

蚕蛹源肽锌纳米粒子的制备及其结构表征

廖明君, 张自然, 惠森, 陈璐雯, 杨春媛, 张宗凯, 牛改改

Preparation and Characterization of Silkworm Pupa Source Peptide-zinc Nanoparticles

LIAO Mingjun, ZHANG Ziran, HUI Sen, CHEN Luwen, YANG Chunyuan, ZHANG Zongkai, and NIU Gaigai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020230>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征

Preparation Process Optimization of Soy Peptides-Zinc Chelate and Its Structural Characterization

食品工业科技. 2020, 41(14): 160-165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.026>

氧化锌纳米颗粒-海藻酸钠/壳聚糖双层复合膜的制备及特性

Preparation and Properties of Zinc Oxide Nanoparticles-Alginate/Chitosan Bilayer Composite Film

食品工业科技. 2021, 42(9): 214-220 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020010144>

脂肪酶预处理及鸡油添加对蚕蛹呈味基料风味的影响

Effects of Lipase Pretreatment and Chicken Oil on the Flavor of Silkworm Chrysalis

食品工业科技. 2018, 39(19): 52-58 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.009>

响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Scale Calcium Binding Peptides by Response Surface Methodology and Its Structural Characterization

食品工业科技. 2021, 42(21): 190-196 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020099>

浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征

Optimization of preparation process of *Enteromorpha prolifera* polysaccharide-iron and its structure characterization

食品工业科技. 2018, 39(5): 161-165,170 <https://doi.org/>

甜味剂中间体3-羟基-4-甲氧基苯丙烯醛的合成工艺优化及其结构表征

Optimization of Synthesis Process and Structural Characterization of 3-Hydroxy-4-Methoxy Benzal Acrolein—a Sweetener Intermediate

食品工业科技. 2018, 39(22): 144-149 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.22.026>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

廖明君, 张自然, 惠森, 等. 蚕蛹源肽锌纳米粒子的制备及其结构表征 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 84-91. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020230

LIAO Mingjun, ZHANG Ziran, HUI Sen, et al. Preparation and Characterization of Silkworm Pupa Source Peptide-zinc Nanoparticles [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 84-91. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020230

· 研究与探讨 ·

蚕蛹源肽锌纳米粒子的制备及其结构表征

廖明君¹, 张自然^{1,*}, 惠森², 陈璐雯¹, 杨春媛¹, 张宗凯¹, 牛改改¹

(1. 北部湾大学食品工程学院, 广西高校北部湾海产品高值化利用与预制食品重点实验室, 广西钦州 535011;

2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 535000)

摘要: 为开发安全易吸收的补锌制剂, 提升蚕蛹的利用价值, 通过酶解蚕蛹蛋白制备蚕蛹肽, 并将其与锌整合生成肽锌螯合物。以锌整合能力为指标, 确定蚕蛹肽的酶解制备工艺及蚕蛹肽锌螯合物的制备工艺, 采用紫外光谱、荧光光谱、扫描电镜、元素分析仪、粒径分析及红外光谱等技术对螯合前后的样品进行结构表征。结果表明, 酶解制备蚕蛹肽的条件为碱性蛋白酶加酶量为 1%、pH8.0、温度 50 °C、酶解时间 6 h, 该条件下的螯合率达 58.05%; 肽锌纳米粒的最佳制备条件为肽锌质量比 1:0.5、pH6.5, 温度 55 °C, 时间 20 min, 此时螯合率达 72.63%; 添加硫酸锌后, 紫外光谱与荧光光谱强度的减弱显示 Zn²⁺ 与蚕蛹肽成功的发生了结合, 所得蚕蛹肽-锌螯合物为粒径 71.99 nm 的纳米粒子, 表面呈均匀的颗粒状结构, 锌相对含量达 37.46%, 肽链中的 -COOH、-NH₂ 和 -C=O 是锌离子与蚕蛹肽的主要结合位点。综上, 蚕蛹是制备肽锌螯合物的良好原材料, 这为丰富有机锌补充剂资源库和蚕蛹综合利用奠定了一定的理论基础。

关键词: 蚕蛹, 肽-锌螯合物, 制备工艺, 结构表征

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0084-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020230



本文网刊:

Preparation and Characterization of Silkworm Pupa Source Peptide-zinc Nanoparticles

LIAO Mingjun¹, ZHANG Ziran^{1,*}, HUI Sen², CHEN Luwen¹, YANG Chunyuan¹,
ZHANG Zongkai¹, NIU Gaigai¹

(1. Guangxi College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and Prepared Food in Beibu Gulf, College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China;

2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 535000, China)

Abstract: Silkworm pupa peptide (SCP) was prepared by enzymatic hydrolysis and then chelated with soluble zinc ions to obtain silkworm pupa peptide-zinc chelates (SCP-Zn), so as to develop safe and easily absorbable zinc supplements and improve the utilization value of silkworm pupa. Taking the zinc chelating capacity as an index, the optimum preparation process of SCP-Zn was determined, and the structure of both SCP and SCP-Zn were characterized by ultraviolet spectrum, fluorescence spectra, scanning electron microscopy, elemental analysis, particle size analysis and Fourier transform infrared spectrum. The results showed that the chelation rate of silkworm chrysalis peptide was 58.05% under the conditions of 1% alkaline protease plus enzyme, pH8.0, temperature 50 °C and enzymatic hydrolysis time 6 h. The optimum preparation conditions for preparation of SCP-Zn nanoparticles were as follows: Mass ratio of zinc peptide 1:0.5, pH6.5, 55 °C, time 20 min, and the chelation rate of zinc reached 72.63%. The results of ultraviolet spectrum and fluorescence spectrum

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 广西自然科学基金项目(2022GXNSFBA035555); 高层次人才科研启动经费项目(2021KYQD09); 中青年项目(2020KY10030); 大学生创新训练项目(S202111607186)。

作者简介: 廖明君(1996-), 女, 学士, 研究方向: 肽与金属分子间的相互作用, E-mail: 673595275@qq.com。

* 通信作者: 张自然(1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食物组分相互作用, E-mail: ziranzhang1984@163.com。

showed that zinc ions successfully combined with SCP. The obtained chrysalis SCP-Zn belongs to nanoparticles with an average particle size of 71.99 nm, with uniform granular structure on the surface, and the relative content of zinc reached 37.46%. The $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ and $-\text{C}=\text{O}$ in the peptide chain were the main binding sites of Zn^{2+} and SCP. The results indicated that silkworm pupa was a good raw material for preparation of zinc chelates. The study provides a theoretical basis for enriching organic zinc supplement resources and the high value utilization of silkworm pupa.

Key words: silkworm pupa; peptides-zinc chelate; process optimization; structural characterization

锌是人体必需的微量元素,参与调节细胞生长、基因表达和免疫反应等生理活动,在生命活动中起着重要的作用,锌的缺乏可导致生长迟缓和免疫功能受损^[1]。据报道,目前全球约 17% 的人群出现锌缺乏症状,缺锌已成为影响全球性人类健康的一大诱因^[2]。造成机体缺锌的主要原因是日常膳食中锌的生物利用度低,如锌易与植酸形成不溶性复合物,而无法被肠道吸收^[3]。因此,开发有效的补锌剂具有重要的理论和现实意义。

传统上的补锌剂如硫酸锌、葡萄糖酸锌等往往存在易在微碱性环境下沉淀、生物利用度低,以及刺激胃肠道等缺点,不宜长期使用^[2]。而食源性蛋白肽可与锌形成螯合物,相比无机锌具有稳定性好、安全、易吸收等优点而成为有效补锌的一种重要形式,具有广阔的应用前景。目前国内外学者已利用动植物蛋白为原料酶解而得多肽,制备出多种肽锌螯合物,如 Zhang 等^[4]通过在牡蛎蛋白酶解液中加入硫酸锌,成功制备得到肽锌纳米粒,并对其溶解性、胃肠稳定性和结合机制进行了探讨,结果显示肽锌纳米粒在胃肠道中的溶解性和稳定性显著优于硫酸锌; Peng 等^[5]利用南瓜籽制备得到两条肽锌螯合物在胃肠稳定性和促锌吸收效果方面显著优于无机锌。因此,开发食源性肽补锌制剂具有重要的现实意义。

我国桑蚕业历史悠久,是世界蚕桑生产第一大国,蚕蛹年产量高达 65 万吨^[6]。蚕蛹富含蛋白质,且氨基酸组成均衡,是人体理想的蛋白来源。近年来,以蚕蛹蛋白为原料,制备得到多种生理活性肽。例如, Li 等^[7]采用碱提取法获得蚕蛹蛋白,发现采用超声波粉碎-碱性蛋白酶酶解制备得到酶解液对小鼠脾细胞显示了促增殖效果;沈圆圆等^[8]利用纳豆菌液态发酵法成功制备了蚕蛹抗炎活性多肽。其中,相对于其它方法,酶解法制备蚕蛹肽具有操作简便,酶切位点可控等优点,应用前景广阔^[9]。

目前,蚕蛹主要作为动物饲料使用,部分用于食品加工,产品有蛋白粉、氨基酸和蛋白纤维等,尚未得到有效的开发利用。国内外学者普遍认为肽中的组氨酸(His)、半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)和蛋氨酸(Met)与其金属螯合能力密切相关^[10]。资料显示,蚕蛹蛋白质中富含 Asp 和 Glu 等带电氨基酸,分别约占总氨基酸量的 10% 和 14%^[11],可为金属提供丰富的结合位点,提示其中蕴含锌螯合肽片段,是制备肽锌螯合物的良好原料。然而,目前尚未见蚕蛹肽锌螯合物的相关报道。因此,本文以蚕蛹为原料,利

用可控酶解技术制备活性肽,探索蚕蛹肽锌螯合物的制备工艺参数,并借助紫外光谱、荧光光谱、粒径分析、红外光谱及扫描电镜等技术手段进行结构表征,期望为补锌制剂的开发及蚕蛹的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蚕蛹 广西靖西鑫晟茧丝绸科技有限公司;甘氨酸、苯并戊三酮(茚三酮)、七水合硫酸锌 分析纯,上海国药制药集团;碱性蛋白酶 8.6×10^5 units/g,丹麦诺维信公司;其他分析试剂均为国产分析纯;MD34-500 透析袋 西安优博生物科技有限公司。

iCE 3500 AA 原子吸收光谱仪、Lumina 荧光光度计 美国 Thermofisher 公司;纳米粒度及 Zetasizer NANO-ZS Zeta 电位分析仪 英国马尔文仪器有限公司;高分辨场发射扫描电子显微镜 德国 Zeiss 公司;Vario EL cube 元素分析仪 德国 Elementar 公司;Fnortier-TGA4000 红外光谱仪 北京北分瑞利分析仪器(集团)有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蚕蛹肽的制备

1.2.1.1 蚕蛹蛋白的提取及预处理 参照 Zhou 等^[12]的方法使用正己烷脱脂,并采用碱溶酸沉法提取蚕蛹蛋白质,即于脱脂蚕蛹粉中加入氢氧化钠溶液(1 mol/L),质量体积比为 1:10,45 °C 搅拌 5 h,离心(8000 r/min, 10 min)取上清液,用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 4.0,室温搅拌 10 min,离心(8000 r/min, 10 min),取沉淀,用 500 Da 透析袋透析除盐后,冻干备用,即为蚕蛹蛋白。参照任子旭等^[13]的方法对蚕蛹蛋白进行超声波改性处理,具体操作如下:在(30±5) °C 条件下,用超声功率为 530 W 的超声波对浓度为 50 g/L 的蚕蛹蛋白溶液处理 35 min。

1.2.1.2 蚕蛹肽的制备 参考赵梓月等^[14]的方法利用碱性蛋白酶制备蚕蛹多肽。将经过超声波处理的蚕蛹蛋白溶液用蒸馏水配制成质量浓度为 10 g/L 的悬浮液,加入 1% 碱性蛋白酶,调整 pH8.0,于 50 °C 恒温水浴床中酶解(140 r/min)。酶解结束后,100 °C 水浴灭酶 10 min,冷却至室温,离心(8000 r/min, 10 min),取上清液,备用。通过对比不同酶解时间(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h)下酶解液对锌螯合率的变化,确定适宜的酶解参数。将此条件下制备的酶解液进行膜过滤(0.45 μm, 混合纤维膜)处理,调节蠕动泵转

速使膜板出口压力稳定在 0.2 MPa。收集小于 10 kDa 组分进行冻干备用,即为螯合用蚕蛹肽(Silk-worm Chrysalis Peptide, SCP),于 4 °C 冰箱中保存待用。

1.2.2 蚕蛹肽锌螯合物的制备 取一定体积的 10 mg/mL SCP 水溶液与一定的体积的硫酸锌($ZnSO_4$, 100 mg/mL)混合,调整至一定的 pH,置于恒温水浴摇床(140 r/min)中反应至所需时间。取出后冷却,加入 3 倍体积的无水乙醇,4 °C 静置过夜,离心(8000 r/min, 10 min),去除上清液,加入乙醇清洗沉淀 3 次以上,直至用氯化钡检测无硫酸根检出为止,冻干,备用。

1.2.3 不同因素对蚕蛹肽螯合锌能力的影响 为寻找蚕蛹肽螯合的最佳工艺参数,本研究对 $ZnSO_4$ 的质量比(1:0.125、1:0.25、1:0.33、1:0.5、1:1、1:2、1:3)、pH(3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、8.0)、螯合时间(20、40、60、80、100 min)以及温度(25、35、45、55、65 °C)等因素对螯合能力的影响进行分析,以期得到蚕蛹肽螯合物的最佳制备工艺。首先,在温度 50 °C, pH 6.5, 分别加入不同剂量的硫酸锌,反应 20 min,进行螯合率的测定。并在此基础上,探究不同 pH、螯合时间以及温度下肽对锌螯合率的变化。将最优条件下制备的肽锌螯合物(Silk-worm Chrysalis Peptide-Zinc, SCP-Zn)冻干,备用。

1.2.4 水解度的测定 采用茚三酮法测定水解度^[15]。取 0.5 mL 待测样品,加入蒸馏水补足至 2.0 mL,加入茚三酮试剂 1.0 mL,立即摇匀,沸水浴 15 min,冷却至室温,然后加入 5.0 mL 40% 乙醇,摇匀后,立刻于 570 nm 处测定吸光度值。使用蒸馏水为空白参比。采用甘氨酸制作标准工作曲线。水解度计算公式见下式:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 - \frac{C_h}{\frac{6.25 \times N}{h_{tot}} - C_m} \times 100$$

式中: h 表示被水解的肽键数; h_{tot} 表示蛋白质总肽键数; C_h 表示酶解液中的氨基含量, $\mu\text{mol/L}$; C_m 表示原料蛋白质中游离氨基的含量, mmol/g ; N 表示酶解液蛋白含量, mg/mL ; 6.25 表示蛋白换算系数; 蚕蛹的 $h_{tot}=8.09$ ^[16]。

1.2.5 锌螯合能力的测定 肽锌螯合能力的测定用螯合率来表示,螯合率(%)=(螯合锌含量/总锌含量) $\times 100$ 。

锌含量的测定采用 GB 5009.14-2017 原子吸收法。其中,螯合锌的提取采用乙醇沉淀法,如 1.2.2 所述。

1.2.6 蚕蛹肽锌螯合物的结构表征

1.2.6.1 紫外光谱分析 向 20 mL 5 mg/mL SCP 溶液中分别加入不同量的 $ZnSO_4$,使 Zn^{2+} 浓度为 0、1、2、4、8、16 mmol/L,室温反应 30 min 后,过 0.45 μm

混合纤维膜,取滤液备用。分别采用全自动紫外扫描仪于 200~500 nm 范围内分别进行全波长扫描,考察锌的加入量对蚕蛹肽中的分子外层电子跃迁情况的影响,进而探究肽锌螯合情况,采用去离子水调零。

1.2.6.2 荧光光谱分析 向 20 mL 5 mg/mL SCP 溶液中分别加入不同量的 $ZnSO_4$,使 Zn^{2+} 浓度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 mmol/L,室温反应 30 min 后,过 0.45 μm 混合纤维膜,取滤液备用。采用荧光光谱仪测定锌对肽内源荧光及肽构象的影响。测定条件如下:激发波长为 280 nm,发射波长为 300~500 nm,裂缝宽度为 10 nm, PMT 为 450 V^[4]。

1.2.6.3 形貌观察 采用高分辨率场发射扫描电镜测定新鲜制备的 SCP 和 SCP-Zn 的表面形貌。即将待测样冻干粉均匀喷涂于导电胶上,喷金后采用 FE-SEM 观察形貌。

1.2.6.4 元素组成分析 采用元素分析仪测定元素组成。样品前处理与形貌观测处理方法相同。

1.2.6.5 粒度分析 采用动态光散射技术(DLS)在 Nano-ZS 上测定 SCP-Zn 的粒径分布和多分散系数(PDI)。采用超纯水作为分散液稀释样品至 1 mg/mL,于 25 °C 下进行测定,每个样品至少平行测定三次以上。

1.2.6.6 傅里叶变换红外光谱分析 采用傅里叶变换红外光谱仪对 SCP-Zn 的二级结构进行测定,测定方法参考 Van 等^[17]和蔡沙等^[18]的方法进行改进。各取约 25 mg SCP-Zn 冻干粉及 SCP 冻干粉分别与 225 mg 溴化钾在研钵中磨匀,压成薄片后放入红外光谱仪进行扫描,扫描波长范围为 400~4000 cm^{-1} ,连续扫描 128 次,分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行方差分析与显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著,采用 Origin 软件制图。

2 结果与分析

2.1 酶解时间对肽锌螯合物形成的影响

以水解度和螯合率为指标考察酶解时间对肽锌螯合物形成的影响,如图 1 所示。结果显示,随着酶解时间的延长,水解度先逐渐增加后趋于稳定,这符合酶解反应的趋势^[18];同时,肽对锌的螯合率随着酶解时间的延长,呈现先增长后下降的趋势,6 h 酶解液对锌的螯合率最大(58.05%),显著高于其它时间点($P < 0.05$)。天然蛋白质内部蕴藏着丰富的生理活性肽段,酶解处理可有效将这些肽段释放出来,而酶的种类及酶解时间等酶解条件,直接影响着肽的种类及数量,最终决定了酶解液对锌的螯合能力。碱性蛋白酶来源于枯草杆菌,作为一种丝氨酸内切酶,酶切位点广,被广泛用于金属螯合肽的制备^[19],因此本研究选择碱性蛋白酶作为蚕蛹蛋白水解用酶。一方面,酶解时间是影响酶解产物锌螯合能力的重要因素,如分

别以芝麻蛋白^[20]、牡蛎蛋白^[4]和米糠蛋白^[21]为原料, 所制备的酶解液的螯合能力随着酶解时间呈现先增长后下降的趋势, 与本研究结果一致。这可能是由于酶解反应会释放金属螯合位点; 另一方面, 随着酶解反应的持续进行, 锌螯合位点与酶解液中的其他组分发生结合, 如半胱氨酸的巯基作为金属螯合位点之一, 易在酶解过程中发生氧化, 而丧失金属螯合能力^[22]。从图 1 可以看出, 蚕蛹蛋白的水解度与其对锌的螯合能力存在密切关系, 酶解 6 h 为蚕蛹锌螯合肽的最佳制备时间。

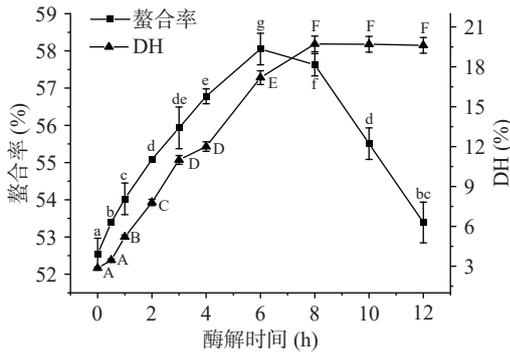


图 1 酶解时间对肽锌形成能力和水解度的影响

Fig.1 Effects of hydrolysis time on silkworm peptide-zinc complexation and degree of hydrolysis

注: 同一曲线上标注不同小写字母表示螯合率的差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示水解度的差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 蚕蛹肽锌纳米粒的制备工艺优化

为提高 SCP-Zn 的制备效率, 本研究对蚕蛹肽锌螯合条件进行探索, 如图 2 所示。从图 2 中可以看出, 肽锌质量比、pH 及温度对 SCP 和锌的螯合反应影响十分显著, 而反应时间则无显著影响。随着 SCP 与 $ZnSO_4$ 质量比从 1:0.125 增加至 1:0.33, 肽对锌的螯合能力保持稳定, 于 1:0.5 时螯合率骤然降至 66.3% (图 2A)。这说明蚕蛹肽对锌的螯合位点有限, 当质量比为 1:0.5 时, 肽中对锌的螯合位点已全部被 Zn^{2+} 占据。因此, 当继续增加 $ZnSO_4$ 时, 螯合锌的质量并不会持续增加。为保证有足够的 Zn^{2+} 与蚕蛹肽结合形成螯合物, 后续选择肽锌质量比为 1:0.5 进一步优化螯合物制备工艺。从图 2B 可知, pH 是影响肽和锌形成螯合物的重要参数。在不同 pH 下 (3.0~8.0), 蚕蛹肽对锌的螯合能力变化显著 ($P < 0.05$)。首先, 随着 pH 从 3.0 增加至 6.5, 肽锌螯合能力逐渐增加, 并于 pH 6.5 时达到最大值 (66.5%)。这可能是由于在酸性条件下, 溶液中的 H^+ 与 Zn^{2+} 竞争反应位点, 阻碍了肽与锌的螯合^[23]。另外, 当 $pH > 6.5$ 时, 溶液中的 OH^- 与 Zn^{2+} 结合, 形成沉淀, 从而导致螯合率下降^[24]。因此, pH 6.5 为蚕蛹肽锌螯合的最适 pH, 该结果与 Zhang 等^[4]的研究结果一致。图 2C 为反应时间对蚕蛹肽螯合锌能力的影响, 结果显示, 孵育时间对肽锌螯合能力无显著影响 ($P > 0.05$)。因此, 选择 20 min 为最佳螯合时间。由图 2D 可知, 温度对

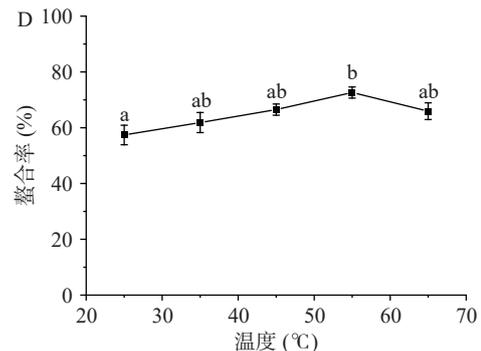
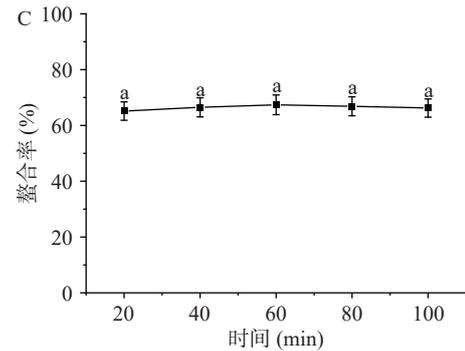
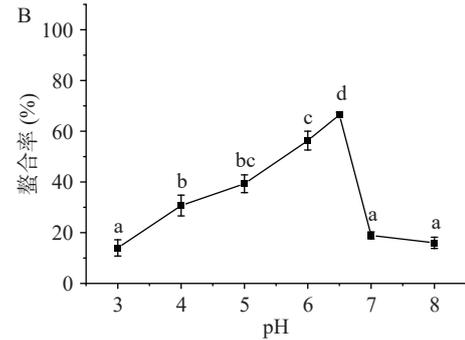
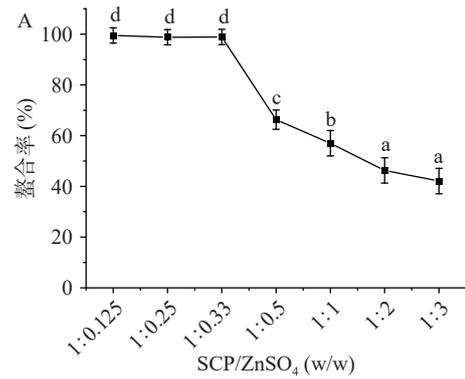


图 2 不同螯合条件对 SCP 的锌螯合能力影响

Fig.2 Effects of different chelating conditions on the zinc-binding capacity of SCP

注: 同一曲线上标注不同小写字母表示螯合率的差异显著 ($P < 0.05$)。

蚕蛹肽锌螯合能力影响较大。随着温度的增加, 蚕蛹肽对锌的螯合能力也随着增加, 并于 55 °C 时达到最大值 (72.63%), 随后下降。肽锌螯合属于吸热反应, 因此, 在 25~45 °C 内, 适当的加热有助于螯合反应的反应速率和平衡系数增大, 利于螯合反应的进行与肽的折叠和重组, 从而使得肽锌螯合能力增加; 而过度加热会造成多肽变性, 多肽中的配合位点丢失, 从而

导致肽锌螯合能力的下降^[25]。因此,螯合温度选择 55 ℃ 进行后续的螯合工艺优化试验。

因此,本研究确定最佳螯合工艺条件如下: SCP 与 ZnSO₄ 质量比为 1:0.5, pH6.5, 时间 20 min, 温度为 55 ℃。

2.3 蚕蛹肽锌螯合物的结构表征

2.3.1 紫外光谱分析 图 3 为在 SCP 中加入不同剂量的 ZnSO₄ 后所得紫外扫描光谱图。SCP 在 202 nm 出现强吸收峰;在 288 nm 处出现一个弱吸收峰。这两个吸收峰分别是由肽键上的发色基团(C=O) n→π*、π→π* 电子跃迁和酪氨酸的苯环引起^[17]。随着 ZnSO₄ 的加入,这两个吸收峰发生了移动和强度逐渐减弱的现象。如,最大吸收峰移至 198 nm; 288 nm 处的峰值随着络合反应的进行逐渐蓝移至 287 nm, 且吸光度值明显降低, 这表明 SCP 中的发色基团(-C=O, -COOH)和助色基团(-OH, -NH₂)因参与了螯合反应而发生偏振变化^[26]。大豆肽-锌螯合物^[27]和花生肽-锌螯合物^[28]也呈现出相似的紫外光谱变化。这说明 SCP 与锌发生了螯合反应。

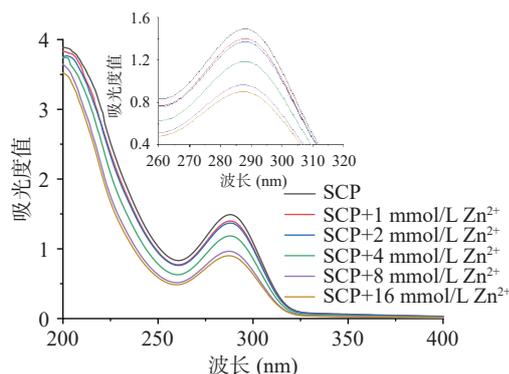


图 3 Zn²⁺的剂量对 SCP 紫外可见光谱的影响

Fig.3 Effect of zinc dosage on the Ultraviolet-visible spectrum of SCP

2.3.2 荧光光谱分析 由于蛋白质中含有苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)等可在一定波长下激发产生内源荧光的氨基酸,当蛋白质或多肽结构发生改变,如折叠或与小分子物质结合后,荧光强度即会发生改变,因此内源荧光强度的变化能够间接反映蛋白质或肽与 Zn²⁺的结合程度^[29]。图 4 为 Zn²⁺对

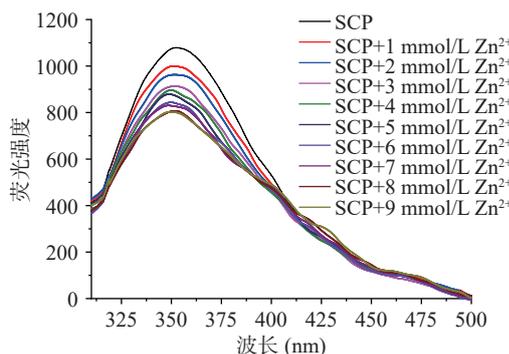
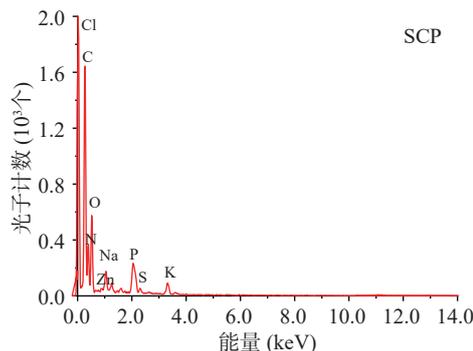
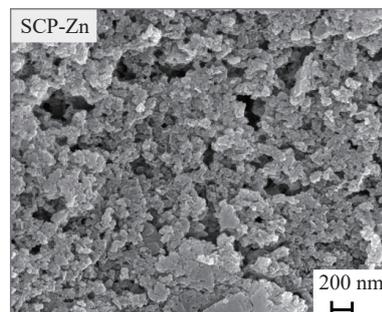
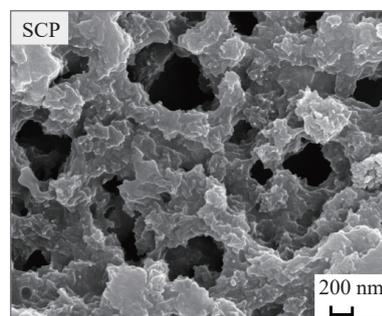


图 4 Zn²⁺的剂量对 SCP 荧光光谱的影响

Fig.4 Effect of zinc dosage on fluorescence spectrum of SCP

SCP 荧光光谱的影响,随着 Zn²⁺的增加,SCP 荧光光谱峰峰值逐渐降低,最终峰值趋于稳定。图中,随着 Zn²⁺浓度从 0 增加至 9 mmol/L,样品荧光强度从 1217.8 降低到 804.0。其中,当 1 mmol/L Zn²⁺加入时,样品的内源荧光强度下降幅度最大。资料显示,蛋白质或肽与金属螯合时易发生折叠,聚集现象,从而导致内源荧光淬灭^[26,30]。同时,由于肽的螯合位点有限,图 4 显示,Zn²⁺浓度达到 8 mmol/L 时,继续增加 Zn²⁺的量,荧光强度值无明显变化,说明此时 SCP 中的金属螯合位点完全被占据。该结果与 Meng 等^[31]报道一致,即 Zn²⁺的引入会使得罗非鱼胶原蛋白肽的内源荧光强度降低。

2.3.3 形貌观察及元素组成分析 从图 5 可以看出,SCP 和 SCP-Zn 的表面形貌有显著不同。SCP 呈现光滑的片状,而 SCP-Zn 呈颗粒状结构,且粒径均匀。造成这一变化的主要原因是金属离子与肽存在很强的相互作用,二者结合造成了肽的聚集。研究显示 Zn²⁺会加速肽的二聚反应,并稳定二聚体的结构,该聚合作用的作用力主要为分子间作用力、表面张力以及晶体的各向异性,而肽链中参与聚合的基团主要是-SH、-COOH 和-NH,三者通过分子间氢键参与聚合反应^[5,8,22]。此外,肽链中的氨基可与 Zn²⁺结合



SCP

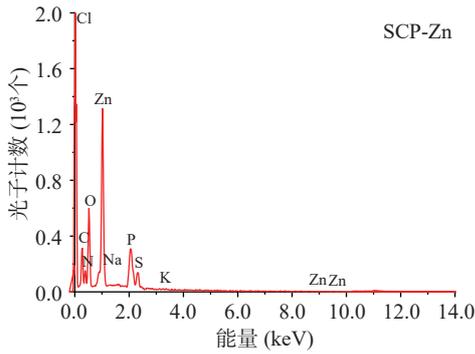


图 5 SCP 和 SCP-Zn 的扫描电镜图(SEM)

Fig.5 SEM images of SCP and SCP-Zn

发生脱水后形成环状结构, 使得肽中的亲水基团被隐藏于聚集体内部, 从而造成 SCP-Zn 具有一定的疏水性^[32]。

SCP 和 SCP-Zn 的表面元素组成分析显示, 两个样品中均含有 Cl、C、N、O、Na、Zn、P、S 和 K 等元素。为了便于分析肽锌螯合前后肽与锌组成比例的变化, 特将 C、N、O、Zn 四种元素提取出来, 并计算质量百分比, 如表 1 所示。SCP 中 C、N、O 三种元素占比高达 99.87%, Zn 仅占 0.13%, 而 SCP-Zn 中 C、N、O 三种元素占比为 62.54, 锌含量高达 37.46%。这说明, 肽与锌的成功螯合大大提高了肽中锌的含量。

表 1 SCP 和 SCP-Zn 的表面元素组成相对含量(%)
Table 1 Surface elemental compositions of SCP and SCP-Zn (%)

元素	SCP	SCP-Zn
C	24.49	46.29
N	13.47	29.79
O	24.57	23.79
Zn	37.46	0.13

2.3.4 粒径分析 粒径大小依赖于粒子的体积大小, 是表征待测物质物理性质的一个重要参数。表 2 显示, SCP 和 SCP-Zn 的平均粒径分别为 153.36±2.31 (PDI: 0.35±0.01) 和 71.99±0.67 nm (PDI: 0.27±0.05)。与 SCP 相比, SCP-Zn 的粒径显著降低, 且分布更加集中, 这说明在 SCP 和 Zn²⁺螯合后发生了折叠、聚集, 该结果与荧光光谱结论一致。另外, SCP-Zn 的 PDI 值小于 SCP, 进一步证实 SCP-Zn 粒径分布更为集中。Zheng 等^[33] 在椰子饼球蛋白肽-Zn 螯合物中也发现了类似的现象。

表 2 SCP 及 SCP-Zn 的粒径分布分析
Table 2 Size distribution of SCP and SCP-Zn

样品	平均粒径(nm)	PDI
SCP	153.36±2.31	0.35±0.01
SCP-Zn	71.99±0.67	0.27±0.02

2.3.5 红外光谱分析(FTIR) FTIR 是表征肽锌螯合物结合机制的一种有效方法, 峰强度变化及位移可

以反映肽与金属离子之间的作用位点^[24]。为更好的阐明 SCP 与 Zn 的螯合作用, 本研究运用 FTIR 对 SCP 和 SCP-Zn 进行检测。如图 6 所示, 与 SCP 相比, SCP-Zn 的红外光谱图发生了明显变化, 如由 N-H 伸缩振动和 O-H 伸缩振动产生酰胺 A 吸收峰从 3303 cm⁻¹ 移至 3273 cm⁻¹, 饱和碳的 C-H 吸收峰 2934 cm⁻¹ 消失, 主要由 C=O 伸缩振动引起酰胺 I 带 (1700~1600 cm⁻¹) 由 1650 cm⁻¹ 移至 1604 cm⁻¹, 主要反映 N-H 弯曲振动及 C-N 伸缩振动的酰胺 II 带 (1600~1500 cm⁻¹) 由 1556 cm⁻¹ 移至 1524 cm⁻¹, -COO-由 1408 cm⁻¹ 移至 1417 cm⁻¹, 而酰胺 III 带作为 C-N 伸缩振动及 N-H 平面内弯曲振动的主要反映^[34], 由 1239 cm⁻¹ 移至 1244 cm⁻¹, -C-O 吸收峰由 1022 cm⁻¹ 移至 1042 cm⁻¹。这说明, SCP 中含有 -COOH、-C=O 及 -NH₂, 而 SCP-Zn 中肽的 FTIR 谱图峰强度及位置的变化说明这些基团参与了螯合反应, 是 SCP-Zn 的主要螯合位点^[35]。国内外研究学者普遍认为肽中氨基酸残基的羧基是金属螯合的主要位点^[36]。如 Ca²⁺与海参卵肽的螯合位点、Zn²⁺与玉米肽的螯合位点均为 -COOH、-NH₂、-C=O^[37-38], Sun 等^[39] 采用 FTIR 发现, 肽中氨基的 N 原子和羧基的 O 原子是 Zn²⁺螯合的主要位点。

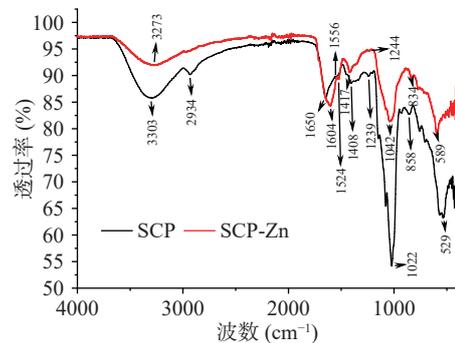


图 6 SCP 和 SCP-Zn 红外光谱分析
Fig.6 FTIR analysis of SCP and SCP-Zn

3 结论

本研究将蚕蛹肽和 Zn²⁺进行螯合, 以螯合率为主要指标, 采用单因素实验, 确定了蚕蛹肽制备的最佳酶解时间为 6 h, 肽锌螯合物的最佳制备工艺条件为肽锌比 1:0.5、pH6.5、温度 55 °C、时间 20 min, 此时螯合率达 72.63%。对蚕蛹肽与 Zn²⁺螯合前后进行结构表征发现, 锌的结合会引起蚕蛹肽发生偏振变化、荧光淬灭、表面形貌及元素组成的改变。SCP-Zn 为一纳米粒子, 其表面呈颗粒状结构, 锌相对含量高达 37.46%。红外光谱发现, Zn²⁺的主要螯合位点为肽链中的 -COOH、-C=O 及 -NH₂。本研究对丰富有机补锌制剂, 开拓蚕蛹加工途径, 提升蚕蛹价值提供理论依据。经制备而得的肽锌纳米粒是一混合物, 其中的有效活性组分有待于进一步分离、鉴定, 其胃肠稳定性及促锌吸收活性尚需进一步研究。

参考文献

- [1] DUAN M P, LI T, LIU B, et al. Zinc nutrition and dietary zinc supplements[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 63(9): 1277-1292.
- [2] MAXFIELD L, SHUKLA S, CRANE J S. Zinc Deficiency [DB/OL]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, (2023-6-8) [2023-9-6]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493231/>.
- [3] 李钰金, 赵元晖, 解万翠, 等. 食源性促锌吸收肽研究进展[J]. *食品科技*, 2019, 44(11): 62-67. [LI Y J, ZHAO Y H, XIE W C, et al. Research progress of foodborne zinc promoting peptides[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(11): 62-67.]
- [4] ZHANG Z R, ZHOU F B, LIU X L, et al. Particulate nanocomposite from oyster (*Crassostrea rivularis*) hydrolysates via zinc chelation improves zinc solubility and peptide activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 269-277.
- [5] PENG M Y, LU D, YU M, et al. Identification of zinc-chelating pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) peptides and *in vitro* transport of peptide-zinc chelates[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(5): 2048-2057.
- [6] DAI Y, HUANG M J, XU Y J, et al. Enzymatic hydrolysis of silkworm pupa and its allergenicity evaluation by animal model with different immunization routes[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(3): 774-782.
- [7] LI Z Y, ZHAO S, XIN X D, et al. Purification, identification and functional analysis of a novel immunomodulatory peptide from silkworm pupa protein[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(1): 243-249.
- [8] 沈圆圆, 于福田, 秦雅莉, 等. 纳豆菌液态发酵制备蚕蛹肽的工艺优化及其抗炎活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3): 162-171. [SHEN Y Y, YU F T, QIN Y L, et al. Optimization of liquid fermentation process for preparation of silkworm pupa peptide by *bacillus natto* and its anti-inflammatory activity[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(3): 162-171.]
- [9] MORA L, TOLDRÁ F. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2023, 49: 100973.
- [10] 石景, 邹焯, 马晶晶, 等. 食源肽螯合钙的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(11): 460-467. [SHI J, ZHOU H, MA J J, et al. Research progress of calcium chelated by dietary peptide[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(11): 460-467.]
- [11] 李少辉, 贾俊强, 桂仲争. 微细化-蛋白酶解对蚕蛹蛋白营养价值和功能特性的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(7): 181-187. [LI S H, JIA J Q, GUI Z Z. Effect of micronization-enzymatic hydrolysis on nutrition and functional properties of silkworm (*Bombyx mori*) pupa protein[J]. *Food Science*, 2018, 39(7): 181-187.]
- [12] ZHOU J, ZHENG D, ZHANG F, et al. Durable grafting of silkworm pupa protein onto the surface of polyethylene terephthalate fibers[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 69: 1290-1296.
- [13] 任子旭, 周志峰, 方银, 等. 用超声波改善蚕蛹蛋白性能的工艺条件优化及产品性能测试[J]. *蚕业科学*, 2015, 41(3): 548-554. [REN Z X, ZHOU Z F, FANG Y, et al. Optimization of technological conditions and product performance test for improving protein properties of silkworm chrysalis by ultrasonic wave[J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41(3): 548-554.]
- [14] 赵梓月, 王思远, 廖森泰, 等. 蚕蛹多肽螯合钙的制备工艺优化及结构表征[J]. *食品与机械*, 2019, 35(8): 20-26. [ZHAO Z Y, WANG S Y, LIAO S T, et al. Preparation and structural characterization of silkworm pupa peptide chelated calcium[J]. *Food and Machinery*, 2019, 35(8): 20-26.]
- [15] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. *中国油脂*, 2000, 25(6): 176-177. [GUO X F. Determination of proteolytic degree[J]. *China Oils and Fats*, 2000, 25(6): 176-177.]
- [16] 周志峰, 李少辉, 任子旭, 等. 超声波预处理蚕蛹蛋白的酶解动力学研究[J]. *蚕业科学*, 2017, 43(1): 112-117. [ZHOU Z F, LI S H, REN Z X, et al. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of silkworm pupa proteins by ultrasonic pretreatment[J]. *Science of Sericulture*, 2017, 43(1): 112-117.]
- [17] VAN DER VEN C, MURESAN S, GRUPPEN H, et al. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(24): 6943-6950.
- [18] 蔡沙, 何建军, 张国忠, 等. 蚕蛹蛋白酶解工艺及其水解产物抗氧化性[J]. *食品工业*, 2019, 40(6): 77-82. [CAI S, HE J J, ZHANG G Z, et al. Protease hydrolysis process of silkworm chrysalis and antioxidant activity of its hydrolyzed products[J]. *Food Industry*, 2019, 40(6): 77-82.]
- [19] TACIAS-PASCACIO V G, MORELLON-STERLING R, SIAR E H, et al. Use of alcalase in the production of bioactive peptides: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165(Pt B): 2143-2196.
- [20] WANG C, LI B, AO J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 1231-1238.
- [21] 康云, 刘昆仑. 米糠肽-铁锌螯合物制备工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(16): 6579-6585. [KANG Y, LIU K L. Preparation of rice bran peptide-iron zinc chelate[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(16): 6579-6585.]
- [22] UDECHUKWU M C, COLLINS S A, UDENIGWE C C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides[J]. *Food and Function*, 2016: 1010-1039.
- [23] HUANG H, FU M, CHEN M. Preparation, characteristics, and formation mechanism of oyster peptide-zinc nanoparticles[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2019, 18(4): 953-961.
- [24] ZHU S, ZHENG Y, HE S, et al. Novel Zn-binding peptide isolated from soy protein hydrolysates: Purification, structure, and digestion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 483-490.
- [25] SUN X, SARTESHNIZI R A, BOACHIE R T, et al. Peptide-mineral complexes: Understanding their chemical interactions, bioavailability, and potential application in mitigating micronutrient deficiency[J]. *Foods*, 2020, 9(10): 1402.
- [26] WANG X, ZHOU J, TONG P S, et al. Zinc-binding capacity of yak casein hydrolysate and the zinc-releasing characteristics of casein hydrolysate-zinc complexes[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(6): 2731-2740.
- [27] 郑英敏. 基于大豆酶解物锌配合物的发掘及肽-锌配合作用机理研究[D]. 广州: 广州大学, 2020. [ZHENG Y M. Exploration of zinc chelate peptide in soybean hydrolysates and study on the mechanism of peptide-zinc coordination [D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2020.]
- [28] LI C, BU G C, CHEN F S, et al. Preparation and structural characterization of peanut peptide-zinc chelate[J]. *CyTA-Journal of Food*, 2020, 18(1): 409-416.
- [29] NAVALE G R, RANA A, SAINI S, et al. An efficient fluorescence chemosensor for sensing Zn(II) ions and applications in

- cell imaging and detection of Zn(II) induced aggregation of PrP(106-126) peptide[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry*, 2023, 441: 114703.
- [30] PAULE S G, NIKOLOVSKI B, LUDEMAN J, et al. Ability of GHTD-amide and analogs to enhance insulin activity through zinc chelation and dispersal of insulin oligomers[J]. *Peptides*, 2009, 30(6): 1088–1097.
- [31] MENG K K, CHEN L, XIA G H, et al. Effects of zinc sulfate and zinc lactate on the properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen peptide chelate zinc[J]. *Food Chemistry*, 2021, 347: 129043.
- [32] ZHANG J P, TANG Y X, ZHOU S P, et al. Novel strategy to improve the bioactivity and anti-hydrolysis ability of oat peptides via zinc ion-induced assembling[J]. *Food Chemistry*, 2023, 416: 135468.
- [33] ZHENG Y J, GUO M, CHENG C X, et al. Structural and physicochemical characteristics, stability, toxicity and antioxidant activity of peptide-zinc chelate from coconut cake globulin hydrolysates[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114367.
- [34] BAI X Y, QIU Z C, ZHENG Z J, et al. Preparation and characterization of garlic polysaccharide-Zn (II) complexes and their bioactivities as a zinc supplement in Zn-deficient mice[J]. *Food Chemistry*, 2022, 15: 100361.
- [35] BAO Z J, ZHANG P L, SUN N, et al. Elucidating the calcium-binding site, absorption activities, and thermal stability of egg white peptide-calcium chelate[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2565.
- [36] CAETANO-SILVA M E, NETTO F M, BERTOLDO-PACHEO MT, et al. Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(9): 1470–1489.
- [37] SUN N, CUI P B, LIN S Y, et al. Characterization of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates: Calcium chelation, solubility and absorption into intestinal epithelial cells[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(13): 4604–4611.
- [38] 张智, 刘慧, 刘奇, 等. 玉米肽-锌螯合物结构表征及抗氧化活性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 131–135. [ZHANG Z, LIU H, LIU Q, et al. Structure characterization and antioxidant activity analysis of peptide-zinc chelates of maize[J]. *Food Science*, 2017, 38(3): 131–135.]
- [39] SUN R N, LIU X F, YU Y, et al. Preparation process optimization, structural characterization and *in vitro* digestion stability analysis of Antarctic krill (*Euphausia superba*) peptides-zinc chelate[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 128056.