方 法

收稿日期: 2008-09-02

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20063021), 厦门大学科技创新工程基金 (XDKJCX20043001) 和国家基础科学人才培养基金项目 (J0630649) 资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

1.1 材 料

文蛤购于厦门市同安新店水产养殖场,复合胰蛋白酶为无锡酶制剂厂产品, MALDI-TOF 质谱所用试剂都为布鲁克公司产品,其余试剂均为国产分析纯,所用的蒸馏水为无离子双蒸馏水.

1.2 文蛤多肽粉的制备

文蛤吐沙,去壳取肉,称量加入缓冲液匀浆,补缓冲液至肉重的 5 倍体积,加入复合胰蛋白酶,在 pH 8.0、40℃、酶量 0.5% 的条件下酶解 5 h, 100℃ 水浴 20 min 灭活蛋白酶, 4 800 r/min 离心 20 min, 取上清液,通过喷雾干燥,获得文蛤多肽粉,以供分析.

1.3 文蛤多肽粉的急性毒理实验

检验标准:按国标 GB1519.3-2003 食品急性毒性试验,以小鼠为动物模型.

实验方法:

(1) 动物:清洁级 KM 雄性小鼠 10 只 [由厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供,许可证号: SCXK (闽) 2004-0001], 每只质量 18~22 g, 标记、编号并称量;清洁级动物实验室饲养 [许可证号: SYXK (闽) 2004-0004].

(2) 样品处理:取 3 g 受试物定容于 4 mL 双蒸水中,摇匀备用.得到的检品浓度为: 0.75 g/mL.

(3) 给药方法:小鼠灌胃 0.4 mL/只 (即:剂量为 15 g/kg).

(4) 观察时间:7 天,第 7 天称量.

1.4 文蛤多肽粉组分测定方法

蛋白质含量测定:采用 Folin 酚法;总氮含量测定采用凯氏定氮法^[4];总糖含量测定采用硫酸苯酚

法^[5];还原糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[5];脂肪含量测定采用索氏提取法^[6];水分含量测定采用常压干燥法^[4];灰分含量测定采用高温灼烧法^[6];金属元素测定:采用火焰原子吸收光谱法测定^[6].氨基酸含量测定:待测样品置 6 mol/L HCl,于 110 °C 水解 24 h,用氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成.分子量测定:采用基质辅助激光解吸附飞行时间质谱法.

表 1 文蛤多肽粉对小鼠体质量变化的影响

Tab 1 Effect of health product on mice's weight

编号	最初体质量 /g	第 7 日体质量 /g
1	21.8	28.1
2	20.6	25.4
3	19.7	23.6
4	18.9	24.5
5	22.0	28.7
6	21.5	29.5
7	19.8	27.6
8	20.2	26.8
9	19.5	27.7
10	19.9	29.6

2 实验结果

2.1 文蛤多肽粉的急性毒理实验

以文蛤多肽粉对昆明种小鼠进行急性毒理实验,10只小鼠均健康,生长正常体质量增加明显,结果见表 1.观察发现,小鼠均没有行动迟钝、倦伏、运动失调、呼吸加深、进食减少、饮水次数少、小便多大便不规则、皮毛不光亮等异常反应,更没有四肢瘫软、侧躺卧、昏迷等毒副作用.解剖发现小鼠的肝、心、肾、脾等各种器官没有明显的病变.表明该文蛤多肽粉没有毒副作用,属于无毒食品 ($LD_{50} > 15 \text{ g/kg}$ 体质量).

2.2 主要成分组成分析

用凯氏定氮法测定总氮含量为 5.25%;采用 Folin 酚法测定文蛤多肽粉中蛋白质含量为 30.3%;用

茚三酮显色法测定氨基酸的含量为 9.6%;采用硫酸-苯酚法测定总糖含量 8.3%;采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量 0.6%;采用索氏提取法测定脂肪含量 1.8%;采用常压干燥法测定水分含量 6.5%;采用高温灼烧法测定灰分含量 22.4%.可以看出文蛤多肽粉是一种无毒低糖低脂肪高蛋白的保健品.结果见表 2.

2.3 金属元素组成成分分析

鉴于灰分含量很高,所以进行了用原子吸收光谱仪分析文蛤多肽粉中各种金属元素的含量,其中对人体有益的金属元素含量从高到低依次为 Na、K、Ca、Mg、Fe、Cu.可以看出,文蛤多肽粉含有高钾、高钠和高钙,同时含有 Mg、Fe、Cu、Zn 等人体有益的微量元素.结果见表 2.

2.4 文蛤多肽粉氨基酸组成

氨基酸自动分析仪分析结果见表 3.表明文蛤多肽粉中氨基酸种类齐全,其中酸性氨基酸的含量最高,可达 10.37%,酸性氨基酸中又以谷氨酸含量最多,占 6.05%;含量最低的 2 种氨基酸为半胱氨酸和甲硫氨酸;人体必需氨基酸达 12.36%,占氨基酸总量的 32.14%.

表 2 主要成分及金属元素组成

Tab 2 Composing of main component and metal elements

成分	含量 /%	金属	含量 / (mg·kg ⁻¹)
		Mg	218.3
总氮	5.25	Na	8701.4
蛋白质	30.3	K	1709.0
氨基酸	9.6	Ca	950.7
总糖	8.3	Cu	5.2
还原糖	0.6	Fe	16.8
脂肪	1.8	Zn	19.16 × 10 ⁻³
水分	6.5	Cd	0.56 × 10 ⁻³
灰分	22.4	Ag	0.71 × 10 ⁻³
		Pb	5.8 × 10 ⁻³

表 3 文蛤多肽粉的氨基酸组成

Tab 3 Composing of amino acids in polypeptide product

氨基酸	含量 /%	氨基酸	含量 /%	氨基酸	含量 /%
天冬氨酸	4.32	半胱氨酸	0.32	苯丙氨酸	1.24
苏氨酸	1.77	缬氨酸	1.57	赖氨酸	2.84
丝氨酸	1.81	甲硫氨酸	0.86	组氨酸	1.13
谷氨酸	6.05	异亮氨酸	1.40	精氨酸	3.11
甘氨酸	2.53	亮氨酸	2.68	脯氨酸	1.31
丙氨酸	4.11	酪氨酸	1.41	总量	38.46

2.5 多肽分子量分布

通过 MALDI-TOF 质谱分析得到,文蛤多肽粉中多肽分子量均小于 5 200 u, 1 000 u 以上的分子量在 1 708.04, 1 945.25, 2 776.70, 3 100.87, 3 102.86, 3 628.33 u 的多肽含量高,分子量越大多肽的含量越少,结果见图 1.

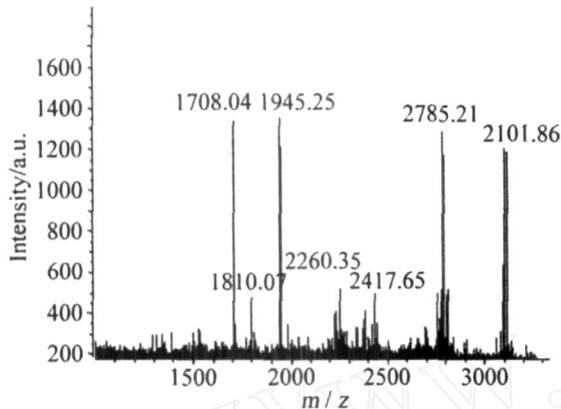


图 1 多肽分子量分布 MALDI-TOF 质谱分析结果

Fig 1 Composing of polypeptide molecular weight analyzed by MALDI-TOF

3 讨论

复合胰蛋白酶中除了主要含胰蛋白酶外还含有淀粉酶、胃蛋白酶等其他酶,通过它们共同的作用,其酶解文蛤的效率大大提高, pH 8.0 时在较低的温度 40℃、较少的酶用量 0.5%、较短的酶解时间 5 h 就能获得最好的酶解效果。而其酶解所需的温度较低、酶用量较少、酶解时间较短,都有利于其应用于节约成本,进一步增加了工业化生产文蛤多肽保健品可行性。其喷雾干燥产物呈白色干燥粉末,外观风味俱佳,容易保存和运输,为其商品化打下坚实的基础。

成分分析结果表明,文蛤多肽粉的蛋白质含量为 30.3%,比兰蛤的 61.5% 低,总糖含量为 8.3%,比兰蛤的 4.5% 高,粗脂肪含量为 1.8%,比兰蛤的 8.12% 低,因此与兰蛤相比^[7],文蛤多肽粉的蛋白含量虽然较低,但其低脂高糖的特性更有利于保健人体;文蛤多肽粉中对人体有益的金属元素含量丰富,含量从高到

低依次为 Na、K、Ca、Mg、Fe、Cu;其中 Na、K、Ca 的含量明显高于青蛤, Fe、Cu、Zn 含量低于青蛤^[8];对人体有害的重金属 Pb、Ag 和 Cd 含量分别为 5.8、0.71 和 0.56 μg/kg 都非常微小,大大低于国家食品重金属安全卫生标准的相应剂量 Pb 0.5 mg/kg, Cd 0.1 mg/kg, 因此其营养丰富、微量元素含量较高、无毒、无害是很好的保健品。结果说明,与青蛤^[8]类似文蛤多肽粉中氨基酸种类齐全,都是酸性氨基酸的含量最高;文蛤多肽粉中人体必需氨基酸丰富高达 12.36%,占氨基酸总量的 32.14%,也与青蛤的 36.1% 相差不多,是质量较好的蛋白源。通过多肽分子量分析可知,文蛤多肽粉中多肽的分子量都在 5 200 u 以下,且分子量越小的多肽含量越高,小于 1 000 u 的多肽比例约高达 70%,人体极易吸收,同时也进一步验证了极佳的蛋白酶酶解效果。

总之,文蛤多肽粉营养丰富、容易吸收、安全无毒无害,具有抗氧化、降血压、抗肿瘤作用、增强免疫功能,是一种不可多得的绿色健康食品。文蛤多肽粉生产过程容易,成本低,工艺简单适于工业化生产,其中试得到的产物风味好、外观漂亮、容易保存,作为保健品的开发具有极大的市场前景。

参考文献:

- [1] 陈汉源,丛笑倩,张昂,等. 文蛤抽提物的抗癌研究[J]. 肿瘤防治研究, 1980, 4(3): 3-7.
- [2] 张建新,邢银萍. 文蛤核酸抗癌活性的研究[J]. 海洋与沼泽, 1990, 21(1): 88-91.
- [3] 窦昌贵,黄芳,黄罗生,等. 文蛤多糖抗癌免疫药理作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1999(2): 15-19.
- [4] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1997.
- [5] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1998.
- [6] 蒋哲,王勤,邱凌,等. 鲨鱼皮胶原蛋白肽成分分析[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(sup): 169-171.
- [7] 吴海歌,刘发义,李光友. 兰蛤营养成分的研究[J]. 黄渤海海洋, 2001, 19(3): 82-86.
- [8] 顾润润,于业绍,蔡友琼. 青蛤的营养成分分析与评价[J]. 动物学杂志, 2006, 41(3): 70-74.

(下转第 145 页)

Detection and Analysis of Parvalbumin in Fish Muscle

WANG Ning^{1, 2}, WANG Xi-chang², CAI Qiu-feng^{1, 2},
LU Guang-ming¹, CAO Min-jie^{1*}

(1. The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, School of Biotechnology, Jinxi University, Xi'an 710021, China; 2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Fish allergens (parvalbumins) from the skeletal muscle of five species of fish (common carp, silver carp, crucian carp, sea bream and ovate pompano), two surimi products (codfish ball and silver carp ball) and three kinds of canned fish (dace, sardine and eel) were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Specific protein bands were detected by Western blot using anti-frog parvalbumin monoclonal antibody (PARV-19) in sarcoplasmic fractions from white muscle and red muscle. The molecular masses as estimated by SDS-PAGE were between 12 and 14.4 ku of all the five species of fish tested. The content of parvalbumin in white muscle was much higher than that in red muscle. No protein band corresponding to parvalbumin could be detected in myofibrillar proteins, surimi and canned fish. In conclusion, our present results strongly suggested that whether in marine fish or freshwater fish, major allergen parvalbumin mainly exists in the sarcoplasmic fraction of white muscle while its content in red muscle is extremely low. Processing such as washing or high temperature treatment can effectively remove parvalbumin or destroy its allergenicity.

Key words: parvalbumin; white muscle; red muscle; surimi; SDS-PAGE; Western blot

(上接第 140 页)

Analysis of Components in Meretrix meretrix Peptides

KANG Jin-he, ZHENG Guo-xing, FAN Cheng-cheng, LENG Bo,
JIANG Zhe, WANG Qin, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xi'an University, Xi'an 710005, China)

Abstract: Peptide product of *Meretrix meretrix* was prepared using the enzymatic catalysis of composite trypsin. On the national test criterion of GB 1519.3-2003 for the most enduring dosage in food urgent toxicity experiment, health product was not harmful to clear Kunming mice. After treated by the product, mice were normal in health and there was no illness in mice. The LD₅₀ was higher than 15 g/kg weight. By analyzing the main component, metal content, amino acid composition and the range of polypeptide molecular weight, we found that in the *Meretrix meretrix* peptide, amino acid, saccharoid and metal elements are very rich. Meanwhile, heavy metals are very poor and much lower than the safe concentrations in national food test criteria. The categories of amino acids are complete. The polypeptide molecular weights are less than 5200 u, polypeptide less in molecular weight is richer and polypeptide which molecular weight is less than 1000 u is 69.03% of total polypeptide.

Key words: *Meretrix meretrix* peptide; urgent toxicity experiment; component analysis; mass spectrum