

酪蛋白 GYLEQ 抗氧化肽—钙螯合物的 制备、表征及功能特性

Preparation, characterization and functional analysis of casein GYLEQ antioxidant peptide-calcium chelate

厉荣玉¹ 厉红² 郑鹏³ 杨成¹ 钱森和³

LI Rong-yu¹ LI Hong² ZHENG Peng³ YANG Cheng¹ QIAN Sen-he³

(1. 皖南医学院基础学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 太仓市第一人民医院, 江苏 太仓 215400;

3. 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000)

(1. School of Basic Medical Sciences, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241002, China;

2. Taicang First People's Hospital, Taicang, Jiangsu 215400, China;

3. College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

摘要:目的: 开发具有抗氧化活性和补钙功能的产品。方法: 在固相法合成 GYLEQ 抗氧化肽的基础上, 采用单因素和正交试验优化酪蛋白 GYLEQ 抗氧化肽与钙离子螯合反应条件, 利用红外光谱和扫描电镜表征 GYLEQ-Ca 螯合物的结构, 并分析 GYLEQ-Ca 螯合物体外抗氧化活性、模拟胃肠液中的持钙率以及对细胞活力的影响。结果: GYLEQ-Ca 螯合反应最佳条件为螯合温度 50 ℃, 螯合时间 40 min, pH 7.5, 肽钙质量比 4 : 1, 其中温度对螯合率的影响达到了极显著水平, pH 和肽—钙质量比对螯合率的影响达到了显著水平。螯合后产物的红外光谱吸收峰与 GYLEQ 肽相比发生了改变, 扫描电镜观察发现 GYLEQ 肽为颗粒状, 而 GYLEQ-Ca 螯合物为黏连在一起的网状结构, 表明 GYLEQ 肽与钙离子反应生成了新的化合物。GYLEQ-Ca 螯合物的 DPPH 自由基、羟自由基清除率和还原力高于 GYLEQ 肽, GYLEQ-Ca 螯合物在模拟肠液中持钙率维持在 70% 以上, 且无细胞毒性。结论: GYLEQ-Ca 螯合物具有较好的抗氧化活性和钙维持率。

关键词: GYLEQ-Ca 螯合物; 结构表征; 抗氧化活性; 持钙率; 细胞活力

Abstract: **Objective:** Preparation of GYLEQ-Ca chelate with

基金项目: 皖南医学院校重点项目科研基金(编号: WK2021Z20); 安徽省高校科学研究项目(编号: KJ2021A0840)

作者简介: 厉荣玉, 女, 皖南医学院教师, 硕士。

通信作者: 钱森和(1978—), 男, 安徽工程大学副教授, 博士。

E-mail: qiansenhe@163.com

收稿日期: 2022-06-21 **改回日期:** 2022-09-06

antioxidant activity and calcium supplement function. **Methods:** On the basis of solid-phase synthesis of GYLEQ antioxidant peptide, the conditions of chelation reaction between casein GYLEQ antioxidant peptide and Ca^{2+} were optimized by single factor and orthogonal experiment. The structure of GYLEQ-Ca chelate was characterized by IR and SEM. Meanwhile, the *in vitro* antioxidant activity, calcium retention in simulated gastrointestinal juice of GYLEQ-Ca chelate and its effect on cell viability were analyzed. **Results:** The optimum conditions for GYLEQ-Ca chelation reaction were temperature 50 ℃, time 40 min, pH 7.5, and peptide-calcium mass ratio 4 : 1. The influence of chelation temperature on the chelation rate reached a very significant level, and the pH and peptide-calcium mass ratio reached a significant level. The infrared absorption peak of the GYLEQ-Ca chelate was changed compared with GYLEQ peptide, and the SEM observation showed that GYLEQ peptide was granular, while GYLEQ-Ca chelate was a network structure adhered together, indicating that GYLEQ peptide reacted with Ca^{2+} to form a new compound. The DPPH, hydroxyl radical scavenging rate and reducing power of GYLEQ-Ca chelate were higher than those of GYLEQ peptide. The calcium retention rate of GYLEQ-Ca chelate in simulated intestinal fluid was maintained at more than 70%, and GYLEQ-Ca chelate has no cytotoxicity. **Conclusion:** GYLEQ-Ca chelate has good antioxidant activity and calcium maintenance rate.

Keywords: GYLEQ-Ca chelate; structural characterization; antioxidant activity; calcium retention; cell viability

目前, 常见的钙补充剂有无机钙和有机钙, 无机钙对

胃肠道具有较大的刺激作用且在小肠碱性条件下发生沉淀而不易被吸收^[1]。有机钙具有溶解性好、吸收时不需要过多胃酸支持以及生物利用度高等特点^[2]。生物活性肽可以与钙离子配位结合形成肽钙螯合物^[3]。肽钙螯合物能够使钙离子在胃及小肠等吸收部位以螯合态形式存在而不易形成磷酸钙沉积物；且能够利用肽转运系统吸收，提高钙的生物利用度^[4]。另外，肽钙螯合物能够与机体内未配对的铜离子、铁离子等金属离子结合，阻断 Fenton 反应发生，从而减少自由基的产生，发挥抗氧化活性^[5]。目前，肽钙螯合物的来源主要有从食源性蛋白质中分离提取，如已从乳清蛋白、鱼皮胶原蛋白等分离得到多种肽钙螯合物^[6-7]；另外，亦可以将制备的多肽与钙离子在一定的反应条件下螯合制得，如大豆多肽钙螯合、蚕蛹多肽钙螯合物等^[8-9]。这些方法制备得到的肽钙螯合物虽然具有一定的补钙功能，但大多数的多肽仅作为钙离子的载体，缺乏相应的生物活性。GYLEQ 肽(Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln)是蛋白酶酶解酪蛋白分离得到的一种抗氧化肽，具有较强的自由基清除活性^[10]。因此，将 GYLEQ 肽与钙离子螯合形成的螯合物可以协同抗氧化活性和补钙功能。

研究拟在固相合成 GYLEQ 肽的基础上，采用单因素和正交试验优化肽钙螯合物 GYLEQ-Ca 的制备工艺条件，并对 GYLEQ-Ca 螯合物进行结构表征及功能特性分析，以期为开发具有抗氧化活性和补钙功能的产品提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wang resin、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Tyr-OH、Fmoc-Glu-OH、Fmoc-Gln-OH、*N,N*-二异丙基乙胺、1-羟基苯并三唑、*N,N'*-二异丙基碳二亚胺；分析纯，吉尔生化有限公司；

二氯甲烷、1-羟基苯并三唑、哌啶、三氟乙酸、乙醚、二甲基甲酰胺、四硼酸钠、氢氧化钠、CaCl₂、酸性洛兰 K、CuSO₄、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、FeCl₃、水杨酸；分析纯，国药集团化学试剂有限公司；

铁氰化钾、DPPH、抗坏血酸等；上海展云化工有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平：BSA124S 型，北京赛多利斯天平有限公司；

台式低速冷冻离心机：L2-4K 型，湖南可成仪器设备有限公司；

酶标仪：Multiskan FC 型，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；

真空冷冻干燥机：LJGJ-12 型，济南禾普仪器设备有限公司；

高效液相色谱仪：LC-20A 型，日本岛津公司；

三重四极杆质谱仪：LCMS-8030 型，日本岛津公司；

傅立叶变换红外光谱仪：IRPrestige-21 型，日本岛津公司；

扫描电子显微镜：S-4800 型，日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 GYLEQ 肽制备 采用 Fmoc 固相合成法制备 GYLEQ 肽^[11]。以 Wang-resin 为氨基酸载体，按照 GYLEQ 肽序列将第一个氨基酸固定在树脂上，以 *N,N*-二异丙基乙胺、1-羟基苯并三唑和 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺为缩合剂，二甲基甲酰胺为溶剂，按照肽序列依次合成后续氨基酸。合成的产物采用液相进行分离纯化，冷冻干燥后采用液质联用检测分析其实际分子量。

1.3.2 钙含量测定 向 6 个 100 mL 容量瓶中分别加入 0.0~2.5 mL(0.5 位间隔)0.02 mol/L 的氯化钙溶液，然后分别再加入 10 mL 0.002 mol/L 的酸性洛兰 k 和 5 mL pH 11.5 的四硼酸钠缓冲液，去离子水定容至 100 mL，测定 450 nm 处的吸光值 $A_{450\text{ nm}}$ 。以氯化钙浓度为横坐标，以吸光值为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线回归方程为 $Y=0.140\ 2X+0.059\ 6$ ， $R^2=0.989$ 。并根据标准曲线计算钙含量。按式(1)计算钙离子螯合率^[12]。

$$C_{\text{Ca}}=[(M-M_0)/M]\times 100\%，\quad (1)$$

式中：

C_{Ca} ——钙离子螯合率，%；

M ——反应前钙离子浓度，mol/L；

M_0 ——反应后上清液中钙离子浓度，mol/L。

1.3.3 GYLEQ-Ca 螯合物制备 将 GYLEQ 肽溶于去离子水中，在适宜的温度、时间、pH 和肽钙质量比条件下与氯化钙溶液进行螯合。然后用 5 倍体积的无水乙醇沉淀螯合物，5 000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，取沉淀，冷冻干燥后得到 GYLEQ-Ca 螯合物^[13]。

1.3.4 单因素试验 GYLEQ-Ca 螯合反应单因素试验的初始条件为：螯合温度 45 ℃、螯合时间 60 min、螯合 pH 7.0 和肽钙质量比 3:1。优化时螯合温度分别为 35、40、45、50、55 ℃；螯合时间分别为 20、40、60、80、100 min；螯合 pH 分别为 5、6、7、8、9； $m_{\text{肽}}:m_{\text{钙}}$ 分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1。

1.3.5 正交试验 根据单因素试验结果，以螯合温度、螯合时间、螯合 pH 和肽钙质量比为自变量，以螯合率为应变量，设计四因素三水平正交试验。

1.3.6 红外光谱分析 分别将 1 mg 的 GYLEQ 肽和 GYLEQ-Ca 螯合物冻干粉与 100 mg 的溴化钾混匀后充分研磨，压片，采用傅立叶红外光谱仪在 400~4 000 cm⁻¹ 范围内分别扫描分析其红外光谱。

1.3.7 扫描电镜分析 将 GYLEQ 肽和 GYLEQ-Ca 螯合物冻干粉分别涂片、喷金后，采用扫描电镜分别对其表面形态进行分析。

1.3.8 DPPH 自由基清除率测定 参照 Wu 等^[14]的方法并稍作修改。用 95% 乙醇溶液配置 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,备用。将 1 mL 不同浓度的样品与 1 mL 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液混匀,室温下避光静置反应 0.5 h 后测定 517 nm 处的吸光值,记为 A_1 ;用 1 mL 不同浓度样品与 1 mL 95% 乙醇溶液混合,室温下避光静置反应 0.5 h 后测定 517 nm 处的吸光值,记为 A_2 ;1 mL 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液与 1 mL 95% 乙醇溶液混合,测定 517 nm 处的吸光值,记为 A_0 。按式(2)计算样品的 DPPH 自由基清除率。

$$W_{\text{DPPH}} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

W_{DPPH} ——DPPH 自由基清除率,%;

A_1 ——样品与 DPPH 乙醇溶液的混合溶液在 517 nm 处的吸光值;

A_2 ——样品与 95% 乙醇溶液的混合溶液在 517 nm 处的吸光值;

A_0 ——DPPH 乙醇溶液与 95% 乙醇溶液的混合溶液在 517 nm 处的吸光值。

1.3.9 羟自由基清除率测定 参照 Zhang 等^[15]的方法并稍作修改。将 1 mL 样品与 0.3 mL 8 mmol/L FeSO_4 、1 mL 3 mmol/L 水杨酸以及 0.25 mL 20 mmol/L 过氧化氢混匀后于 37 °C 恒温条件下反应 30 min,反应结束后冷却,加入蒸馏水使体系总体积为 3 mL,5 000 r/min 离心 15 min,测定上清液在 510 nm 处的吸光值,记为 A_3 ;用蒸馏水代替样品,按照上述方法处理后测定 510 nm 处的吸光值,记为 A_4 。按式(3)计算样品的羟自由基清除率。

$$W_{\text{羟自由基}} = [(A_3 - A_4) / A_3] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$W_{\text{羟自由基}}$ ——羟自由基清除率,%;

A_4 ——空白组在 510 nm 处的吸光值;

A_3 ——样品在 510 nm 处的吸光值。

1.3.10 还原力测定 参照 Akinyed 等^[16]的方法并略作修改。取样品溶液 0.5 mL 于试管中,分别加入 pH 6.6 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液和 1.0% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL,混匀后于 50 °C 保温 20 min,冰浴中冷却后加入 10% 的三氯乙酸溶液 2.5 mL,混合后于 5 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,分别加入 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL 和蒸馏水 2 mL,振荡均匀后静置 10 min,测定 700 nm 处的吸光值。

1.3.11 模拟体外消化 参照龙芳^[17]的方法并稍作修改。取 5 mg/mL 的 GYLEQ-Ca 溶液,调节 pH 至 2.0,按 $V_{\text{GYLEQ-Ca}} : V_{\text{胃蛋白酶}} = 25 : 1$ 加入 2.0 g/mL 的胃蛋白酶溶液,在 37 °C 水浴条件下模拟胃消化 2 h,每隔 0.5 h 取一次样,并于沸水浴中灭酶 15 min。随后将溶液 pH 调至 7.0,按 $V_{\text{GYLEQ-Ca}} : V_{\text{胰蛋白酶}} = 25 : 1$ 加入 2.0 g/mL 的胰蛋

白酶溶液,在 37 °C 水浴条件下模拟肠道消化,同样每隔 0.5 h 取一次样,沸水浴灭酶终止消化。消化液离心后取上清液测定钙含量,按式(4)计算 GYLEQ-Ca 持钙率。

$$R_{\text{Ca}} = [(m_T - m_S) / T] \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

R_{Ca} ——持钙率,%;

m_T ——GYLEQ-Ca 样品溶液中总钙质量,mg;

m_S ——消化后上清液游离钙质量,mg。

1.3.12 细胞活性测定 采用 MTT 法评价 GYLEQ-Ca 螯合物对小鼠胚胎成纤维细胞(MEF 细胞)活力的影响^[18]。将 MEF 细胞接种于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,并置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。取 100 μL 对数生长期(每毫升 1×10^5 个细胞)的 MEF 细胞悬液接种于 96 孔板中培养 24 h,然后每孔分别加入 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL 的 GYLEQ-Ca 螯合物 100 μL ,继续培养 24 h 后每孔加入 20 μL MTT,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,震荡 10 min 后用酶标仪测定 490 nm 吸光值,按式(5)计算细胞活力。

$$V = [(OD_i - OD_b) / (OD_c - OD_b)] \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

V ——细胞活力,%;

OD_i ——含有 GYLEQ-Ca 螯合物、MEF 细胞和 DMEM 培养基组的光密度值;

OD_c ——含有 MEF 细胞和 DMEN 培养基组的光密度值;

OD_b ——仅含有 DMEM 培养基组的光密度值。

1.4 数据整理与分析

采用 Excel 2010 软件进行数据整理与作图,采用 SAS 10.0 软件对正交试验结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 GYLEQ 抗氧化肽分子量

由图 1 可知,保留时间 45.7 min 和 47.8 min 处各出现了一个峰,且在 47.8 min 处的峰面积较大。收集两处峰的样品,采用液质联用检测其质荷比,分析其实际分子量。由图 2 可知,47.8 min 处的样品的实际分子量为

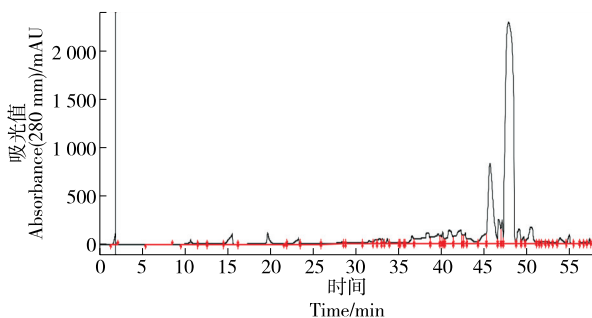


图 1 GYLEQ 肽的高效液相色谱分析

Figure 1 HPLC analysis of GYLEQ peptide

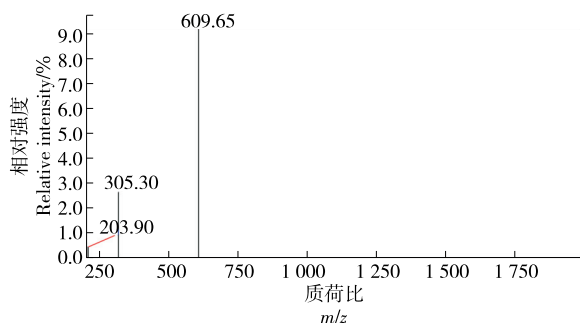


图2 GYLEQ 肽的质荷比分析

Figure 2 Mass-charge ratio analysis of GYLEQ peptide

609.65, 与 GYLEQ 肽实际分子量 608.64 相接近, 表明 47.8 min 处的样品为 GYLEQ 目标肽。

2.2 GYLEQ-Ca 螯合反应条件优化

2.2.1 螯合温度对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响 由图 3 可知, 随着温度的升高, GYLEQ-Ca 螯合物的产率呈先增加后减小趋势, 可能是因为温度的升高增加了分子的热运动, 提高了钙离子与肽的碰撞概率, 有利于其螯合反应的进行^[13], 但当温度超过 50 °C 时, 肽的结构被破坏, 导致钙离子结合位点减少, 螯合率降低^[19]。

2.2.2 螯合时间对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响 由图 4 可知, 随着螯合时间的增加螯合率也逐渐增加; 但当螯合时

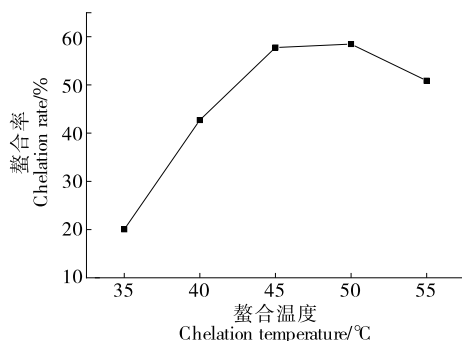


图3 螯合温度对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响

Figure 3 Effects of reaction temperature on GYLEQ-Ca chelation rate

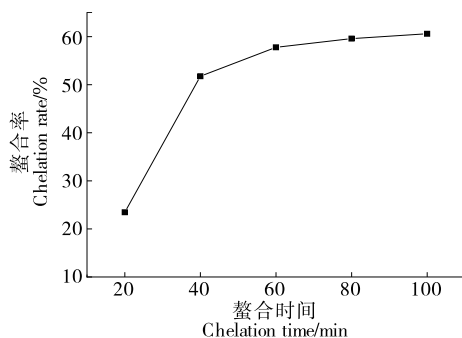


图4 螯合时间对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响

Figure 4 Effects of reaction time on GYLEQ-Ca chelation rate

间超过 60 min 时, GYLEQ-Ca 的螯合率增速趋于平稳, 表明 GYLEQ 肽与钙离子已经充分结合。

2.2.3 pH 对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响 由图 5 可知, 随着 pH 值的增大, GYLEQ-Ca 螯合率呈先增大后下降趋势, 当 pH 为 8 时, 螯合率达最高值。在酸性条件下, H^+ 与 Ca^{2+} 竞争 $-COO-$ 供电子基团, 导致螯合反应受阻; 而过高的 pH 导致溶液中的 OH^- 与 Ca^{2+} 发生反应生产氢氧化钙微溶物, 导致螯合物产率降低^[9]。

2.2.4 肽—钙质量比对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响 由图 6 可知, 随着肽—钙质量比的增加, GYLEQ-Ca 螯合率逐渐增加, 且肽—钙质量比为 1 : 1 ~ 3 : 1 时, 螯合率增加幅度较大, 可能是由于随着肽浓度的升高, 肽与钙离子碰撞的几率增加, 促进了螯合物的形成^[20]。而当肽—钙质量比超过 3 : 1 时, 螯合率增加幅度逐渐变小, 可能是因为随着肽浓度的增加, 溶质扩散受阻, 限制了螯合物的形成^[21]。

2.2.5 GYLEQ-Ca 螯合反应的正交试验 根据单因素试验结果, 设计四因素三水平的正交试验, 进一步优化 GYLEQ-Ca 螯合反应条件。正交试验因素水平设计如表 1 所示, 其结果如表 2 所示。由表 2 可知, 不同因素对 GYLEQ-Ca 螯合率影响不同, 其中螯合温度对螯合率的影响最大, pH 次之, 再次为肽—钙质量比, 而螯合时间

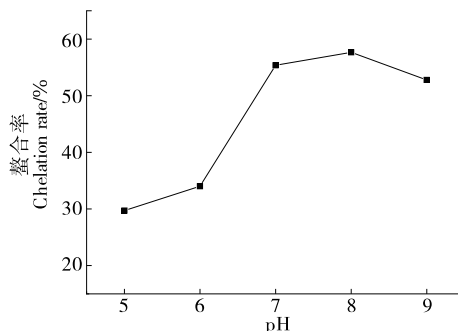


图5 pH 对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响

Figure 5 Effects of pH on GYLEQ-Ca chelation rate

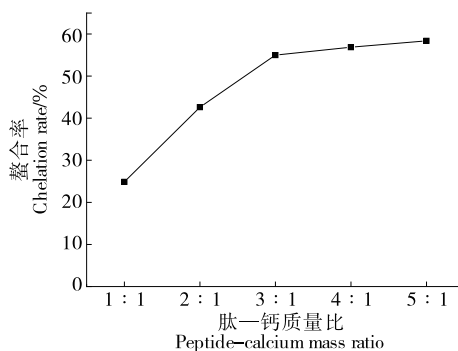


图6 肽—钙质量比对 GYLEQ-Ca 螯合率的影响

Figure 6 Effects of peptide-calcium ratio on GYLEQ-Ca chelation rate

表 1 GYLEQ-Ca 螯合反应正交试验因素水平表

Table 1 Factor level table of orthogonal experiment for GYLEQ-Ca chelation reaction

水平	A 螯合温度/℃	B 螯合时间/min	C pH	D $m_{\text{肽}} : m_{\text{钙}}$
1	40	40	7.5	3 : 1
2	45	60	8.0	4 : 1
3	50	80	8.5	5 : 1

表 2 GYLEQ-Ca 螯合反应正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment for GYLEQ-Ca chelation reaction

试验号	A	B	C	D	螯合率/%
1	1	1	1	1	42.98
2	1	2	2	2	41.21
3	1	3	3	3	39.14
4	2	1	2	3	44.37
5	2	2	3	1	39.79
6	2	3	1	2	46.29
7	3	1	3	2	57.15
8	3	2	1	3	59.13
9	3	3	2	1	49.01
k_1	41.11	48.16	49.46	43.92	
k_2	43.48	46.71	44.86	48.21	
k_3	55.09	44.81	45.36	47.55	
R	13.98	3.35	4.60	4.29	
因素主次	A>C>D>B				
最佳组合	$A_3B_1C_1D_2$				

对 GYLEQ-Ca 螯合物产率的影响最小。最优的螯合反应条件为: $A_3B_1C_1D_2$, 即反应温度为 50 ℃, 反应时间为 40 min, pH 为 7.5, 肽-钙质量比为 4 : 1。对优化得到的最佳条件进行验证, 3 次实验得到的平均 GYLEQ-Ca 螯合率为 61.56%。

为了判断各因素对 GYLEQ-Ca 螯合率影响的差异显著性, 对正交试验结果进行方差分析, 结果见表 3。由表 3 可知, 模型差异达到了极显著水平, 说明螯合因素对螯合率有重要影响; 其中螯合温度对螯合率有极显著影响, pH 和肽-钙质量比对螯合率有显著影响, 而螯合时间对其影响不显著。

2.3 GYLEQ-Ca 螯合物的结构表征

2.3.1 GYLEQ-Ca 螯合物红外光谱分析 红外光谱分析可以反映官能团的组成情况, 与 GYLEQ 肽的红外光谱相比, GYLEQ-Ca 螯合物的红外光谱具有明显的不同, 这可能是钙离子在与 GYLEQ 肽进行螯合时, 使肽的某些官能团结构发生变化, 引起吸收峰发生变化^[22]。由图 7 可知, 3 423.65 cm^{-1} 处由 N—H 的伸缩振动引起的吸收

表 3 GYLEQ-Ca 螯合反应正交试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test results of GYLEQ-Ca chelation reaction

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	$P>F$
模型	9	852.952	94.772	18.33	0.000 2
重复	1	6.722	6.722	1.30	0.287 1
螯合温度	2	671.879	335.939	64.98	<0.000 1
螯合时间	2	33.877	16.938	3.28	0.091 3
pH	2	76.556	38.278	7.40	0.015 1
肽-钙质量比	2	63.917	31.958	6.18	0.023 8
误差	8	41.356	5.169		
总和	17	894.309			

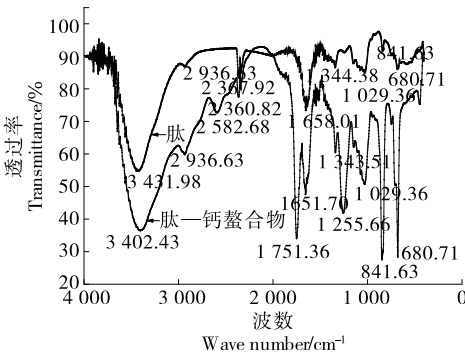


图 7 GYLEQ-Ca 螯合物的红外吸收光谱

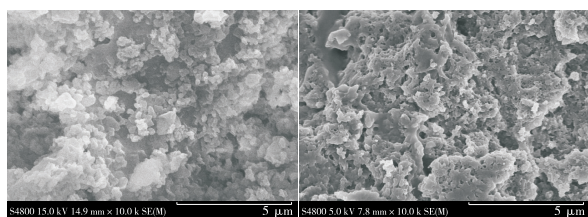
Figure 7 Infrared absorption spectrum of GYLEQ-Ca chelate

峰转移到了 3 402.43 cm^{-1} 处, 说明 N—H 键参与了钙离子螯合^[23]; 酰胺 I 带吸收峰从 1 658.01 cm^{-1} 转移到 1 654.93 cm^{-1} , —COOH 吸收峰从 1 344.38 cm^{-1} 转移到了 1 255.66 cm^{-1} , 说明 —COOH 中的 C=O 参与了螯合反应^[24]; GYLEQ-Ca 离子螯合物在 2 582.68 cm^{-1} 出现 C—H 伸缩振动吸收峰, 可能是由于 —CH₂— 与钙离子发生了结合; 1 751.36 cm^{-1} 处吸收峰可能是钙离子与酰胺 C=O 键发生了结合^[25]。由此可知, GYLEQ 肽的酰胺键, 氨基的氮原子和羧基的氧原子参与了钙离子的螯合反应。

2.3.2 GYLEQ-Ca 螯合物的电镜分析 由图 8 可知, GYLEQ-Ca 螯合物与 GYLEQ 肽在形态结构上存在明显差异, GYLEQ 肽为分散的小颗粒; 而 GYLEQ-Ca 螯合物为网状的聚集体, 这可能是 GYLEQ 肽与钙离子作用后发生聚集而形成的寡聚体^[26]。两者形貌差异同样能够证明 GYLEQ 肽与钙离子发生螯合生成了新的化合物。

2.4 GYLEQ-Ca 螯合物的抗氧化活性分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 9 可知, GYLEQ-Ca 螯合物的 DPPH 自由基清除率明显高于 GYLEQ 肽; 在质量浓度为 0~4 mg/mL 时, GYLEQ 肽及 GYLEQ-Ca



(a) GYLEQ肽($\times 10\,000$) (b) GYLEQ-Ca螯合物($\times 10\,000$)

图 8 GYLEQ-Ca 螯合物的扫描电镜分析

Figure 8 SEM analysis of GYLEQ-Ca chelate

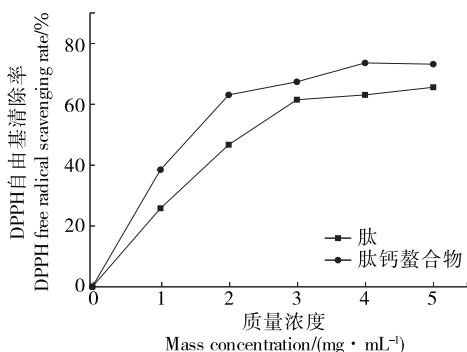


图 9 GYLEQ-Ca 螯合物的 DPPH 自由基清除率

Figure 9 DPPH free radical scavenging rate of GYLEQ-Ca chelate

螯合物的 DPPH 自由基清除率均随着质量浓度的升高而逐渐增大;当质量浓度为 4 mg/mL 时,GYLEQ 与其钙螯合物的 DPPH 自由基清除率分别为 63.1% 和 73.6%;而当质量浓度高于 4 mg/mL 时,两者 DPPH 自由基清除率增加不明显。通过拟合曲线得到 GYLEQ 肽及其钙螯合物的 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 分别为 2.31, 1.43 mg/mL, 由此可知,GYLEQ 肽在与钙螯合后,其对 DPPH 自由基清除能力增强。

2.4.2 羟自由基清除能力 由图 10 可知,随着质量浓度的升高,GYLEQ 肽及 GYLEQ-Ca 螯合物的羟自由基清除率均逐渐增大;当 GYLEQ 肽的质量浓度为 0~3 mg/mL 时,其羟自由基清除率增加较为迅速,而 GYLEQ-Ca 螯合物浓度为 0~2 mg/mL 时,其羟自由基清除率增加较为明显;GYLEQ 肽及 GYLEQ-Ca 螯合物的羟自由基清除率的 IC_{50} 值分别为 2.13, 1.19 mg/mL,表明 GYLEQ-Ca 对羟自由基的清除效果优于 GYLEQ 肽。

2.4.3 还原力 由图 11 可知,GYLEQ 肽与 GYLEQ-Ca 螯合物的还原力均随质量浓度的增加而增大;当 GYLEQ 肽质量浓度为 0~4 mg/mL 时,其还原力随着质量浓度的增加而迅速增加,当质量浓度高于 4 mg/mL 时,其还原力随着浓度的增加而增加得较慢。相对于 GYLEQ 肽,GYLEQ-Ca 螯合物的还原力在质量浓度为 0~2 mg/mL 时随着浓度的增加而增加得较快,而之后还原力增加得较为缓慢。

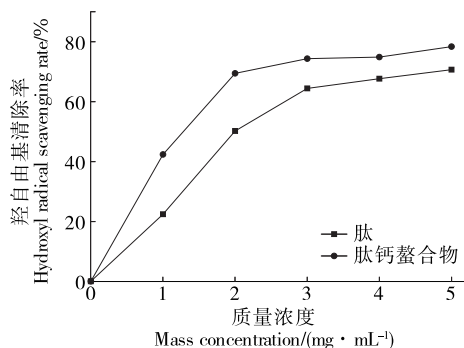


图 10 GYLEQ-Ca 螯合物的羟自由基清除率

Figure 10 Hydroxyl radical scavenging rate of GYLEQ-Ca chelate

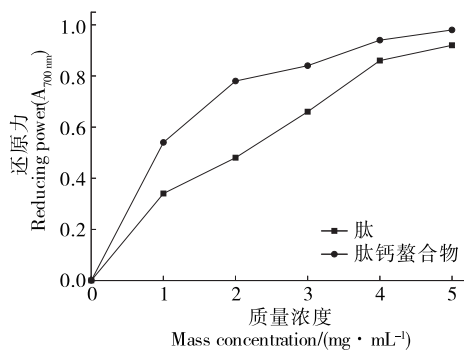


图 11 GYLEQ-Ca 螯合物的还原力

Figure 11 Reducing power of GYLEQ-Ca chelate

综上,GYLEQ-Ca 螯合物的 DPPH 自由基和羟自由基清除率以及还原力总体高于 GYLEQ 肽,这可能与 GYLEQ-Ca 能够与金属离子结合,阻断自由基产生和阻碍金属与脂类和过氧化物的相互作用有关^[7]。

2.5 模拟体外消化对 GYLEQ-Ca 螯合物持钙率的影响

由图 12 可知,GYLEQ-Ca 螯合物在模拟胃液中消化 0~1.5 h 时,持钙率逐渐降低,1.5 h 后持钙率基本保持不变,表明 pH 和胃蛋白酶对 GYLEQ-Ca 螯合物稳定性具有一定的影响,可能是因为较低的 pH 使螯合过程发生了可逆反应和胃蛋白酶的酶解作用破坏了螯合物的结构^[20]。但加入模拟肠液消化后,持钙率逐渐上升,且在肠液消化 1.5 h 后,持钙率基本维持不变,可能是因为进入肠液后 H^+ 浓度逐渐降低,而 OH^- 浓度逐渐升高,钙离子与肽的螯合能力增强,也可能是在胃液中消化的肽又重新与钙离子发生了螯合,从而导致持钙率上升^[17]。钙离子在肠道中容易被草酸盐、植酸盐以及 OH^- 所沉淀,形成难以吸收的沉淀物;而 GYLEQ 肽与钙离子形成的 GYLEQ-Ca 螯合物具有较好的肠道吸收性。

2.6 GYLEQ-Ca 螯合物对细胞活力的影响

由图 13 可知,当 GYLEQ-Ca 螯合物质量浓度低于 3 mg/mL 时,随着浓度的增加 MEF 细胞活力逐渐增加,当质量浓度高于 3 mg/mL 时,细胞活力呈下降趋势,表

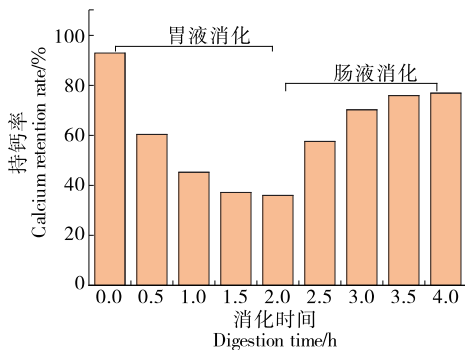


图 12 模拟体外胃肠液消化对 GYLEQ-Ca 螯合物持钙率的影响

Figure 12 Effects of in vitro simulated digestion of gastrointestinal juice on calcium retention of GYLEQ-Ca chelate

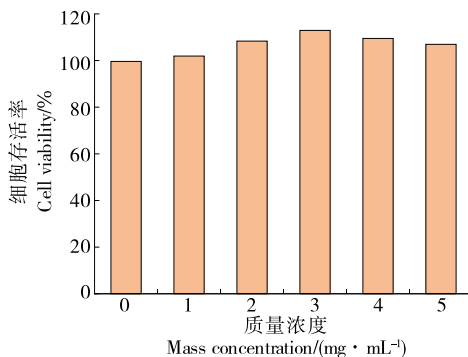


图 13 GYLEQ-Ca 螯合物对 MEF 细胞活力的影响

Figure 13 Effects of GYLEQ-Ca chelate on the viability of MEF cell

明 GYLEQ-Ca 螯合物并无细胞毒性,且适宜的浓度能够促进细胞的增殖。钙离子能够与细胞内的钙调节蛋白结合形成钙—钙调节蛋白复合物,从而激活胞内多种酶的活性,调控细胞的生长代谢,但过高浓度的钙离子会导致细胞功能异常^[27]。

3 结论

采用固相法合成了 GYLEQ 抗氧化肽,GYLEQ 抗氧化肽与 Ca^{2+} 螯合反应的最佳工艺条件为螯合温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 螯合时间 40 min, pH 7.5 和肽—钙质量比 4 : 1,在此条件下,GYLEQ-Ca 螯合物产率为 61.56%。通过红外光谱和扫描电镜表征分析比较 GYLEQ 肽与 GYLEQ-Ca 螯合物结构,发现 GYLEQ-Ca 螯合物为一种新生成的化合物。优化制备的 GYLEQ-Ca 螯合物具有较好的抗氧化活性、较高的肠液持钙率和生物安全性。相比较常见的混合肽与 Ca^{2+} 形成的螯合物,GYLEQ-Ca 螯合物具有更为稳定的结构和生物学特性。但后续仍需要对 GYLEQ-Ca 螯合物的体内抗氧化活性、促进钙吸收的分子机制以及转运途径进行研究。

参考文献

- [1] 李国良, 侯俊财. 大豆肽—钙螯合物制备条件优化与质量评价[J]. 农业机械学报, 2019, 50(8): 379-385, 409.
LI G L, HOU J C. Optimization of parameters of preparation of calcium-chelated soybean peptides and quality evaluation [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2019, 50(8): 379-385, 409.
- [2] CHEN M, JI H, ZHANG Z, et al. A novel calcium-chelating peptide purified from *Auxis thazard* protein hydrolysate and its binding properties with calcium[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 1-8.
- [3] JIN Y G, FU W W, MA M H. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 50(10): 10 204-10 211.
- [4] 刘冰彤, 庄永亮. 肽钙螯合物 VGLPNSR-Ca 的结构表征及在 Caco-2 单层细胞层的促钙吸收性能[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(8): 1 643-1 648.
LIU B T, ZHUANG Y L. Structural characterization of peptide calcium chelate VGLPNSR-Ca and its calcium absorption ability in Caco-2 cell monolayer[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2019, 40(8): 1 643-1 648.
- [5] 李雪芬, 杜斌, 丁珂, 等. 金属螯合肽分离纯化及其抗氧化活性的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 35-39.
LI X F, DU B, DING K, et al. Research progress of separation and purification of metal chelating peptides and antioxidant activity[J]. Food and Nutrition in China, 2016, 22(3): 35-39.
- [6] ZHANG K, LI B F, CHEN Q R, et al. Functional calcium binding peptides from pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone: Calcium bioavailability enhancing activity and anti-osteoporosis effects in the ovariectomy-induced osteoporosis rat model[J]. Nutrients, 2019, 10: 1 325.
- [7] ZHAO L N, HUANG Q M, HUANG S L, et al. Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(42): 10 274-10 282.
- [8] LU Y, BAO X L, LIU H, et al. Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1 645-1 650.
- [9] 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. Optimization of preparation process and structural characterization of silkworm pupa polypeptide chelated calcium[J]. Food & Machinery, 2019, 35(8): 20-26.
- [10] GOBBA C D, TOMPA G, OTTE J. Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*[J]. Food Chemistry, 2014, 165(15): 205-215.
- [11] LIMA B, RICCI M, GARRO A, et al. New short cationic antibacterial peptides. Synthesis, biological activity and mechanism of action[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2021, 1 863(10): 183665.
- [12] WU W, HE L, LIANG Y, et al. Preparation process optimization of

- pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. Food Chemistry, 2019, 284: 80-89.
- [13] LIU B T, ZHUANG Y L, SUN L P. Identification and characterization of the peptides with calcium-binding capacity from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin enzymatic hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(1): 114-122.
- [14] WU H C, CHEN H M, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36(9): 949-957.
- [15] ZHANG Y F, XIU D, ZHUANG Y L. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. Peptides, 2012, 38(1): 13-21.
- [16] AKINYED A I, FAGBEMI T N, OSUNDAHUNSI O F, et al. Amino acid composition and antioxidant properties of the enzymatic hydrolysate of calabash nutmeg (*Monodora myristica*) and its membrane ultrafiltration peptide fractions[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 45(8): e13437.
- [17] 龙芳. 汉麻肽钙螯合物的制备及其结构表征和稳定性[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 33-39.
- LONG F. Preparation of hemp peptide-calcium chelate and its structural characterization and stability properties[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(9): 33-39.
- [18] JIANG Z, YU G, BAO Q, et al. Macrophage-stimulating activities of a novel low molecular weight saccharide fragment prepared from ascophyllan with alginate lyase[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103839.
- [19] HOU H, WANG S, ZHU X, et al. A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 389-395.
- [20] 张凯, 侯虎, 彭喆, 等. 鳕鱼骨明胶多肽螯合钙制备工艺及其在体外模拟消化液中的稳定性[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 1-7.
- ZHANG K, HOU H, PENG Z, et al. Optimization of preparation of calcium-chelated cod bone gelatin peptide and its stability in simulated gastrointestinal system[J]. Food Science, 2016, 37(24): 1-7.
- [21] 富天昕, 张舒, 盛亚男, 等. 绿豆多肽锌螯合物的制备及其结构与体外消化的分析[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 59-65.
- FU T X, ZHANG S, SHENG Y N, et al. Preparation, structure and in vitro digestion analysis of mung bean polypeptide zinc chelate [J]. Food Science, 2020, 41(4): 59-65.
- [22] BETTS H D, NEVILLE S L, MCDEVITT C A, et al. The biochemical fate of Ag^+ ions in *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and biological media [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2021, 225: 111598.
- [23] 覃宇, 鞠守勇. 鱼鳞多肽亚铁螯合物的制备及结构表征[J]. 西南农业学报, 2020, 33(2): 456-463.
- QIN Y, JU S Y. Preparation and structural characterization of scale polypeptide ferrous chelate [J]. Southwest Agricultural Journal, 2020, 33(2): 456-463.
- [24] WANG X, GAO A, CHEN Y, et al. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 487-494.
- [25] 钱跃威, 徐瀚麟, 吕奇晏, 等. 鳗鱼骨胶原肽钙螯合物的制备及其稳定性和 Caco-2 吸收特性[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 1-8.
- QIAN Y W, XU H L, LU Q Y, et al. Preparation, stability and Caco-2 absorption characteristics of calcium chelate of eel collagen peptide[J]. Food Science, 2020, 41(24): 1-8.
- [26] MANNINI B, HABCHI J, CHIA S, et al. Stabilization and characterization of cytotoxic $A\beta_{40}$ oligomers isolated from an aggregation reaction in the presence of zinc ions[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2018, 9(12): 2959-2971.
- [27] 陈皓, 柯晨, 张梓凯. 钙离子浓度对脂肪干细胞增殖和成肌分化的影响[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(7): 1206-1210.
- CHEN H, KE C, ZHANG Z K. Effects of calcium concentration on proliferation and myogenic differentiation of adipose stem cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2022, 22(7): 1206-1210.

信息窗

欧盟修订酒精饮料分析的参考方法

欧盟官方公报 2023 年 2 月 21 日消息, 2 月 16 日欧盟委员会通过 (EU) 2023/383 实施条例修订 (EC) 第 2870/2000 号酒精饮料分析的参考方法, 并废除 (EEC) No 2009/92 条例, 该条例确定了酒精饮料、芳香化葡萄酒、芳香化酒基饮料和芳香化酒产品鸡尾酒制备过程中农业来源乙醇的分析方法, 发布后第 20 日生效。主要内容如下: ① 该条例适用于欧洲议会和理事会 (EU) 2019/787 第 5 条所定义的农业乙醇; 农业来源乙醇的欧盟参考分析方法应为该条例附件中规定的方法; 农业来源的乙醇应被视为一种馏出物, 其酒精度应按附件第一章附录 II 的规定直接测量。但是, 当酒精样品

不澄清或可见悬浮颗粒时, 应对样品进行蒸馏; 对于挥发性物质的测定, 应要求用无水乙醇配制的标准溶液 C 进行校准, 以实现附件 5 第 III.2 章中详述的样品和标准溶液之间的适当基质匹配。对于糠醛的测定, 如附件第 X 章所述, 农业来源的乙醇应通过加水稀释两倍, 使其初始体积加倍, 并达到与校准溶液相同的体积酒精浓度; 乙醇中 C_{14} 含量的测定, 采用附件第十一章规定的方法; ② 废除 (EEC) No 2009/92; ③ 该条例直接适用于所有成员国。

(来源: <http://news.foodmate.net>)