

鲤鱼肌肉多肽金属螯合物的制备工艺及生物活性研究

摘 要

本研究以鲤鱼和七水合硫酸锌为实验材料制备多肽锌螯合物，即将鲤鱼肌肉蛋白经过风味蛋白酶和木瓜蛋白酶复合酶解获得多肽，并将此多肽与七水合硫酸锌按一定的条件进行螯合以制备相应的多肽锌螯合物。主要探讨了鲤鱼多肽锌螯合物的制备工艺条件及其生物活性。以抑菌圈直径大小为评价指标，研究了鲤鱼多肽与锌的质量比、螯合反应的 pH、时间和温度对螯合物抑菌活性的影响，从而全面优化制备多肽锌的工艺条件。经过正交试验最终确定了获得鲤鱼多肽锌螯合物的最佳工艺条件为肽锌质量比 1:1、螯合反应 pH 5.5、反应时间 40 min、反应温度 55 °C。此条件下的螯合物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌均有显著抗菌性，其抑菌圈直径分别为 13.00 mm 和 13.33 mm，此条件下螯合率为 47.3 %。对最佳螯合产物进行分离纯化后测得其对两菌的抑菌效果均有所提高，抑菌圈直径都达到了 14 mm，其抗氧化能力几乎为未螯合多肽的 2 倍，达到生育酚抗氧化活性的 60.50 %。红外光谱分析进一步证明多肽与锌螯合成新产物。

关键词：鲤鱼 多肽锌螯合物 制备工艺 抗菌性 抗氧化

Study on Preparation Technology and Bioactivity of Carp Muscle

Polypeptide Metal Chelates

Abstract

This research used carp and zinc sulfate heptahydrate as experimental material, obtained polypeptide from carp muscle proteins by composite enzymatic hydrolysis with papain and flavored proteinase, then made peptides and zinc according to certain conditions to produce the corresponding polypeptide-zinc chelates. It focuses on the preparation technology and biological activity of polypeptide-zinc chelates. Using inhibition zone diameter as evaluation, this paper studied the effects of mass ratio, pH, time and temperature in chelation reaction on the antibacterial activity of chelates in order to fully optimize the process conditions for polypeptide-zinc. By orthogonal test, the optimal conditions were determined: the mass ratio of peptide to zinc 1:1, pH 5.5, time 40min, temperature 55°C in chelation reaction. Under these conditions, the chelates has significant antimicrobial properties to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, the antibacterial diameter was 13.00 mm and 13.33 mm, respectively. In addition, the chelating rate was 47.3% in these conditions. After purified, the optimal chelation's bacteriostatic effect on two strains were all improved and reached 14 mm, its antioxidant capacity was almost twice the polypeptide and reached 60.50% of tocopherol. Infrared spectroscopy was further proved that polypeptide and zinc chelate into a new product.

Key words: carp; polypeptide-zinc chelates; preparation technology; antibacterial activity; antioxidation

目 录

1 引言	1
1.1 鲤鱼简介	1
1.2 多肽与金属离子螯合机理	1
1.3 多肽金属螯合物的制备方法及结构分析	1
1.4 多肽金属螯合物的生物活性	2
1.4.1 促进金属离子吸收	2
1.4.2 抗氧化活性	2
1.4.3 抗菌活性	3
1.4.4 其它生物活性	3
1.5 研究目的与意义	3
2 材料与方法	5
2.1 材料与试剂	5
2.2 仪器与设备	5
2.3 实验方法	5
2.3.1 鲤鱼肌肉蛋白的酶解	5
2.3.2 多肽锌螯合工艺优化及最佳参数确定	5
2.3.3 多肽锌螯合物分离纯化	6
2.3.4 多肽锌螯合物定性鉴定	6
2.3.5 多肽锌螯合物抗氧化能力测定	7
2.3.6 多肽锌螯合物抑菌活性测定	7
2.3.7 多肽锌螯合物红外光谱测定	8
3 实验结果分析	9
3.1 螯合工艺的优化	9
3.1.1 多肽与锌质量比对螯合物抑菌活性的影响	9
3.1.2 螯合 pH 对螯合物抑菌活性的影响	9
3.1.3 螯合时间对螯合物抑菌活性的影响	10
3.1.4 螯合温度对螯合物抑菌活性的影响	11

3.1.5 正交试验设计.....	12
3.1.6 正交验证试验.....	13
3.2 多肽锌螯合物分离纯化结果.....	14
3.3 多肽锌螯合物定性鉴定结果.....	15
3.4 多肽锌螯合物抗氧化能力确定.....	15
3.5 多肽锌螯合物抑菌能力确定.....	16
3.6 多肽锌螯合物红外光谱分析.....	16
4 讨论与总结.....	18
参考文献.....	20
致谢.....	22

1 引言

一些金属元素特别是微量元素，它们在人体内含量虽少^[1]，但对人体有特殊的生理功能和营养作用，对维持机体的生长发育及繁殖等不可缺少，与机体的疾病和健康有着非常密切的关系^[2]。由于人体不能自身合成微量元素，且目前世界上人们普遍存在缺铁、缺钙、缺锌等现象，故开发安全的金属元素补充剂具有重要意义。一些微量金属元素可与多肽结合形成螯合物，这些多肽金属螯合物除了具有营养性强、吸收快、生物效价高、能补充微量元素需要等优点外，还有抗菌、抗氧化、降血糖、降血脂和免疫调节等活性^[2]，因此具有很大的开发价值和研究意义，也逐渐成为国内外研究热点。

1.1 鲤鱼简介

鲤鱼，俗称鲤拐子、鲤子，学名 *Cyprinus carpio*，是鲤鱼目鲤鱼科属的淡水鱼，原产亚洲^[3]。其鳞大，上颌两边各有二须，通常是单独或以小群的形式生活在水草丛生且平静的河流、池塘或湖泊中^[4]。鲤鱼属杂食性底层鱼类，生长快，个体大，主要吃河蚬、螺蛳、水蚯蚓、摇蚊幼虫、水生昆虫和虾等，也吃水生高等植物的种子、幼芽、有机碎屑和各种人工精饲料^[3]。鲤鱼是我国重要的淡水养殖鱼类，养殖历史较久且范围较广^[5]。鲤鱼因产量高、抗病力强、耐低氧^[6]，其蛋白质含量高、氨基酸组成比例平衡^[7]且鲤鱼蛋白经酶解得到的小肽有吸收快、营养平衡、易于利用的特点^[8]，故具有较大的开发潜力和研究价值。

1.2 多肽与金属离子螯合机理

相关研究发现，多肽与金属离子间主要是通过配位作用形成螯合物，主要是通过多肽两端的氨基、羧基和肽链中的羰基、亚氨基以及侧链氨基酸的某些基团与金属离子在一定条件下配位结合而成^[9]。杨燊等^[10]对低值鱼蛋白多肽和其与钙的螯合物进行红外光谱测定分析，结果表明 Ca^{2+} 与多肽的氨基、羧基等都发生了较强的配位结合。另外，也有报道认为多肽与金属离子间除了配位结合还有离子键结合和多肽对金属离子的吸附^[11]。此外，多肽金属螯合物多以环状形式存在，这是由一个多肽中含有多个配位原子及这些原子与金属离子间以多个配位键结合决定的^[12]。

1.3 多肽金属螯合物的制备方法及其结构分析

目前，随着对多肽金属螯合物的研究越来越深入，其制备方法也逐渐成熟，主要有三步：提取蛋白、酶解蛋白获得多肽、将多肽与金属离子进行螯合。提取的蛋白一般都

为天然蛋白，期望通过研究提高这些蛋白的利用率。制备多肽通常有酶解法、化学合成法和溶剂提取法^[2]，但相比而言酶解法更安全、成本更低、更易操作，故成为主要使用方法。螯合过程中有很多因素会影响螯合产量或螯合物活性，如酶解工艺、多肽与金属离子质量比、螯合反应的 pH、温度和时间，对这些影响因素进行研究就可以优化制备高生物活性的螯合物。如姜良萍等^[13]探讨了鲢鱼源多肽锌制备工艺对其抑菌活性的影响，结果表明，制备抑菌型鲢鱼多肽锌的最佳工艺条件为风味蛋白酶酶解 6 h、多肽与氯化锌质量比 2:1、反应 pH 6.0、时间 45 min、温度 30 °C，在此条件下获得的螯合物有较好的抑菌性，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别是 12.50 mm 和 12.66 mm。

多肽金属螯合物结构会因水解所得多肽的复杂而变得复杂，故为研究螯合机制或螯合位点，有必要对其结构进行分析^[14]。常用的螯合物结构分析方法有紫外吸收光谱法、红外吸收光谱法、X 射线衍射、原子力显微扫描、核磁共振、空间结构分析等方法^[14]。

1.4 多肽金属螯合物的生物活性

1.4.1 促进金属离子吸收

目前，已有大量研究证明多肽金属螯合物具备促进金属离子吸收的功能。如郑炯等^[15]对同样缺铁贫血型的大鼠分别用等量的血红蛋白多肽螯合铁、葡萄糖酸亚铁和氯化亚铁进行灌胃，结果表明，血红蛋白多肽螯合铁可明显改善大鼠的缺铁性贫血及其生长，且补铁效果比葡萄糖酸亚铁和氯化亚铁都要好。Adamson^[16]、Kato 等^[17]也发现多肽能促进牙齿对钙的利用，这会有利于龋齿的治疗。对于多肽金属螯合物促进金属离子吸收的机制也已经有了较深入的研究，结果发现，金属离子在人体内必须与氨基酸或肽类等结合成有机态螯合物而被利用或存储^[18]，且这些螯合物具有多个优点：结构稳定可使金属离子在肠道吸收时不被其他养分吸附或沉淀；螯合物是通过生物体内多肽而非金属元素吸收机制，可避免在同一通道吸收时与其他无机金属离子发生竞争，也可使螯合物具备吸收快、效率高、能耗低、载体不易饱和等多肽吸收机制的优点^[19]。综上所述，多肽金属螯合物可通过多肽的吸收而增强人体对金属离子的吸收，故有望作为一种优良的微量金属元素补充剂运用到食品中。

1.4.2 抗氧化活性

大量研究表明，多肽与金属螯合后所得的产物具有了多肽原本没有或比多肽原本更高的抗氧化活性。如杨焱等^[10]研究发现低值鱼蛋白多肽与钙的螯合物比低值鱼蛋白多肽具有更高的抗氧化活性，达到了生育酚的 94.43 %。林慧敏等^[20]发现舟山海域马鲛鱼、带鱼、鲢鱼、梅童鱼 4 种低值鱼蛋白未螯合酶解物对超氧阴离子自由基等无明显清除作用，

而其与亚铁的螯合物对超氧阴离子自由基却呈现出不同程度的清除作用。因螯合物中的多肽来源于天然的动植物蛋白，故比化学抗氧化剂更安全可靠，因此在化妆品、食品等领域拥有巨大的应用前景。

1.4.3 抗菌活性

林慧敏等^[20]同样研究发现，舟山海域带鱼蛋白未螯合的酶解多肽没有抑菌活性，而经亚铁螯合后的产物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌都表现出了明显的抑菌效果。这说明多肽与金属离子螯合后具有了多肽原本没有的抗菌活性^[1]。也有一些多肽原本就具有一定抗菌性，与金属离子螯合后，可增强抗菌性。如 Dashper 等^[21]将锌离子与抗菌多肽 Kappacin（分离提取自牛奶）螯合后的多肽锌产物的抗菌性明显高于抗菌多肽 Kappacin。

霍健聪等^[22]在研究带鱼下脚料多肽亚铁螯合物的抑菌机理时发现，多肽亚铁螯合物通过在菌体外膜形成内外连通孔道而破坏膜结构，使得菌体内容物外泄，细菌死亡，也可能是多肽亚铁螯合物竞争性螯合细菌生长所需的铁元素而抑制菌体生长。对于多肽金属螯合物抑菌机理的研究还有待深入，但其在医药和食品行业的应用价值不容忽视。

1.4.4 其它生物活性

多肽金属螯合物除了具有上述生物活性外，还有很多其他的生物功能。如王秀丽等^[23]、刘安军等^[24-25]研究发现猪皮胶原蛋白多肽-铬（Ⅲ）螯合物具有降低糖尿病小鼠血糖、提高小鼠免疫功能和肝脏内 SOD 表达的作用。这些生物功能都为其在医药领域的应用提供了依据。

1.5 研究目的与意义

提高蛋白质的利用率以及拓展其应用领域一直是研究热点，其中蛋白质的水解就是一条有效途径^[1]。之前已有研究利用酶水解鱼肉蛋白制备抗氧化肽^[26]、降血压肽^[27]等多种有生物学功能的活性肽。微量元素在人体生命活动中有着不可替代的作用，是人和动物所必需的，其中的锌被称为生命元素。现代营养学研究表明，缺锌会使儿童生长迟缓、食欲不振、智能低下，会影响成人正常代谢而引起免疫力下降，引发多种疾病^[28]。故开发安全的锌元素补充剂十分必要。研究表明，锌等金属离子可在一定条件下与多肽反应生成多肽金属螯合物，它可以通过多肽的吸收机制而进入生物体内，且具有多个优点，如能给生物体提供一些重要氨基酸，与无机盐形式的微量元素相比，更易被生物体吸收^[29]。多肽锌螯合物高效、安全、水溶性良好，可作为锌的良好来源^[28]，而且已有研究证明其具有抗菌活性^[10]和抗氧化活性^[10,30]。本实验通过酶法水解鲤鱼肌肉蛋白，并与锌离子螯

合制备多肽锌，以抑菌能力为检测指标，研究螯合工艺（多肽与锌的质量比、螯合温度、时间及反应的 pH）对螯合物抑菌活性的影响，优化制备具高效抑菌活性的鲤鱼多肽锌的工艺,最终确定制备抑菌型多肽锌螯合物的最佳工艺条件，为拓宽鲤鱼等淡水鱼加工利用的途径，防止蛋白质资源浪费，并为开发一种可用于特殊人群的保健食品和新型安全的天然抗菌剂以及为新药开发提供一定的理论依据^[1]。

2 材料与amp;方法

2.1 材料与试剂

市售鲤鱼：常熟市金山农贸市场。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)：本校微生物实验室。

木瓜蛋白酶 (>1000u/mg protein)、风味蛋白酶 (>1000u/mg protein)：上海奥宇生物科技有限公司；维生素 E (Vitamin E)：上海蓝季科技发展有限公司；七水合硫酸锌 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)、无水乙醇 (C_2H_5OH)：分析纯，江苏强盛功能化学股份有限公司；牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、琼脂条、酵母提取物、氯化钠等：国药集团化学试剂有限公司；亚油酸 ($C_{18}H_{32}O_2$)：国药集团化学试剂有限公司；诺氟沙星 (Norfloxacin)：上海三维制药有限公司。

2.2 仪器与设备

DF-101B 集热式磁力加热搅拌器：金坛市医疗仪器厂制造；EL104 电子天平：梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司制造；PHSJ-4A 实验室 PH 计：上海精密科学仪器有限公司制造；HC-3018 型高速离心机：安徽中科中佳科学仪器有限公司制造；LGJ-10 冷冻干燥机：宁波新芝生物科技股份有限公司制造；可见分光光度计 (722)：上海菁华科技仪器有限公司制造；调节式万用电炉：上海波络实验设备有限公司制造；无菌操作台：苏州佳宝净化工程设备有限公司制造；GHP-9080 隔水式培养箱：上海申贤恒温设备厂制造；NICOLET 380 傅立叶变换红外光谱仪：美国 Thermo 公司制造。

2.3 实验方法

2.3.1 鲤鱼肌肉蛋白的酶解

将鲤鱼清洗干净后去头、去鳞、去皮、去内脏，收集其白肌肉后绞碎。将粉碎物与蒸馏水按 1:7(w/v)混合，调 pH 7.0，再按照酶与底物配比 1/100(w/w)的比例加入木瓜蛋白酶和风味蛋白酶的复合酶进行酶解反应，用磁力搅拌机在 50 °C 下酶解 6 h，反应过程中用 0.5 mol/L 的 HCl 和 NaOH 来维持 pH 稳定，反应结束后用沸水浴使酶灭活大约 10 min，之后再以 8000 r/min 的转速离心 15 min，离心完成后去除沉淀物^[1]，将上清液过滤后再用冷冻干燥机进行冷冻干燥，制成冻干粉，保存于 -80 °C 下，待用。

2.3.2 多肽锌螯合工艺优化及最佳参数确定

(1) 螯合工艺流程^[1]: 鲤鱼白肌肉水解物→按比例加入 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ →搅拌→调节 pH→在一定温度下振荡合成一定时间→离心后取上清液→乙醇沉淀→离心后取沉淀(多次操作)→冷冻干燥→多肽锌螯合物。

(2) 具体操作步骤: 取酶解所得的鲤鱼多肽冻干粉 200 mg 置于 50 ml 小烧杯中, 然后加入 10 ml 蒸馏水, 制成浓度为 20 mg/ml 的多肽溶液, 按一定的多肽与锌质量比加入 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 搅拌至完全溶解, 然后用 HCl 和 NaOH (均为 0.5 mol/L) 调节溶液的 pH 至所需值, 之后放于磁力搅拌机上在一定的温度下反应到所需时间。反应结束后离心去沉淀, 取清液加入无水乙醇至其体积分数为 80%, 搅拌后静置 10 min 左右, 然后在 8000 r/min 的转速下离心 10 min, 去上清, 再用适量乙醇洗涤、离心几次^[1], 直至上清液用双硫脲检测和茚三酮加热检测无颜色反应, 所得沉淀经冷冻干燥后-80 °C 保存, 备用。

(3) 工艺优化及最佳参数确定具体方法: 以多肽与锌的质量比、螯合反应的 pH、温度及时间为四个单因素分别进行螯合以及相应产物的抑菌实验, 以对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径大小作为评价抑菌活性指标, 从而依次选出较适的条件, 然后进行四因素三水平的正交试验, 优化制备具高效抑菌能力的多肽锌。其中, 每组进行三次重复实验, 取其平均值。

(4) 螯合率测定: 采用 EDTA 络合滴定法。

$$\text{螯合率}/\% = (\text{锌离子总量}/\text{mg} - \text{游离锌质量}/\text{mg}) / \text{锌离子总量}/\text{mg} \times 100$$

2.3.3 多肽锌螯合物分离纯化

将鲤鱼多肽锌螯合物用适量纯水溶解后离心取上清液, 上清液再过 0.22 μm 的滤膜, 然后用 Sephadex G-75 凝胶柱分离纯化, 用蒸馏水洗脱, 用收集器收集, 然后在 215 nm 处测各管的吸光值, 然后作图, 选出峰所对应的收集管, 将里面的样品溶液冷冻干燥, 以备测定其生物活性。

2.3.4 多肽锌螯合物定性鉴定

采用硫化钠法^[31]。

具体方法: 取一定量纯化后的多肽锌螯合物样品放入两个烧杯中, 编号 1 和 2。

①向 1 号烧杯加入适量蒸馏水溶解, 然后加入数滴茚三酮并加热 3 min, 观察溶液颜色是否变化。

②向 2 号烧杯中加入适量蒸馏水, 待其溶解后再加入过量硫化钠, 玻棒搅匀后静置, 观察是否有白色沉淀产生。

③若 2 号烧杯有沉淀产生，过滤，在滤液中再加入 5 滴茛三酮并加热，观察是否有颜色变化。

2.3.5 多肽锌螯合物抗氧化能力测定

采用硫代巴比妥酸法^[32]。

具体步骤：取 25 ml 的试管四个，向其中分别加入亚油酸样品 200 μ l、99.5 %的乙醇 10 ml、50 mol/L 的磷酸缓冲液（pH=7.0）10 ml，然后在此混合液中分别加入 50 mg 的样品（依次为纯水、生育酚、多肽、多肽金属螯合物），并用蒸馏水定容到 25 ml，分别贴上相应的标签，然后均置于 40 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养一周。参考 Ohkawa 等的方法配制 TBA 溶液。包括 0.8 ml 的水、0.2 ml 的 8.1 % SDS 以及 1.5 ml 的 20 %醋酸。用 NaOH 和配好的 1.5 ml 0.8 % TBA 调 pH 为 3.5。在混合液中各加入 50 μ l 的氧化性亚油酸溶液，并在 5 $^{\circ}$ C 下培养 1 h，然后在 100 $^{\circ}$ C 下加热 1 h，随后用分光光度计在波长 535 nm 下测定其吸光度。结果用该混合液对亚油酸标品的氧化抑制率来表示,并与 α -生育酚标准品的抗氧化效果作对照比较，从而得出多肽和多肽金属螯合物的抗氧化活性。

抑制率的计算公式：

$$\text{抑制率}(\%) = (A - B) / (A - C) \times 100$$

式中，A 为加 50 μ l 去离子水与 0.2 ml 亚油酸混合液的吸光度；

B 为加 50 mg 样品与 0.2 ml 亚油酸混合液的吸光度；

C 为加 50 μ l α -生育酚与 0.2 ml 亚油酸混合液的吸光度。

2.3.6 多肽锌螯合物抑菌活性测定

配制培养基^[1]：牛肉膏蛋白胨液体培养基：牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g，蒸馏水 1000 mL，1 mol/L 的 NaOH 和 HCl，pH 7.4 左右；LB 固体培养基：胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，氯化钠 10 g，琼脂 15~20 g，蒸馏水 1000 mL。配好的培养基均需经 121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 20 min 左右。

活化实验菌种：超净工作台紫外灭菌结束后，用灼烧灭菌后冷却的接种环挑取适量实验菌体接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基中，摇匀，并在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养 18~24 h 使其活化^[1]，之后用无菌生理盐水将活化好的菌液进行适当稀释（用平板菌落计数法计数），然后配制成浓度为 10^6 cfu/mL 的细菌悬液，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。

抗菌能力检测：采用滤纸片法^[13]。称取 80 mg 多肽锌样品于 EP 管中，用移液枪加入 1000 μ L 的无菌水，配制成 80 mg/mL 的多肽锌样品溶液。将已灭菌的 LB 固体培养基在水浴锅内加热至完全溶解，然后冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右，在超净工作台上倒入已灭菌的培养皿

内，每皿大约 20 mL，待其冷却凝固后，向每个培养皿内加入约 200 μL 已制备好的菌悬液，并用灭过菌的涂布棒将菌液迅速涂匀^[1]。然后将待用的已灭菌 5 mm 滤纸片均匀地放到培养基上，并在皿底做上相应标记，接着分别用无菌移液枪吸取 10 μL 已配制的样品溶液缓慢滴加到已标记的相应滤纸片上，待其扩散均匀。最后放到 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 24 h，测量抑菌圈直径。

2.3.7 多肽锌螯合物红外光谱测定^[10]

测定鲤鱼多肽和鲤鱼多肽锌螯合物的红外光谱并进行比较。将需用的研钵和压片模具等用酒精擦拭一下并放在红外灯下烘干。每次取样品（多肽冻干粉、多肽锌螯合物冻干粉）2 mg，放入玛瑙研钵中，再加入干燥的光谱纯 KBr 200 mg，在红外灯下混合研磨均匀至粒度小于 2.5 μm ，然后用药匙挑取适量装入压片模具，抽气加压，在 40 MPa 下维持 3 min 左右，卸掉压力后轻轻取出制得的样品片，合格的样品片应呈透明薄片状。将合格的透明样品片放入样品架，使用 NICOLET 380 傅立叶变换红外光谱仪测定光谱，进行定性分析。

3 实验结果分析

3.1 螯合工艺的优化

3.1.1 多肽与锌质量比对螯合物抑菌活性的影响

多肽与锌离子的质量配比是影响两者螯合的重要因素。设定螯合反应条件：螯合温度 50 °C、时间 50 min、pH 5.0；设置多肽与锌质量比梯度：0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1。

在上述条件下分别进行螯合，产物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌结果如图 1 所示。

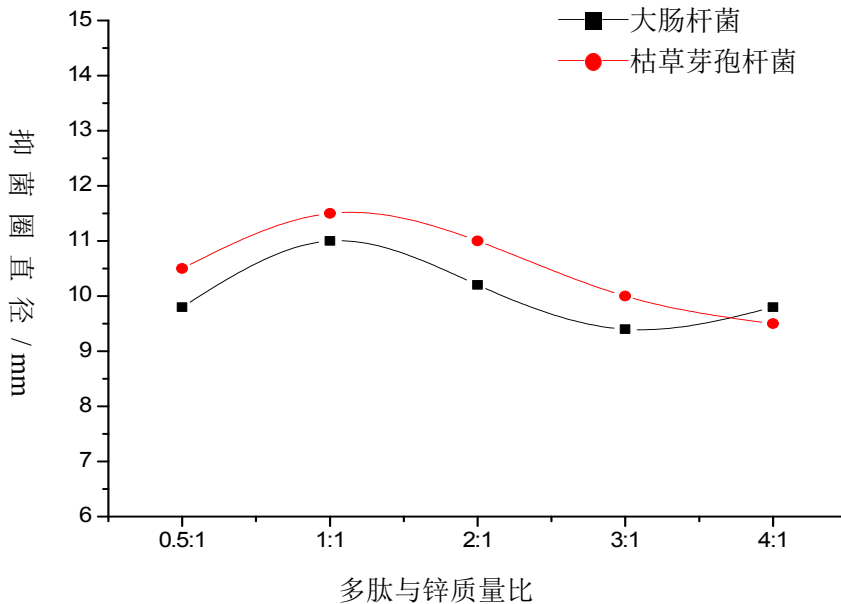


图 1 多肽与锌质量比对螯合产物抑菌活性的影响

图 1 显示的是肽锌质量比对螯合物抑菌能力的影响。从图 1 可看出，一开始随着多肽与锌质量比增加，螯合产物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性均增加；当两者质量比达到 1:1 时，螯合产物对两种菌的综合抑菌效果明显高于其他条件，达到最好；而随着质量比继续增大，螯合产物对两种菌的总抑菌效果呈下降并趋于平缓趋势。可能原因是质量比过小时，螯合反应原料接触机会少，得到的螯合产物不稳定，即不能构成稳定环状结构，而抑菌活性需要稳定的结构；而质量比过高时，锌离子与多肽分子中配位基团结合受阻，会使配合作用几率降低，从而会使多肽利用率降低，浪费多肽 [33-34]。因而，选择多肽与锌质量比为 1:1 较合适。

3.1.2 螯合 pH 对螯合物抑菌活性的影响

根据上述结果，选择多肽与锌质量比为 1:1、螯合温度 50°C、时间 50 min；设置螯合

pH 梯度：4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。在上述条件下分别进行螯合，研究不同酸碱度对鲤鱼多肽锌螯合产物抑菌性能的影响。最终螯合产物对两种菌的抑菌效果如图 2 所示。

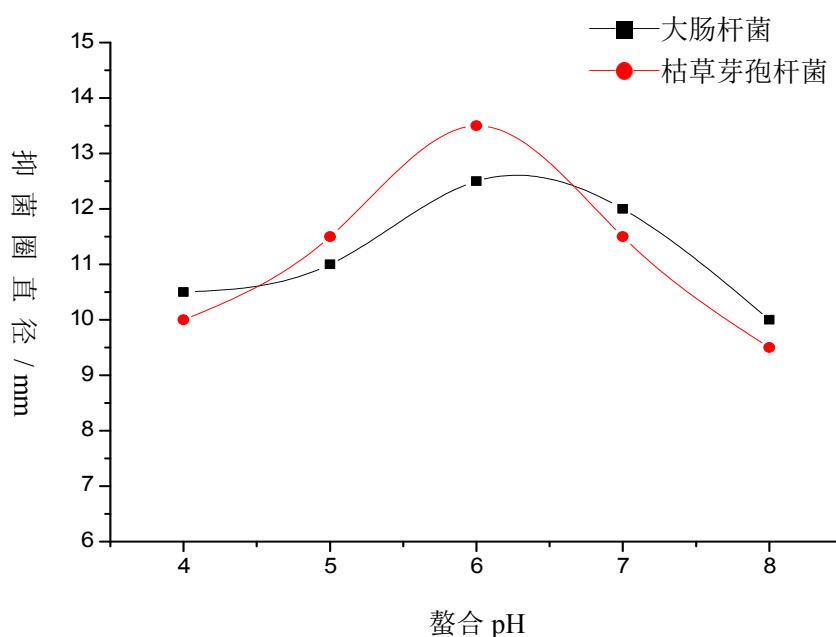


图 2 螯合反应 pH 对螯合产物抑菌活性的影响

图 2 为多肽与锌螯合反应的 pH 对螯合物抑菌活性的影响。从图中可以看出，反应体系的 pH 对多肽锌螯合物的抑菌活性影响显著。总体看来，随着 pH 的增加，螯合产物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌两种菌的抑菌效果均先升高后下降，在 pH 为 6 时综合抑菌效果达到最好。主要原因可能是 pH 较低时， H^+ 较多，它会与锌离子竞争供电子基团，这将阻碍多肽锌的生成，从而使得螯合产物的抑菌效果相对较低^[1]；而在 pH 较高时， OH^- 较多^[1]，它会与多肽竞争结合锌离子而形成 $Zn(OH)_2$ 沉淀，该沉淀可经反复水洗、醇洗除去^[35]，但这既会使多肽锌螯合物的生成率降低，也会使螯合物可能混入少量的无抑菌活性的该沉淀^[13]，从而使得多肽锌螯合物的抑菌活性降低。故综合考虑，螯合反应的 pH 选 6.0 较合适。

3.1.3 螯合时间对螯合物抑菌活性的影响

螯合反应时间的长短对螯合产物的生成和其抑菌活性也会产生一定影响，故选择合适的多肽与锌螯合时间也很重要。根据前述实验结果，选择多肽与锌质量比为 1:1、螯合 pH 6.0、螯合温度 50 °C，设置螯合时间梯度：30 min、40 min、50 min、60 min、70 min。在上述条件下进行多肽与锌螯合，研究不同螯合时间对螯合物抑菌活性的影响，相应螯合物对两种菌的抑菌结果如图 3 所示。

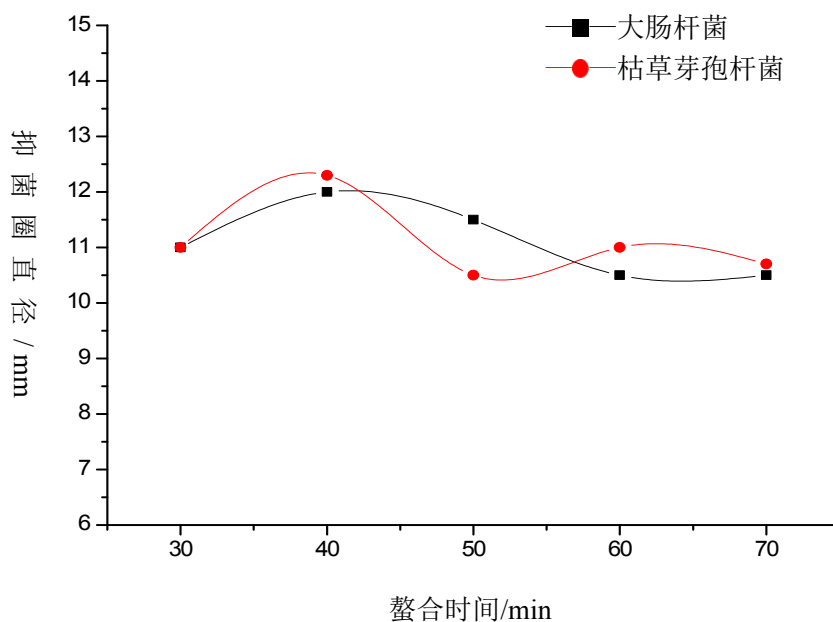


图3 螯合反应时间对螯合产物抑菌活性的影响

图3描述了多肽与锌螯合时间的长短对产物抑菌效果的影响。从图3中能够看出，起初随着螯合时间的延长，多肽锌螯合物对两种菌的抑菌效果都增强，在40 min时达到最高，之后随着时间的延长，抑菌活性均下降，但总体的变化趋势还是较平缓。原因可能是螯合反应达到40 min时，多肽与锌离子螯合已完成，此时的产物抑菌活性最高；之后再继续螯合，因螯合已完成一般来说螯合物的抑菌活性应保持不变，而图上显示的是稍有降低，可能是环境条件的影响使得螯合物发生一定程度的分解，从而使得抑菌效果降低。因此，选择螯合时间为40 min最佳。

3.1.4 螯合温度对螯合物抑菌活性的影响

根据前面的实验结果，固定螯合反应中多肽与锌质量比为1:1、pH 6.0、螯合时间40 min，设置螯合温度梯度：30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C。在上述条件下，研究不同的螯合温度对多肽锌螯合物抑菌活性的影响，结果如图4。

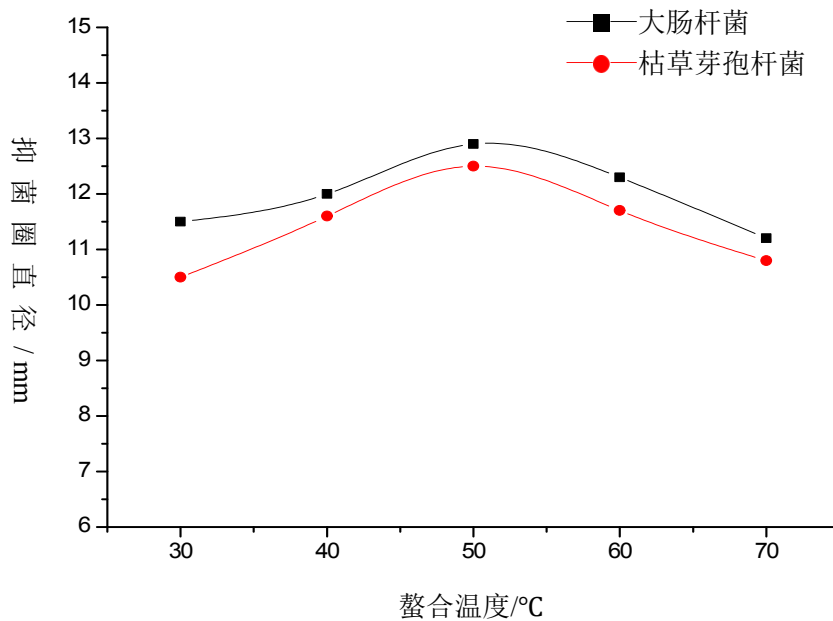


图4 螯合反应的温度对螯合产物抑菌活性的影响

图4反映了不同温度下的螯合产物的抑菌能力。由图4可以看出，多肽锌螯合物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果随螯合温度的升高先上升，原因可能是在低温范围内，分子运动速度会随温度升高而加快，多肽与锌接触几率增加^[36]；在50°C时，对两菌的抑菌效果达到最大；之后随温度上升抑菌活性又下降，可能是温度过高使得分子运动过快，反而不利于两者结合^[36]，也可能是一些有抑菌活性的多肽锌螯合产物发生了一定程度的分解^[37]，使得高温下螯合产物的抑菌能力降低。所以，螯合最佳温度为50°C。

3.1.5 正交试验设计

根据单因素实验结果，对多肽与锌质量比、螯合pH、时间、温度四个因素进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验，实现制备有高抑菌活性的鲤鱼多肽锌螯合物的螯合工艺优化。正交实验因素水平见下表1。正交试验结果见表2。

表1 正交试验因素与水平

水平	因素			
	A 多肽与锌质量比	B 螯合 pH	C 螯合时间 (min)	D 螯合温度 (°C)
1	0.75:1	5.5	35	45
2	1:1	6.0	40	50
3	1.25:1	6.5	45	55

表 2 正交试验结果

试 验 号	因 素				对两种菌的抑菌圈直径 (mm)	
	A 多肽与锌质量比	B 螯合 pH	C 螯合时间 (min)	D 螯合温度 (°C)	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
1	1	1	1	1	10.50	11.50
2	1	2	2	2	10.00	10.33
3	1	3	3	3	11.83	10.67
4	2	1	2	3	13.00	13.33
5	2	2	3	1	11.67	12.17
6	2	3	1	2	10.50	10.83
7	3	1	3	2	11.00	10.67
8	3	2	1	3	9.50	9.83
9	3	3	2	1	10.00	10.00
K_1	10.777	11.500	10.167	10.723		
K_2	11.723	10.390	11.000	10.500		
K_3	10.167	10.777	11.500	11.443		
R	1.556	1.110	1.333	0.943		
K_1'	10.833	11.833	10.720	11.223		
K_2'	12.110	10.777	11.220	10.610		
K_3'	10.167	10.500	11.170	11.277		
R'	1.943	1.333	0.500	0.667		

注： K_1 、 K_2 、 K_3 、 R 为鲤鱼多肽锌螯合物对大肠杆菌的抑菌圈直径对应的参数；

K_1' 、 K_2' 、 K_3' 、 R' 为鲤鱼多肽锌螯合物对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径对应的参数。

表 2 为正交试验结果，从中可以看出，影响螯合产物抑菌活性的四个因素中，影响对大肠杆菌抑菌直径的主次顺序是 $A>C>B>D$ ，即多肽与锌质量比最重要，螯合反应的时间次之，然后是 pH，螯合温度影响最小。比较均值大小得最优组合 $A_2B_1C_3D_3$ ，即多肽与锌质量比为 1:1，pH 为 5.5，螯合时间 45 min，温度 55 °C 时对大肠杆菌的抑菌圈直径最大，即抑菌效果最好。影响对枯草芽孢杆菌抑菌直径的因素主次顺序为 $A>B>D>C$ ，即多肽与锌质量比>螯合 pH>温度>螯合时间。其最佳实验方案是 $A_2B_1C_2D_3$ ，即质量比 1:1，pH 5.5，时间 40 min，温度 55 °C 时对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最佳。

3.1.6 正交验证试验

根据正交试验结果，对其中对大肠杆菌抑菌圈最大（13 mm）的组合 $A_2B_1C_2D_3$ 与比较均值大小而得的最佳组合 $A_2B_1C_3D_3$ 进行对比验证试验，进行三次平行实验，取其平均值，结果见表 3。

表 3 正交验证试验结果表

试 验	因素				对大肠杆菌 抑菌圈直径 (mm)
	A 多肽与锌质量比	B 螯合 pH	C 螯合时间 (min)	D 螯合温度 (°C)	
1	1:1	5.5	40	55	13.00
2	1:1	5.5	45	55	13.17

表 3 为验证实验结果，由表 3 可以看出，比较均值得到的最佳组合的螯合产物对大肠杆菌的抑菌圈与正交试验结果中的最大抑菌圈直径相近，而且考虑到工艺生产中在获得最佳产物的同时要尽量节约时间，还要考虑到综合抑菌效果，所以选择对大肠杆菌抑制最佳螯合工艺为 $A_2B_1C_2D_3$ ，与枯草芽孢杆菌一样。故综合考虑，本实验选取获得抑菌活性最高的最佳螯合工艺为 $A_2B_1C_2D_3$ ，即鲤鱼多肽与锌质量比 1:1，pH 5.5，时间 40 min，温度 55 °C，在此条件下获得的螯合物综合抑菌效果最好，对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径分别为 13.00 mm 和 13.33 mm，且此条件下的螯合率为 47.3 %。

3.2 多肽锌螯合物分离纯化结果

为使鲤鱼多肽锌螯合物的生物活性测定结果更可靠，需要对螯合物进行分离纯化，结果如图 5。

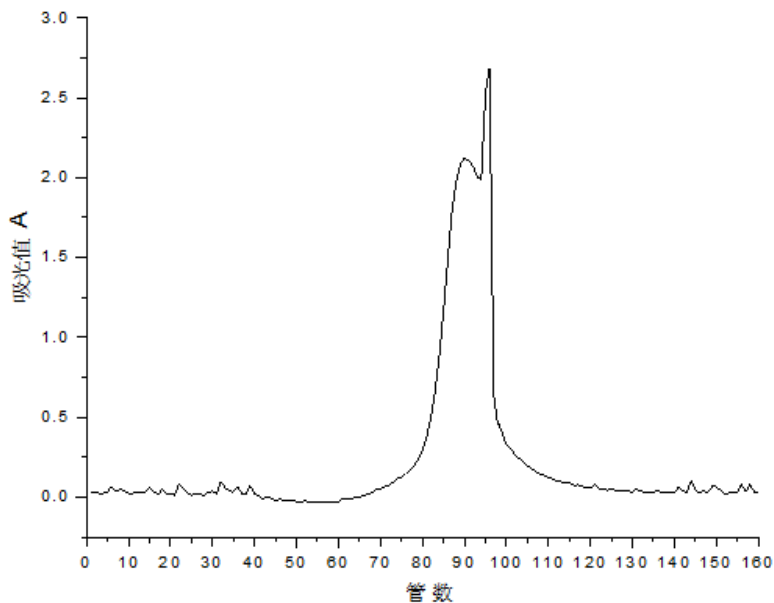


图 5 多肽锌螯合物 Sephadex G-75 凝胶层析分离图

图 5 为最佳螯合工艺下制备的多肽锌螯合物经葡聚糖凝胶过滤层析后测得各管吸光值而作的图。从图中可以看出，多肽锌螯合物被洗脱出两个相近的峰，这两个峰对应的管内应该就是多肽锌螯合物。因主要是研究螯合物的生物活性，故经多次上样后，将峰所对应的收集管内的液体直接收集起来，进行冷冻干燥，以备后续实验使用。

3.3 多肽锌螯合物定性鉴定结果

多肽锌螯合物定性鉴定结果见下表 4。

表 4 螯合产物定性鉴定结果表

步骤	实验现象	实验结果
①	溶液颜色不变	没有游离多肽
②	有沉淀产生	生成了硫化锌沉淀
③	溶液变成蓝紫色	有游离多肽产生

从表 4 可以看出，各步的现象与多肽金属螯合物的定性检测现象均相符，故可确定本实验制品是多肽锌螯合物。

3.4 多肽锌螯合物抗氧化能力确定

实验测得相应的 $A=0.4380$ ， $B_{\text{多肽}}=0.3579$ ， $B_{\text{多肽锌}}=0.2854$ ， $C=0.1856$ 。根据公式抑制率($\%$)= $(A-B)/(A-C) \times 100$ 计算，并以生育酚为对照，得出的鲤鱼多肽及多肽锌螯合物的抗氧化能力如图 6 所示。

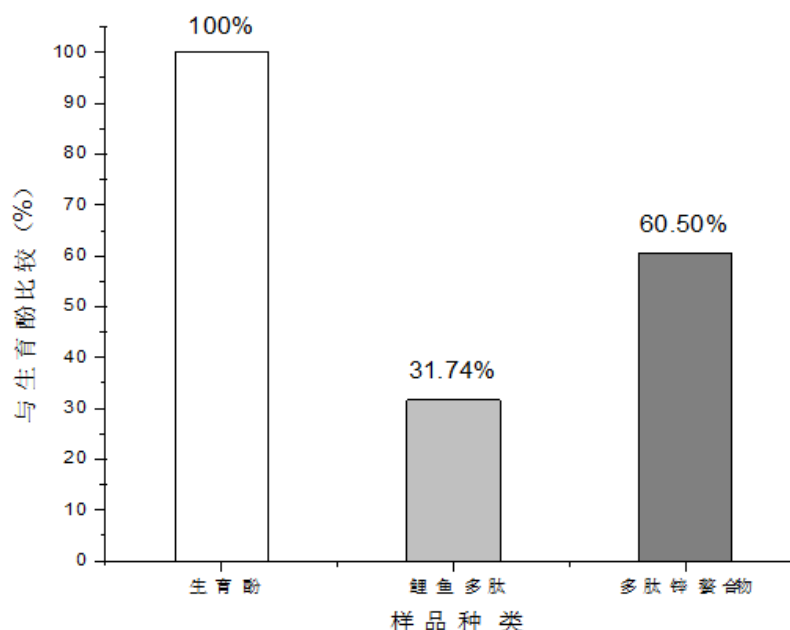


图 6 鲤鱼多肽与多肽锌的抗氧化活性

图 6 为鲤鱼多肽与多肽锌螯合物抗氧化活性检测结果。从图中可以看出，鲤鱼多肽

和其多肽锌螯合物都具备一定的抗氧化能力，但多肽锌螯合物的抗氧化能力明显高于未螯合的鲤鱼多肽，鲤鱼多肽抗氧化能力为生育酚的 31.74 %，而多肽锌达到了生育酚抗氧化效果的 60.50 %。

3.5 多肽锌螯合物抑菌能力确定

对纯化后的最佳鲤鱼多肽锌螯合物进行抑菌活性检测，并与纯水、七水合硫酸锌、鲤鱼多肽和诺氟沙星的抑菌活性进行比较，结果如图 7。

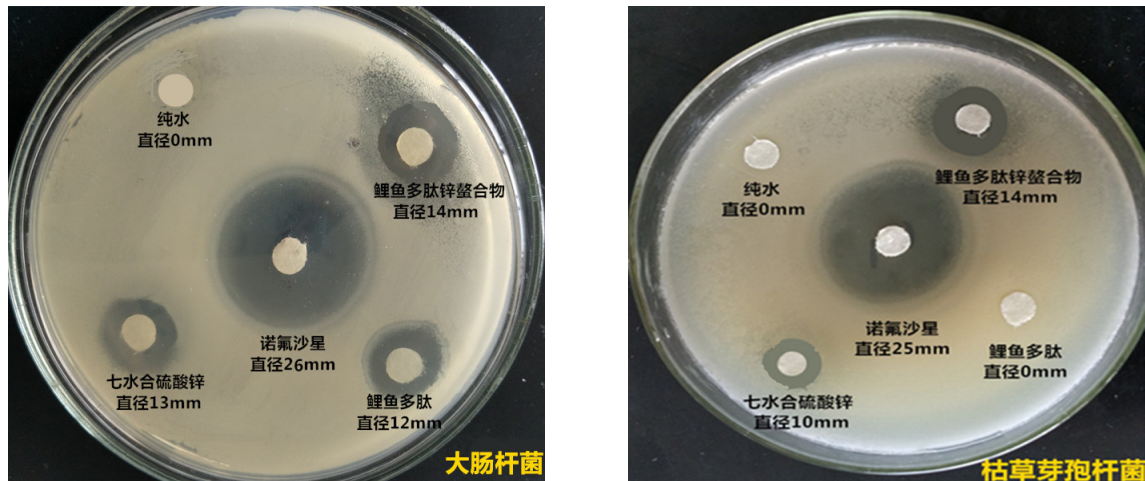


图 7 鲤鱼多肽锌螯合物纯化后的抗菌活性对比检测图

从上图中所得结果与正交实验结果对比发现，纯化后的多肽锌螯合物的综合抑菌效果有所增加，对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径都达到了 14 mm，原因可能是纯化步骤去除了部分无抑菌活性的杂质，使得多肽锌浓度变大，抑菌效果也就因此增强。同时对比上图还发现，诺氟沙星的抑菌效果最好，纯水对两菌都无抑制效果，而所用的材料七水合硫酸锌对两菌均有一定抑制效果，鲤鱼多肽对大肠杆菌有抑制但对枯草芽孢杆菌无抑制，综合来看，多肽锌螯合物纯化后对两菌的抑菌能力低于诺氟沙星但相比于纯水和未螯合原料有所提高，这表明鲤鱼多肽锌有望作为一种安全天然的抗菌剂来开发利用。

3.6 多肽锌螯合物红外光谱分析

分别测定了鲤鱼多肽及其多肽锌螯合物的光谱特性，如图 8 所示。

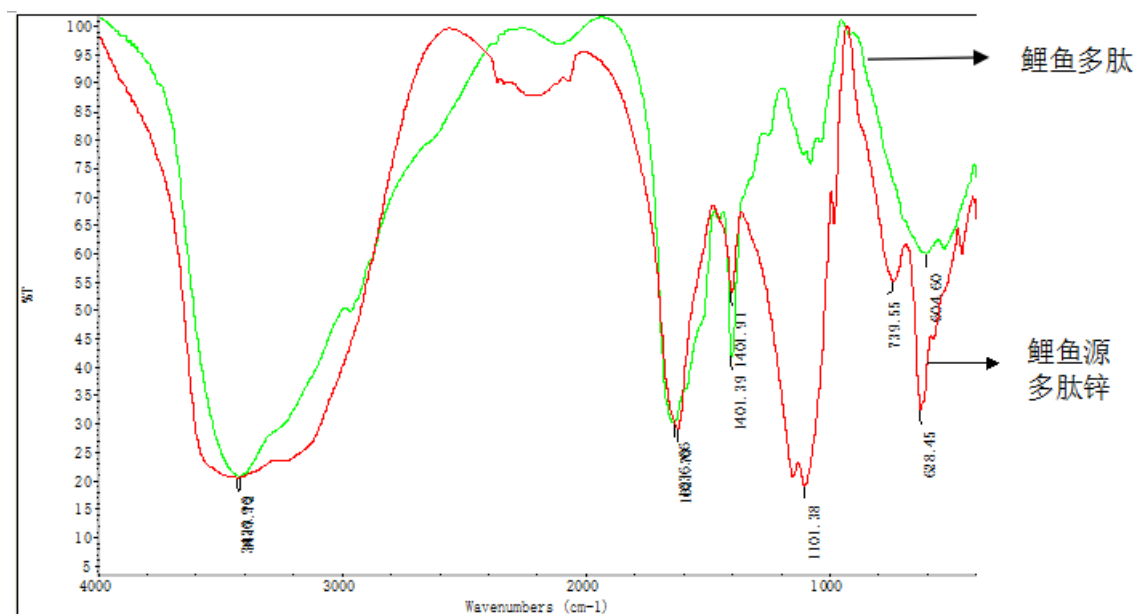


图 8 鲤鱼多肽及多肽锌螯合物红外光谱图

图 8 中显示的是鲤鱼多肽与多肽锌螯合物的红外光谱图。将两者进行对比，可以发现多肽锌螯合物的吸收峰有明显变化。多肽在 3417.72 cm^{-1} 处氨基伸缩振动峰移至多肽锌中的 3426.96 cm^{-1} 处，蓝移了 9.24 cm^{-1} ，说明螯合物中的 -NH_2 发生了化学变化； C=O 的吸收峰由 1636.66 cm^{-1} 移动到 1621.70 cm^{-1} ，红移了 14.96 cm^{-1} ， -COO- 的吸收峰由 1401.39 cm^{-1} 移至 1401.91 cm^{-1} ，可见 -COO- 也发生了化学变化。这都表明氨基和羧基参与了锌离子的配位作用。此外，多肽锌螯合物在 1101.38 cm^{-1} 处出现了新的 (PtNH_2) 吸收峰，也证明 Zn^{2+} 与 -NH_2 存在较强的结合，这可能是 Zn^{2+} 与多肽结合的特征峰。多肽锌在 739.55 cm^{-1} 处出现吸收峰和 628.45 cm^{-1} 处吸收峰的蓝移，有可能是锌离子与 N、O 所形成的配合键的伸缩振动引起的。由红外光谱的偏移或改变，进一步证实了鲤鱼多肽和 Zn^{2+} 之间形成了螯合物。

4 讨论与总结

本实验主要通过单因素和正交试验，以抑菌能力为指标研究了鲤鱼白肉经木瓜蛋白酶与风味蛋白酶复合水解后得到的多肽与锌离子螯合的最佳制备工艺及其螯合物的抗菌、抗氧化等生物活性，并借红外光谱研究了多肽螯合锌后结构的变化。从以上的实验结果可以得出，当多肽与锌以质量比 1:1，pH 5.5,反应时间 40 min，温度 55 °C进行螯合得到的鲤鱼多肽锌螯合物具最佳的综合抑菌效果，对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径分别为 13 mm 和 13.33 mm。将经最佳螯合工艺制得的多肽锌螯合物过凝胶柱进行分离纯化，并收集峰值对应管内样品溶液，冷冻干燥成冻干粉后测其抗氧化和抗菌活性。抗菌实验表明，纯化后多肽锌对两菌的抑菌直径均有所提高。抗氧化实验结果表明，鲤鱼多肽与多肽锌螯合物和生育酚比较都具有一定的抗氧化能力，但多肽锌的抗氧化能力明显高于未螯合多肽，达到生育酚抗氧化活性的 60.50 %，有望作为一种安全的抗氧化剂应用于化妆品或食品中。红外光谱测定结果进一步证实多肽与锌发生了螯合。

本实验制备的螯合物最佳抑菌效果略高于姜良萍等^[13]将鲢鱼源多肽与锌螯合所得产物的最佳抑菌效果(对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈直径分别为 12.50 mm 和 12.66 mm)，而低于杨燊等^[10]制备的低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的抑菌活性（对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径均为 16 mm）。而且各自的最佳螯合条件不同，这可能是由原料不同、多肽氨基酸组分不同引起的，从而各自具有不同的抑菌活性。此外，本实验制备的鲤鱼多肽锌螯合物的抗氧化活性也低于杨燊等^[10]制备的低值鱼蛋白多肽-钙螯合物，他们测得螯合物的抗氧化作用较显著，相当于生育酚的 94.43 %。通过与前人的研究对比发现，关于鲤鱼多肽金属螯合物的研究还需进一步加深，例如研究不同的金属与鲤鱼肌肉多肽螯合可能会使螯合物生物活性增强，也可用不同的指标来确定最佳螯合工艺。

在实验过程中，为保证实验数据的可靠性，进行了多次平行实验，并在实验中不断地总结失误经验，避免错误的再次发生。总结的经验主要有：对一些操作不太熟练的设备要仔细阅读相关说明书，并多次练习操作；实验中不懂的地方要积极地老师请教或多查阅文献资料；因螯合实验量大、较费时，所以，为节约时间，在一组螯合的同时为下组做准备；要严格按照所需的条件进行螯合，不能因大意而忘记控制任一变量；调节螯合反应 pH 时要注意滴加 HCl 或 NaOH 的量，否则容易调过；使用离心机前一定要注意离心管的配平且离心管一定要对称放，否则易损坏离心机；无菌操作不规范很容易导致抑菌圈实验的失败，故一定要注意器具的灭菌及无菌操作的规范性。总之，为避免实

验失误或实验误差，实验过程中一直小心谨慎，并通过大量的重复实验来获取最可靠的实验结果。

本实验关于多肽锌螯合物的研究不仅有利于鲤鱼蛋白的加工利用，还为开发安全、高效的微量元素补充剂、抗菌剂或抗氧化剂提供了一定的理论依据，但关于多肽锌螯合物生物活性机制的研究还不是很多，还需进一步深入探讨，相信这将会成为今后的研究热点，这也将为鲤鱼多肽锌螯合物在食品、化妆品、医药等领域提供更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 施雪燕. 宽体金线蛭多肽锌螯合物的制备及活性研究[D]. 常熟: 常熟理工学院, 2015.
- [2] 刘温, 楼乔明, 杨文鸽. 多肽金属元素螯合物研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4): 142-146.
- [3] 亚丽. 鲤鱼的生长特性及养殖方法[J]. 养殖技术顾问, 2013(2): 216-216.
- [4] 王立斌. 鲤鱼的养殖及经济价值[J]. 商场现代化, 2008(31): 328-328.
- [5] 钟立强, 张成锋, 周凯, 等. 四个鲤鱼种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 259-265.
- [6] 黎显明, 黄安翔. 鲤鱼的特性与规模化养殖要点[J]. 养殖技术顾问, 2012(1):260-260.
- [7] 朱健, 王建新, 龚永生, 等. 几种鲤鱼肌肉的一般营养成分及蛋白质氨基酸组成的比较[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(4):9-12.
- [8] 施佳慧, 朱加进, 陈文聪, 等. 鲢鱼水解产物抗疲劳作用效果研究[J]. 中国食品学报, 2010,10(6): 77-80.
- [9] 方细娟, 曾庆祝, 战宇, 等. 多肽-金属元素配合物的研究进展及发展前景[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 413-416.
- [10] 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[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 202-206.
- [11] 王子怀, 胡晓, 李来好, 等. 肽-金属离子螯合物的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(8): 359-362.
- [12] 曾庆瑞, 韩曜平, 刘晶晶, 等. 多肽微量元素螯合物的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(1): 17-20.
- [13] 姜良萍, 李博, 罗永康, 等. 鲢鱼源多肽锌的制备工艺对其抑菌活性的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(2): 125-130.
- [14] 汪靖瑜, 张业辉, 刘学铭, 等. 动物性短肽螯合物研究进展[J]. 食品科技, 2015, 40(10): 236-240.
- [15] 郑炯, 汪学荣, 阚建全. 血红蛋白多肽螯合铁的抗贫血功能研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 312-313.
- [16] Adamson N J, Reynolds E C. Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release[J]. Journal of Dairy Research, 1997, 64(04): 505-514.
- [17] Kato T, Sugawara A, Hosada N. Calcium carbonate-organic hybrid materials[J]. Advanced Materials, 2002, 14(12): 869-877.
- [18] Evans L T. Crop physiology: some case histories[M]. CUP Archive, 1975.
- [19] RERAT A, NUNES C S, MENDY F, et al. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids[J]. The British Journal of Nutrition, 1988, 60(1): 121-136.
- [20] 林慧敏, 张宾, 邓尚贵, 等. 舟山海域 4 种低值鱼酶解蛋白亚铁螯合物自由基清除活性与抑菌活性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 19-23.
- [21] DASHPER S G, LIU S W, REYBNOLDS E C. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2007, 13(4): 505-516.
- [22] 霍健聪, 邓尚贵, 童国忠. 鱼蛋白酶水解物亚铁螯合修饰物抑菌特性及机理研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 83-89.
- [23] 王秀丽, 刘安军, 李琨, 等. 胶原蛋白多肽-铬(Ⅲ)螯合物的降血糖机理探讨[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 125-126, 48.
- [24] 刘安军, 张旭, 张国蓉, 等. 胶原蛋白多肽-铬(Ⅲ)螯合物对小鼠的免疫调节作用[J]. 现代食品

科技, 2008, 24(5): 401-404, 408.

[25] 刘安军, 王维君, 曹东旭, 等. 胶原蛋白多肽-铬(Ⅲ)螯合物对小鼠肝脏 SOD 表达的影响[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 22-25.

[26] DONG Shiyuan, ZENG Mingyong, WANG Dongfeng, et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1485-1493.

[27] WU Jinchao, HUANG Guangrong, YU Miao, et al. Preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[G]. 2001 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, Jilin, China, 2001, (8): 19-22.

[28] 高红梅, 桑宏庆, 李淑贤. 小麦肽-锌螯合物的制备[J]. 饮料工业, 2013(7): 23-26.

[29] ZHU K X, WANG X P, GUO X N. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 23-32.

[30] 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[J]. 食品工业科技, 2009, (4): 267-270.

[31] 吴茹怡, 曾里, 曾凡骏. 复合氨基酸螯合物鉴定方法的研究[J]. 食品科技, 2006(3): 104-107, 112.

[32] JEON Y J, BYUN H G, KIM S K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes[J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 471-478.

[33] 杨姗姗. 罗非鱼皮多肽锌螯合盐的制备及性质研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.

[34] 赵洪雷, 徐永霞, 杨杰, 等. 低值鱼小肽螯合锌的制备工艺研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 117-119.

[35] 高素蕴, 潘思轶, 郭康权. 大豆分离蛋白水解物螯合锌(Ⅱ)的合成与制备[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 117-120.

[36] 许庆陵, 曾庆祝, 闫磊, 等. 罗非鱼多肽-锌配合物的制备及其生物活性[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 75-80.

[37] 霍健聪, 邓尚贵, 谢超. 多肽亚铁螯合物制备及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(1): 86-89.

致谢

时间飞逝，大学的学习生活很快就要结束了，我要感谢生物与食品工程学院这四年对我的培养，也要感谢各位老师对我的关心与教导，在这四年里，我收获颇多，在此致以我深深的谢意。

本论文是在H老师的指导下完成的，从一开始的选题到最终的定稿H老师都给予了我大量的帮助，为我理清了实验思路，提供了许多论文参考资料，实验材料不够时会及时帮我购买材料，并经常提醒我实验的进度，让我能在规定时间内完成相应的任务。H老师学识渊博、治学严谨、诲人不倦，让我十分钦佩。在此，对H老师表示衷心的感谢。

此外，我还要感谢L老师、J老师和Z老师将实验室仪器借给我使用。还要感谢大学四年里的所有任课老师，他们教了我很多专业知识。

还有，我要感谢Z师兄对我的帮助，他在忙着自己硕士毕业论文的同时还愿意抽出时间来指导我实验操作，有什么不懂的地方他也会耐心地给我讲解，实验中遇到难题时还会帮我一起查阅资料找解决方案，要是没有Z师兄的帮忙，我的论文也不会完成的这么顺利。感谢Z师兄在我论文期间给予我的一切帮助。

最后，我还要感谢所有支持、关心和帮助我的老师和同学们，因为你们，我的论文才能顺利完成，谢谢！