



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114686552 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 30

(21) 申请号 202210340676.X

(22) 申请日 2022.04.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114686552 A

(43) 申请公布日 2022.07.01

(73) 专利权人 吉林农业大学
地址 130118 吉林省长春市新城大街2888号

(72) 发明人 张斯童 牛光有 张娜 高大明
李艳丽 王刚 陈欢 陈光

(74) 专利代理机构 重庆晶智汇知识产权代理事务
所(普通合伙) 50229
专利代理师 李靖

(51) Int. Cl.
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)
A23L 33/165 (2016.01)

(56) 对比文件

- CN 101979400 A, 2011.02.23
- CN 102048026 A, 2011.05.11
- CN 103627765 A, 2014.03.12
- CN 104531814 A, 2015.04.22
- CN 104975061 A, 2015.10.14
- CN 109439715 A, 2019.03.08
- CN 111793666 A, 2020.10.20

刘静等. “油茶籽粕蛋白功能特性及其酶解产物抗氧化活性研究”.《中国粮油学报》.2017, 第32卷(第01期), 第40-45页.

高磊. “油茶籽粕加工利用研究进展”.《广东农业科学》.2013, (第23期), 第103-109页.

赵世光等. “酶法水解油茶籽粕制备油茶籽多肽的研究”.《中国油脂》.2011, 第36卷(第04期), 第65-68页.

郭婷婷等. “油料饼粕中活性肽的提取及生理功能研究进展”.中国油脂.2017, 第42卷(第02期), 第120-124页.

审查员 王雨茹

权利要求书2页 说明书8页 附图5页

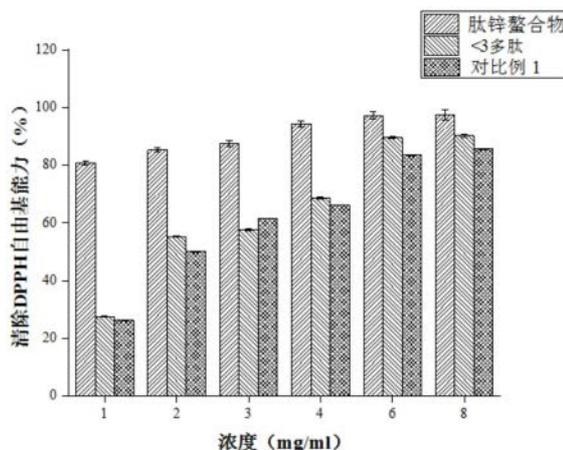
(54) 发明名称

一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法

(57) 摘要

一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,是以油茶籽粕为原料提取油茶籽粕蛋白,采用风味蛋白酶和胰蛋白酶依次水解,制备出分子量<3KDa的油茶籽粕多肽,配制多肽溶液并依次进行水浴和超声处理,然后加入硫酸锌进行螯合,螯合结束后洗涤、取沉淀进行干燥。本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物中含有17种氨基酸,其中具有7种必须氨基酸,油茶籽粕多肽与锌离子螯合率达到58.79%;具有优异的抗氧化能力,清除DPPH自由基能力达到97.4%,具有较好的生物活性,油茶籽粕多肽锌螯合物中锌离子释放率达到78.23%,透析率达到60.51%,具有较好的生物利用率。

CN 114686552 B



1. 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:以油茶籽粕为原料提取油茶籽粕蛋白,去除茶皂素后,采用风味蛋白酶和胰蛋白酶依次水解,制备出分子量 $<3\text{KDa}$ 的油茶籽粕多肽,配制成多肽溶液并依次进行水浴和超声处理,然后加入硫酸锌进行螯合,螯合结束后洗涤、取沉淀进行干燥,所述水解是将油茶籽粕蛋白配制成浓度为 $4.5\text{-}5\text{g/mL}$ 的溶液,调节 pH 为7,加入风味蛋白酶在 45°C 下进行水解 $2\text{-}3\text{h}$,然后灭酶,调节 pH 至 $8\text{-}8.5$ 后,加入胰蛋白酶,在 50°C 下继续水解 $0.5\text{-}1\text{h}$,加入的蛋白酶总量占底物质量的 $5\text{-}7\%$,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为 $1\text{-}2\text{:}1$ 。

2. 如权利要求1所述的一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:所述多肽溶液的浓度为 20mg/mL ,硫酸锌溶液的浓度为 20mg/mL ,多肽溶液和硫酸锌溶液的体积比为 $5\text{-}6\text{:}1$, pH 为7,螯合温度为 $55\text{-}65^\circ\text{C}$,螯合时间为 $80\text{-}100\text{min}$ 。

3. 如权利要求1或2所述的一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:所述取油茶籽粕蛋白是将预处理油茶籽粕粉末按照料液比为 $1\text{g}\text{:}25\text{-}30\text{mL}$ 加入 NaOH 溶液中,保持 pH 为 $9.3\text{-}10$,在 70°C 下提取 $45\text{-}60\text{min}$,然后离心,取上清液采用盐酸调节 pH 至 $4\text{-}4.5$,再次离心得沉淀,冷冻干燥。

4. 如权利要求3所述的一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:所述预处理是将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提 24h 进行脱脂,然后采用体积浓度为 75% 的乙醇浸提5次,每次 1h ,再进行干燥,粉碎过 100 目筛得油茶籽粕粉末。

5. 如权利要求4所述的一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:所述水浴是将多肽溶液 pH 调节至7,然后在 45°C 下进行水浴 $30\text{-}40\text{min}$ 。

6. 如权利要求5所述的一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:所述超声处理的超声功率为 100% ,超声处理时间为 15min 。

7. 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于,按如下步骤进行:

步骤1:提取油茶籽粕蛋白

(1) 预处理:将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提 24h 进行脱脂,然后采用体积浓度为 75% 的乙醇浸提5次,每次 1h ,再进行干燥,粉碎过 100 目筛得油茶籽粕粉末;

(2):将油茶籽粕粉末加入 pH 为 $9.3\text{-}10$ 的氢氧化钠溶液中,在 70°C 下水浴提取 $45\text{-}60\text{min}$,然后在 8000rpm 下离心 20min ,取上清液加入 1mol/L 的盐酸溶液,调节 pH 至 $4\text{-}4.5$,再在 8000rpm 下离心 20min ,取沉淀进行冷却干燥,得油茶籽粕蛋白,油茶籽粕和氢氧化钠溶液的用量比为 $1\text{g}\text{:}25\text{-}30\text{mL}$;

步骤2:水解制备多肽

(1) 使用 NKA-II 树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将 NKA-II 树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为 12cm ,长度为 25cm 的层析柱中,将浓度为 20mg/mL 油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为 100mL/h ,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色;

(2) 将油茶籽粕蛋白配制成浓度为 $4.5\text{-}5\text{mg/L}$ 的溶液,调节 pH 为7,加入风味蛋白酶,在 45°C 下水解 $2\text{-}3\text{h}$,然后灭酶,调节 pH 至 $8\text{-}8.5$,加入胰蛋白酶,在 50°C 下继续水解 $0.5\text{-}1\text{h}$,加入的蛋白酶总量占蛋白质量的 $5\text{-}7\%$,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为 $1\text{-}2\text{:}1$;

采用截留分子量为 3KDa 的超滤膜对油茶籽粕蛋白水解液进行分离,控制蠕动泵转速为 $30\text{-}40\text{rpm}$,超滤膜出口压力为 5.00Bar ,收集过滤物,进行冷冻干燥;

步骤3:水浴及超声处理

将步骤2制备的多肽溶于水配制成浓度为20mg/L的多肽溶液,硫酸锌配制成20mg/L的硫酸锌溶液,调节多肽溶液的pH为7,在45℃下水浴30-40min,然后在超声功率为100%下超声处理15min;

步骤4:螯合

超声处理结束后,将硫酸溶液加入多肽溶液中,在55-65℃下反应80-100min,然后用无水乙醇洗涤,离心取沉淀,冷冻干燥,得油茶籽粕多肽锌螯合物,多肽溶液和硫酸锌溶液的质量比为5-6:1。

一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品技术领域,具体涉及一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法。

背景技术

[0002] 油茶籽粕(*Camellia oleifera* seed meal, COSM)是油茶籽提油后产生的一种副产物,但大部分的油茶籽粕资源被浪费,没有发挥其真正的价值。油茶籽粕中含有蛋白质 10%~20%、粗脂肪 0.5%~7%、粗纤维 15%~25%、糖类30%~60%、茶皂素 10%~14%等,油茶籽粕中糖类、粗蛋白、粗纤维等物质,能广泛应用于生物饲料、化工、轻工等行业。油茶籽粕中除丰富的茶皂素和多糖外,其中的蛋白含量也很丰富,含有18种氨基酸,且含有动物必需的10种氨基酸,但是由于其中含有大量具有溶血毒性的茶皂素,且茶皂素很难去除,制约了油茶籽粕中蛋白的应用,目前只在燃料,有机肥和一些禽畜饲料上有应用,有的甚至直接被当做垃圾丢掉,不仅没有对其进行充分利用,还给环境带来巨大负担。因此有效利用开发其副产物具有一定的实际意义。

[0003] 锌作为人体必须的微量矿物质元素之一,被称为“生命元素”。其在维持人体正常的生命活动中起着重要作用,缺锌会使人的身体健康受到很大的影响,如儿童缺锌会对其生长发育造成影响,成人缺锌对其免疫功能,神经系统都有很大的影响。可见人体对补充吸收锌的重要性。人体对于锌的补充可通过摄入富锌食物或者是服用补锌剂。目前的补锌剂已经发展至第四代,为多肽螯合锌,是多肽与锌的结合物。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法。

[0005] 本发明目的通过如下技术方案实现:

[0006] 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于:以油茶籽粕为原料提取油茶籽粕蛋白,去除茶皂素后,采用风味蛋白酶和胰蛋白酶依次水解,制备出分子量<3KDa的油茶籽粕多肽,配制成多肽溶液并依次进行水浴和超声处理,然后加入硫酸锌进行螯合,螯合结束后洗涤、取沉淀进行干燥。

[0007] 进一步,上述去除茶皂素是使用NKA- II树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将NKA- II树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为12cm,长度为25cm的层析柱中,将浓度为20mg/mL油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为100mL/h,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色。

[0008] 在试验过程中发现,油茶籽粕多肽存在与锌离子螯合率较低的难点,且由于油茶籽粕中含有大量茶皂素,在提取蛋白时,茶皂素也被一起提取,导致提取的蛋白呈黑色,不仅色泽观感差,且大量的茶皂素的存在对人体危害较大。但是在去除茶皂素之后,水解形成多肽与锌离子螯合率较未去除茶皂素之前更低,且螯合后,生物活性下降。

[0009] 本发明中采用对于油茶籽粕蛋白具有高水解度的风味蛋白酶优先降解,然后再采

用对油茶籽粕具有较低水解度的胰蛋白酶继续水解,通过复合水解获得多肽的氨基酸组成和序列中,具有更多的与锌离子具有较强结合能力的氨基酸,同时也调节了多肽表面的亲水基团数量及分布,引起了多肽表面局部电荷密度变化,增强了其与锌离子的结合能力,从而提高了油茶籽粕多肽与锌离子的螯合能力。

[0010] 进一步,上述水解是将油茶籽粕蛋白配制成浓度为4.5-5g/mL的溶液,调节pH为7,加入风味蛋白酶在45℃下进行水解2-3h,然后灭酶,调节pH后,加入胰蛋白酶,在50℃下继续水解0.5-1h,加入的蛋白酶总量占底物质量的5-7%,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1-2:1。

[0011] 进一步,上述多肽溶液的浓度为20mg/mL,硫酸锌溶液的浓度为20mg/mL,多肽溶液和硫酸锌溶液的体积比为5-6:1,pH为7,螯合温度为55-65℃,螯合时间为80-100min。

[0012] 进一步,上述提取蛋白是将预处理油茶籽粕粉末按照料液比为1g:25-30mL加入NaOH溶液中,保持pH为9.3-10,在70℃下提取45-60min,然后离心,取上清液采用盐酸调节pH至4-4.5,再次离心得沉淀,冷冻干燥。

[0013] 进一步,上述预处理是将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提24h进行脱脂,然后采用体积浓度为75%的乙醇浸提5次,每次1h,再进行干燥,粉碎过100目筛得油茶籽粕粉末。

[0014] 进一步,上述水浴是将多肽溶液pH调节至7,然后在45℃下进行水浴30-40min。

[0015] 进一步,上述超声处理的超声功率为100%,超声处理时间为15min。

[0016] 最具体的,一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,其特征在于,按如下步骤进行:

[0017] 步骤1:提取油茶籽粕蛋白

[0018] (1) 预处理:将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提24h进行脱脂,然后采用体积浓度为75%的乙醇浸提5次,每次1h,再进行干燥,粉碎过100目筛得油茶籽粕粉末;

[0019] (2):将油茶籽粕粉末加入pH为9.3-10的氢氧化钠溶液中,在70℃下水浴提取45-60min,然后在8000rpm下离心20min,取上清液加入1mol/L的盐酸溶液,调节pH至4-4.5,再在8000rpm下离心20min,取沉淀进行冷却干燥,得油茶籽粕蛋白,油茶籽粕和氢氧化钠溶液的用量比为1g:25-30mL;

[0020] 步骤2:水解制备多肽

[0021] (1) 使用NKA- II树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将NKA- II树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为12cm,长度为25cm的层析柱中,将浓度为20mg/mL油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为100mL/h,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色;

[0022] (2) 将油茶籽粕蛋白配制成浓度为4.5-5mg/L的溶液,调节pH为7,加入风味蛋白酶,在45℃下水解2-3h,然后灭酶,调节pH至8-8.5,加入胰蛋白酶,在50℃下继续水解0.5-1h,加入的蛋白酶总量占蛋白质量的5-7%,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1-2:1;

[0023] 采用截留分子量为3KDa的超滤膜对油茶籽粕蛋白水解液进行分离,控制蠕动泵转速为30-40rpm,超滤膜出口压力为5.00Bar,收集过滤物,进行冷冻干燥;

[0024] 步骤3:水浴及超声处理

[0025] 将步骤2制备的多肽溶于水配制成浓度为20mg/L的多肽溶液,硫酸锌配制成20mg/L的硫酸锌溶液,调节多肽溶液的pH为7,在45℃下水浴30-40min,然后在超声功率为100%下

超声处理15min;

[0026] 步骤4:螯合

[0027] 超声处理结束后,将硫酸溶液加入多肽溶液中,在55-65℃下反应80-100min,然后用无水乙醇洗涤,离心取沉淀,冷冻干燥,得油茶籽粕多肽锌螯合物,多肽溶液和硫酸锌溶液的质量比为5-6:1。

[0028] 本发明具有如下技术效果:

[0029] 本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物中含有17种氨基酸,其中具有7种必须氨基酸,油茶籽粕多肽与锌离子螯合率达到58.79%;具有优异的抗氧化能力,清除DPPH自由基能力达到97.4%,具有较好的生物活性,油茶籽粕多肽锌螯合物中锌离子释放率达到78.23%,透析率达到60.51%,具有较好的生物利用率。

附图说明

[0030] 图1:本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物的傅里叶红外光谱图。

[0031] 图2:本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物的总还原力测定图。

[0032] 图3:本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物清除DPPH自由基能力测定图。

[0033] 图4:本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物不同消化阶段锌离子释放率图。

[0034] 图5:本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物体外模拟消化锌离子透析率图。

具体实施方式

[0035] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述,有必要在此指出的是,以下实施例只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,该领域的技术人员可以根据上述本发明内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。

[0036] 实施例1

[0037] 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,按如下步骤进行:

[0038] 步骤1:提取油茶籽粕蛋白

[0039] (1) 预处理:将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提24h进行脱脂,然后采用体积浓度为75%的乙醇浸提5次,每次1h,再进行干燥,粉碎过100目筛得油茶籽粕粉末;

[0040] (2):将油茶籽粕粉末加入pH为9.3的氢氧化钠溶液中,在70℃下水浴45min,然后在8000rpm下离心20min,取上清液加入1mol/L的盐酸溶液,调节pH至4,再在8000rpm下离心20min,取沉淀进行冷却干燥,得油茶籽粕蛋白,油茶籽粕和氢氧化钠溶液的用量比为1g:30mL;

[0041] 步骤2:水解制备多肽

[0042] (1) 使用NKA- II 树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将NKA- II 树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为12cm,长度为25cm的层析柱中,将浓度为20mg/mL油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为100mL/h,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色。

[0043] (2) 将油茶籽粕蛋白配制成浓度为4.5mg/L的溶液,调节pH为7,加入风味蛋白酶,在45℃下水解2.5h,然后灭酶,调节pH至8,加入胰蛋白酶,在50℃下继续水解0.5h,加入的蛋白酶总量占蛋白质量的6%,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1.5:1;

[0044] 采用截留分子量为3KDa的超滤膜对油茶籽粕蛋白水解液进行分离,控制蠕动泵转速为35rpm,超滤膜出口压力为5.00Bar,收集过滤物,进行冷冻干燥;

[0045] 步骤3:水浴及超声处理

[0046] 将步骤2制备的多肽溶于水配制成浓度为20mg/L的多肽溶液,硫酸锌配制成20mg/L的硫酸锌溶液,调节多肽溶液的pH为7,在45℃下水浴35min,然后在超声功率为100%下超声处理15min;

[0047] 步骤4:螯合

[0048] 超声处理结束后,将硫酸溶液加入多肽溶液中,在65℃下反应80min,然后用无水乙醇洗涤,离心取沉淀,冷冻干燥,得油茶籽粕多肽锌螯合物,多肽溶液和硫酸锌溶液的质量比为6:1。

[0049] 分别采用对应国标方法对处理之后的油茶籽粕粉末中粗蛋白、水分、灰分和粗脂肪含量进行测定,结果如表2-4所示。实验采用的油茶籽粕原材料中粗蛋白成分为16.1%。

[0050] 油茶籽粕多肽与硫酸锌螯合物中,含有17中氨基酸,包括苏氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙苯氨酸、赖氨酸和缬氨酸等7种必需氨基酸,其中色氨酸在水解过程中被破坏故未被检出,具体如表1所示。

[0051] 表1:油茶籽粕多肽锌螯合物氨基酸组成分析

氨基酸名称	含量mg/g	氨基酸名称	含量mg/g
Asp (天冬氨酸)	20.586	Met* (蛋氨酸)	76.533
Thr* (苏氨酸)	39.302	Ile* (异亮氨酸)	205.559
Ser (丝氨酸)	42.266	Leu* (亮氨酸)	14.061
Glu (谷氨酸)	11.254	Tyr (酪氨酸)	49.112
Pro (脯氨酸)	21.615	Phe* (苯丙氨酸)	37.698
Gly (甘氨酸)	5.873	Lys* (赖氨酸)	69.730
Ala (丙氨酸)	5.633	His (组氨酸)	102.807
Cys (胱氨酸)	42.996	Arg (精氨酸)	189.503
Val* (缬氨酸)	13.862	Trp* (色氨酸)	-

[0053] 异亮氨酸、精氨酸和组氨酸含量超过100mg/g,明显高出其他氨基酸含量,尤其是异亮氨酸,达到205.559mg/g,说明这三种氨基酸的锌离子螯合能力最强;所制备的锌螯合肽营养丰富,氨基酸组成合理,说明本发明制备的油茶籽粕多肽中含有大量对锌离子具有较强螯合能力的氨基酸,是制备锌螯合肽的良好多肽来源。

[0054] 本发明中蛋白提取率(%)=(提取液中蛋白质含量/油茶籽粕中蛋白质含量)×100%。计算得63.26%。

[0055] 蛋白水解度(DH)是指蛋白质中被水解的肽键占总肽键的百分比,是衡量蛋白质水解程度的重要指标,水解度的高低直接决定多肽的得率。其次,由于不同的蛋白酶对底物的专一性不同,且酶的切割位点不同,水解生成的多肽的锌螯合能力也存在差异。将碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶及风味蛋白酶分别作为油茶籽粕蛋白的水解酶,采用OPA法分别测定四种酶单独对油茶籽粕蛋白的水解度,并采用EDTA络合滴定法测定水解后的多肽与锌离子的螯合能率。

[0056] $DH(\%) = (L_t - L_0) / (L_{max} - L_0) \times 100\%$

[0057] DH:表示水解度;

[0058] L_t :加入蛋白酶水解后 OD_{340} ;

[0059] L_0 : 不加入任何酶, 原始蛋白自身水解 OD_{340} ;

[0060] L_{max} : 最大酸水解 OD_{540} 。

[0061] 待水解结束后, 沸水浴灭酶10min, 冷却后10000r/min离心10min, 取上清液400微升(可适当稀释)加入3mL OPA试剂, 准确反应2min, 吸取200 μ L, 用酶标仪测定 OD_{340} 值。最大酸水解度, 用6mol/L的盐酸溶解油茶籽粕蛋白, 使用真空干燥箱100 $^{\circ}$ C反应24h。同样方法测定 OD_{340} 。

[0062] 其中水解度采用EDTA 络合滴定: 取定容后的反应液20 mL, 滴加2滴铬黑T指示剂, 加入0.2mL NH_3-NH_4Cl 缓冲溶液使溶液维持稳定的紫红色, 用0.01mol/L EDTA 滴定, 溶液从紫红色变为淡蓝色即为终点。

[0063] 螯合率 = $(V_{\text{螯合}} - V_{\text{空白}})C / (V_{\text{总}} - V_{\text{空白}})C \times 100\%$

[0064] = $(V_{\text{螯合}} - V_{\text{空白}}) / (V_{\text{总}} - V_{\text{空白}}) \times 100\%$

[0065] C: EDTA溶液的浓度, mol/L;

[0066] V空白: 用去离子水代替待测液所需的 EDTA 体积, mL;

[0067] V总: 总锌含量测定时消耗的 EDTA 体积, mL;

[0068] V螯合: 螯合锌含量测定时消耗的 EDTA 体积, mL。

[0069] 分别采用单一的蛋白酶对于本发明制备的油茶籽粕蛋白进行水解, 具体水解度及螯合率如表1所示。

[0070] 表1: 单一蛋白酶水解油茶籽粕蛋白的水解度及与锌离子螯合率分析

	碱性蛋白酶	胰蛋白酶	中性蛋白酶	风味蛋白酶
[0071] 水解度	30.2%	29.4%	17.3%	34.29%
<3KDa多肽占比	64.4%	54.6%	58.9%	61.2%
与锌离子螯合率	33.9%	31.8%	37.5%	41.98%

[0072] 在水解过程中, 水解时间均达到4-6h不等才能达到最高的水解度。从上表可以看出, 单一酶水解油茶籽粕蛋白中, 风味蛋白酶对于油茶籽粕蛋白的水解程度最大, 制备的油茶籽粕多肽与锌离子的螯合率也是最高。碱性蛋白酶的水解度次之, 其水解的分子量<3KDa多肽占比最高, 但是与锌离子螯合率却明显低于风味蛋白酶, 甚至低于水解度和<3KDa多肽占比明显更低的中性蛋白酶。且通过各单一蛋白酶水解的多肽与锌离子螯合后螯合物清除DPPH自由基能力的测定, 发现四种蛋白酶水解的分子量<3KDa的多肽螯合锌以后, 清除DPPH自由基的能力均有不同程度的下降, 低于螯合前的油茶籽粕多肽。

[0073] 对比例1

[0074] 采用单独水解度、水解后多肽与锌离子螯合率都较高的碱性蛋白酶替换实施例1中的胰蛋白酶, 与风味蛋白酶在各自适宜的水解条件下依次对油茶籽粕蛋白进行水解。其余步骤与实施例1保持一致。

[0075] 对比例2

[0076] 采用水解后多肽与锌离子螯合率都较高的中性蛋白酶替换实施例1中的胰蛋白酶, 与风味蛋白酶在各自适宜的水解条件下依次对油茶籽粕蛋白进行水解, 其余步骤与实施例1保持一致。

[0077] 对比例3

[0078] 与实施例1相比, 本方案中制备的油茶籽粕蛋白不进行去除茶皂素处理, 直接进行

水解,其他步骤与实施例1相同。

[0079] 通过对实施例1和对比例1水解度、水解后与锌离子螯合率的测定结果如表2所示。

[0080] 表2:实施例1和对比例水解油茶籽粕蛋白的水解度及与锌离子螯合率分析

	水解度	<3KDa多肽占比	与锌离子螯合率
[0081] 实施例1	48.41%	65.24%	58.79%
对比例1	39.94%	71.98%	31.37%
对比例2	35.57%	66.81%	43.68%
对比例3	50.69%	68.67%	60.51%

[0082] 对比例1中采用水解程度和分子量<3KDa的多肽占比较大的碱性蛋白酶和风味蛋白酶复合水解油茶籽粕蛋白后,水解度均比单一的酶解水解度高,但是依然低于本发明实施例1,其获得分子量<3KDa多肽含量较高,但是采用该多肽对锌离子进行螯合发现,锌离子的螯合率较单一酶水解获得的分子量<3KDa的油茶籽粕多肽与锌离子螯合率更低,我们猜测是由于碱性蛋白酶水解的小分子肽链的组成不利于与锌离子结合,导致螯合率较低;对比例2中采用水解获得分子量<3KDa多肽占比较多、与锌离子螯合率也相对较高的中性蛋白酶与风味蛋白酶复合水解后,获得的获得分子量<3KDa多肽占比与实施例1接近,但是与锌离子螯合率也远远低于实施例1,而本发明中采用胰蛋白酶和风味蛋白酶复合水解的分子量<3KDa的油茶籽粕多肽占比虽然较对比例1中小,但是制备的油茶籽粕多肽与锌离子螯合率高达58.79%,较单一的酶水解获得的分子量<3KDa的油茶籽粕多肽以及对比例1、对比例2复合酶水解获得的分子量<3KDa的的油茶籽粕多肽均具有显著提高。对比例3中不进行去除茶皂素处理,虽然可以保持蛋白的性能,提高其后续与锌离子的螯合性能,但是由于茶皂素的存在,使得制备的多肽锌整体成黑色,且茶皂素会造成动物血管凝结,无论是从观感方面还是从保健方面,都无法直接作为食品食用。

[0083] 将实施例1、对比例1冻干后的油茶籽粕多肽锌螯合物干粉和相同的油茶籽粕多肽分别按相同浓度溶于去离子水后,用TCA法测定油茶籽粕锌螯合肽和油茶籽粕多肽(分子量<3KDa)的总还原力,实验设置浓度梯度分别为:1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL和8mg/mL。结果如图2所示,本发明制备的多肽锌螯合物总还原力随浓度增大而提高,且高于油茶籽粕多肽的总还原力,当浓度为8mg/mL时,对比例1制备的油茶籽粕多肽锌螯合物的总还原力仅仅达到油茶籽粕多肽的86.7%,说明对比例1中锌离子与多肽的螯合并一定程度上降低了油茶籽粕多肽的总还原力,而本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物保持了较好的油茶籽粕多肽生物活性,并一定程度上起到了促进作用。

[0084] 将对比例1和实施例1制备的油茶籽粕多肽锌螯合物干粉,以及油茶籽粕多肽(分子量<3KDa)分别按相同浓度溶于去离子水后,测定油茶籽粕锌螯合肽和油茶籽粕多肽(<3KDa)的清除DPPH自由基的能力,实验设置浓度梯度分别为:1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL和8mg/mL。结果如图3所示,本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物具有更优异的清除DPPH的能力,达到97.4%,油茶籽粕锌螯合肽保持了较好的油茶籽粕多肽生物活性。

[0085] 模拟体外胃肠道消化:

[0086] 用 0.1 mol/LHCl (pH2.0) 将油茶籽粕多肽锌螯合物和ZnSO₄配制质量浓度为5mg/mL,加入胃蛋白酶(酶与底物的质量比为1:50)模拟胃部环境,将混合物于37℃水浴振

荡2h。模拟胃消化后,添加1mol/L Na OH 溶液将pH调至7.5使胃蛋白酶失活。随后,向溶液中加入胰蛋白酶(酶与底物的质量比为1:25)模拟肠道环境,并在37℃水浴振荡2h。模拟胃肠道消化结束,消化液在沸水浴加热15min以终止酶解。

[0087] 在模拟消化过程中,在胃蛋白酶消化2h后和胃蛋白酶-胰酶消化4h后取上清液,利用EDTA络合滴定法测定游离的锌离子浓度,同时测定溶液中总锌离子的浓度,以表示不同消化阶段的锌离子释放率。

[0088] 锌离子释放率($\%$)= $V1C/V2C \times 100\% = V1/V2 \times 100\%$

[0089] V1:滴定上清液中锌离子所需要的EDTA溶液体积,mL。

[0090] V2:滴定等体积溶液中锌离子所需要的EDTA溶液体积,mL。

[0091] C:EDTA溶液的浓度,mol/L。

[0092] 锌离子透析率($\%$) 在胰蛋白酶消化后,移入到透析袋中(1KDa) 37℃振荡水浴2h,结束后取透析袋外的水溶液,利用EDTA络合滴定测定水溶液中锌离子含量,以表示透过模拟肠道的锌离子含量。

[0093] 锌离子透析率($\%$)= $V1C/V2C \times 100\% = V1/V2 \times 100\%$

[0094] V1:滴定透析袋中锌离子所需要的EDTA溶液体积,mL。

[0095] V2:滴定透析袋中和透析袋外锌离子所需要的EDTA溶液体积,mL。

[0096] C:EDTA溶液的浓度,mol/L。

[0097] 如图4所示,本发明制备的油茶籽粕多肽锌螯合物和七水硫酸锌经胃肠消化后的释放率分别为78.23%和38.65%。如图5所示,体外消化锌离子透析率,本发明制备油茶籽粕多肽锌螯合物达到60.51%,实验表明肽锌螯合物相较于无机锌盐有较好的生物利用率。透析率较无机锌高的原因是锌离子与小肽结合后以分子形式直接通过透析袋,而无机锌离子进入碱性环境的肠道时会生成较多沉淀,导致无法透过。

[0098] 实施例2

[0099] 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,按如下步骤进行:

[0100] 步骤1:提取油茶籽粕蛋白

[0101] (1) 预处理:将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提24h进行脱脂,然后采用体积浓度为75%的乙醇浸提5次,每次1h,再进行干燥,粉碎过100目筛得油茶籽粕粉末;

[0102] (2):将油茶籽粕粉末加入pH为10的氢氧化钠溶液中,在70℃下水浴提取50min,然后在8000rpm下离心20min,取上清液加入1mol/L的盐酸溶液,调节pH至4.5,再在8000rpm下离心20min,取沉淀进行冷却干燥,得油茶籽粕蛋白,油茶籽粕和氢氧化钠溶液的用量比为1g:25mL;

[0103] 步骤2:水解制备多肽

[0104] (1) 使用NKA- II树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将NKA- II树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为12cm,长度为25cm的层析柱中,将浓度为20mg/mL油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为100mL/h,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色。

[0105] (2) 将油茶籽粕蛋白配制成浓度为5mg/L的溶液,调节pH为7,加入风味蛋白酶,在45℃下水解2h,然后灭酶,调节pH至8.5,加入胰蛋白酶,在50℃下继续水解1h,加入的蛋白酶总量占蛋白质量的7%,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为2:1;

[0106] 采用截留分子量为3KDa的超滤膜对油茶籽粕蛋白水解液进行分离,控制蠕动泵转速为30rpm,超滤膜出口压力为5.00Bar,收集过滤物,进行冷冻干燥;

[0107] 步骤3:水浴及超声处理

[0108] 将步骤2制备的多肽溶于水配制成浓度为20mg/L的多肽溶液,硫酸锌配制成20mg/L的硫酸锌溶液,调节多肽溶液的pH为7,在45℃下水浴30min,然后在超声功率为100%下超声处理15min;

[0109] 步骤4:螯合

[0110] 超声处理结束后,将硫酸溶液加入多肽溶液中,在55℃下反应100min,然后用无水乙醇洗涤,离心取沉淀,冷冻干燥,得油茶籽粕多肽锌螯合物,多肽溶液和硫酸锌溶液的质量比为5:1。

[0111] 实施例3

[0112] 一种油茶籽粕多肽锌螯合物的制备方法,按如下步骤进行:

[0113] 步骤1:提取油茶籽粕蛋白

[0114] (1) 预处理:将油茶籽粕碎后,用正己烷浸提24h进行脱脂,然后采用体积浓度为75%的乙醇浸提5次,每次1h,再进行干燥,粉碎过100目筛得油茶籽粕粉末;

[0115] (2):将油茶籽粕粉末加入pH为9.5的氢氧化钠溶液中,在70℃下水浴提取60min,然后在8000rpm下离心20min,取上清液加入1mol/L的盐酸溶液,调节pH至4.5,再在8000rpm下离心20min,取沉淀进行冷却干燥,得油茶籽粕蛋白,油茶籽粕和氢氧化钠溶液的用量比为1g:30mL;

[0116] 步骤2:水解制备多肽

[0117] (1) 使用NKA- II树脂对油茶籽粕粗蛋白中茶皂素成分进行吸附,具体是将NKA- II树脂经去离子水充分浸泡溶胀后,装填于内径为12cm,长度为25cm的层析柱中,将浓度为20mg/mL油茶籽粕粗蛋白提取物溶液通过层析柱,流速为100mL/h,吸附完成后的蛋白提取液颜色变浅,呈微黄色。

[0118] (2) 将油茶籽粕蛋白配制成浓度为4.8mg/L的溶液,调节pH为7,加入风味蛋白酶,在45℃下水解3h,然后灭酶,调节pH至8,加入胰蛋白酶,在50℃下继续水解0.8h,加入的蛋白酶总量占蛋白质质量的5%,其中风味蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:1;

[0119] 采用截留分子量为3KDa的超滤膜对油茶籽粕蛋白水解液进行分离,控制蠕动泵转速为40rpm,超滤膜出口压力为5.00Bar,收集过滤物,进行冷冻干燥;

[0120] 步骤3:水浴及超声处理

[0121] 将步骤2制备的多肽溶于水配制成浓度为20mg/L的多肽溶液,硫酸锌配制成20mg/L的硫酸锌溶液,调节多肽溶液的pH为7,在45℃下水浴40min,然后在超声功率为100%下超声处理15min;

[0122] 步骤4:螯合

[0123] 超声处理结束后,将硫酸溶液加入多肽溶液中,在65℃下反应90min,然后用无水乙醇洗涤,离心取沉淀,冷冻干燥,得油茶籽粕多肽锌螯合物,多肽溶液和硫酸锌溶液的质量比为5.5:1。

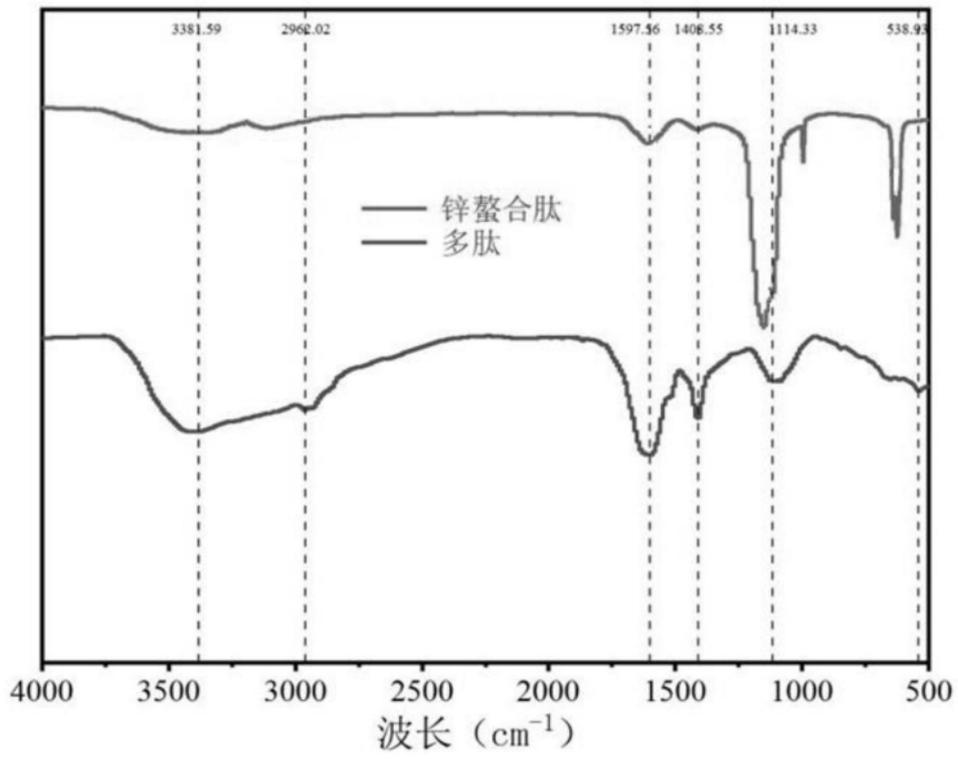


图1

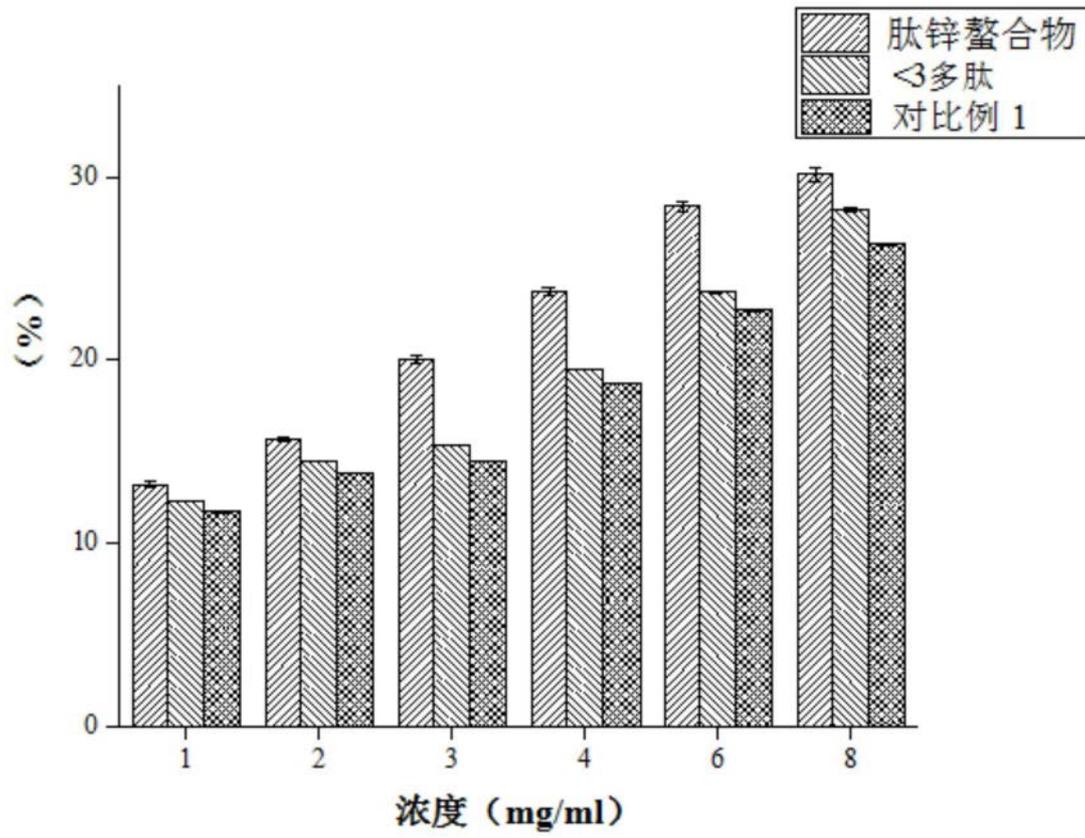


图2

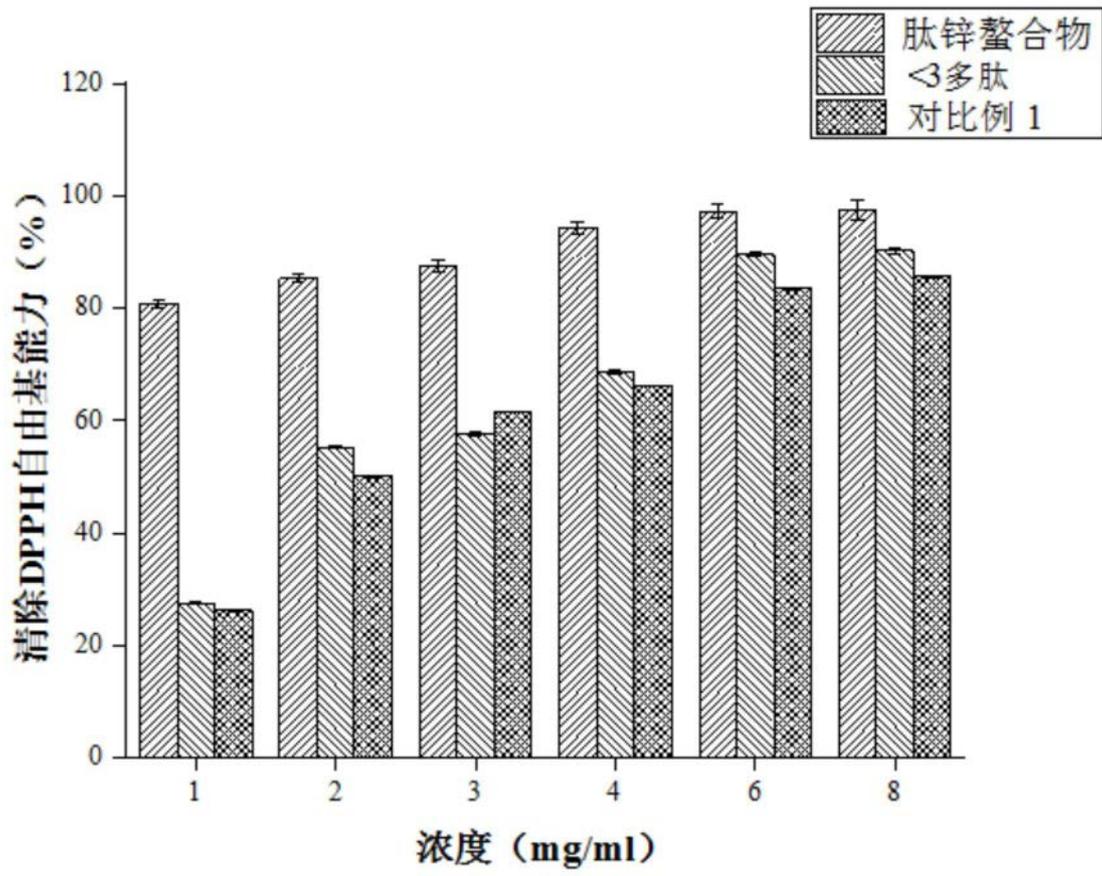


图3

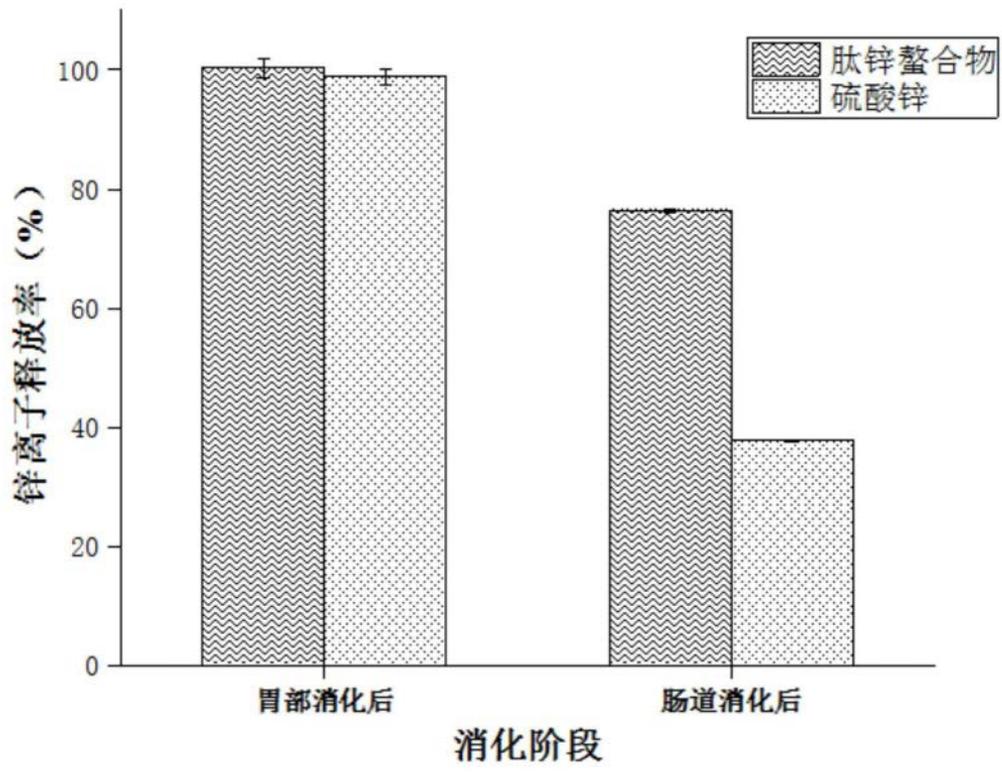


图4

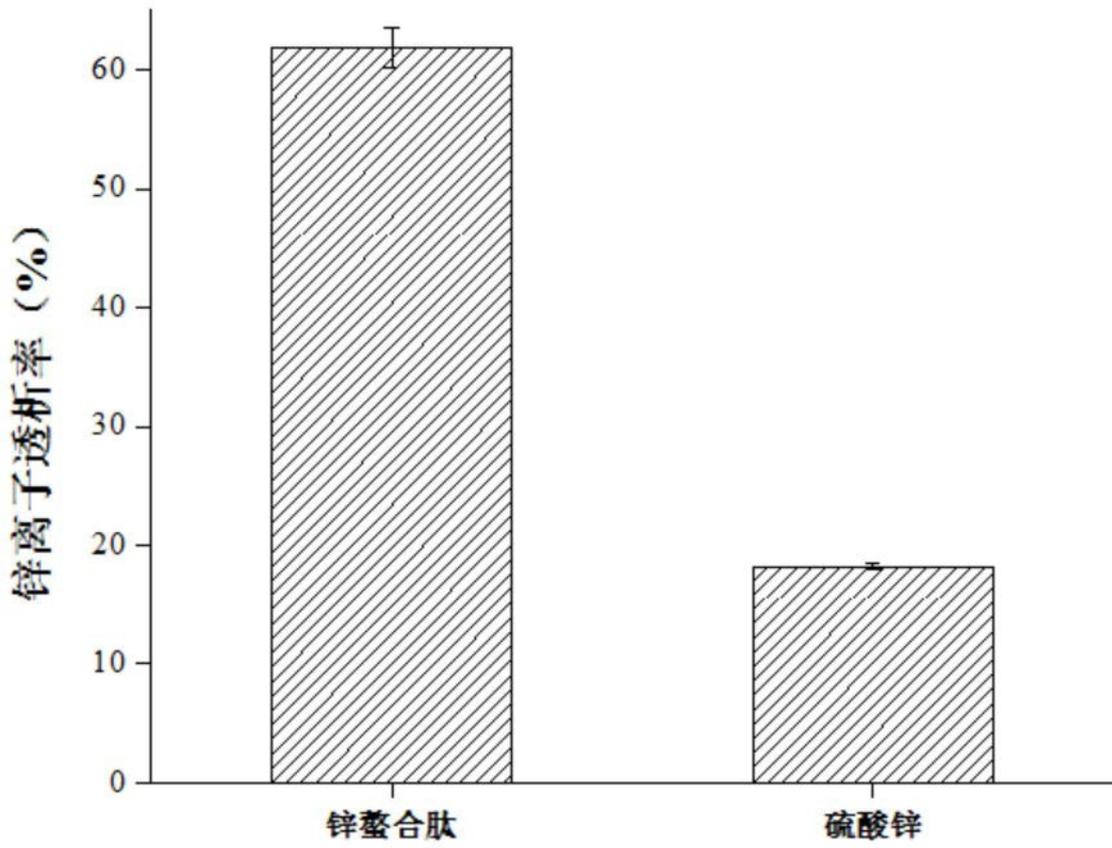


图5