

## 薏米多肽-钙、锌螯合物制备及结构表征

胡香莲, 郦萍, 周柳莎, 俞瑜媛, 徐海星, 施永清\*  
(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

**摘要** 目的:制备 1 种薏米多肽-钙、锌螯合物并研究其结构。方法:利用枯草芽孢杆菌和嗜热链球菌混合发酵薏米,采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-15、反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化薏米发酵液得到薏米多肽(CSP),Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(Tricine-SDS-PAGE)电泳检测其分子质量。以锌整合率和钙整合率为指标,在单因素实验的基础上,采用响应面法优化薏米多肽-钙、锌螯合物(CSP-Ca-Zn)的制备工艺,采用紫外光谱、红外光谱和荧光光谱表征其结构。结果:薏米发酵液经 Sephadex G-15 分离得到 4 个峰,其中 A3 的钙、锌整合率最高。RP-HPLC 分离 A3 得到的 CSP 纯度达 93.91%,其分子质量约 7.8 ku。CSP 与 Ca-Zn 整合的最佳制备工艺为:CSP 与钙、锌质量比 4.4:1,钙、锌质量比 1:1,pH 3.7,在此条件下,锌整合率、钙整合率分别达到 52.63%和 63.79%。CSP 与钙、锌整合的主要位点是氨基氮、羧基,其空间结构也发生改变。结论:所确定的整合工艺条件使 CSP 同时整合钙、锌两种金属,为薏米多肽新产品的开发提供了技术参考,为制作食源性有机钙、锌补充剂提供了新思路。

**关键词** 薏米; 发酵; 纯化; 肽-钙、锌螯合物; 结构

**文章编号** 1009-7848(2024)07-0229-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.023

钙和锌是人体所必需的微量元素,钙在维持骨骼强度等方面发挥重要作用,锌对大脑认知能力、学习等方面有积极作用<sup>[1-2]</sup>。缺钙、锌会导致骨质疏松、生长迟缓和免疫功能受损等不良现象<sup>[3]</sup>。传统补充微量元素的方式吸收差,利用率低。多肽金属螯合物作为第 4 代微量元素补充剂受到广泛关注。Wu 等<sup>[4]</sup>通过响应面优化猪骨胶原肽-钙螯合物的最佳制备工艺,采用 Caco-2 细胞单层模型试验表明肽-钙螯合物有促进肠道钙吸收的作用,并可以逆转磷酸盐和植酸盐对钙吸收的抑制作用。富天昕等<sup>[5]</sup>对绿豆肽锌螯合工艺进行优化,并通过体外模拟胃肠道消化试验表明肽锌螯合物中锌离子的溶解率和透析率均显著高于无机锌盐。在体外大鼠肠道模型和 Caco-2 细胞模型中,运用 TSQ 荧光染色法试验表明海参肽螯合锌(SCSP-Zn)能通过肠膜转运,并释放出游离锌离子<sup>[6]</sup>。

薏米(Coix seed,CS),广泛种植于亚热带、热带地区,富含蛋白质、多糖、脂肪、多酚等功能活性物质<sup>[7]</sup>。微生物发酵被广泛用于谷物,降低谷物中抗营养物质水平,提高其生物活性。酵母、真菌和细菌被用于发酵薏米,以开发具有健康和功能性

的食品成分<sup>[8-9]</sup>。枯草芽孢杆菌发酵产生蛋白酶,分解薏米蛋白质为氨基酸,使其游离氨基酸增加,纤溶酶活性升高<sup>[10]</sup>。植物乳杆菌发酵薏米,使其游离氨基酸、有机酸等营养成分增加,感官和稳定性得到改善<sup>[11]</sup>。毛新亮等<sup>[12]</sup>采用不同乳酸菌(乳酸乳球菌、嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)进行单菌和复合多菌发酵薏米,游离氨基酸、还原糖和抗氧化性均比发酵前高,且三菌混合发酵比单菌更具优势。

现有报道大多为多肽与单一金属螯合的研究。米糠肽、牛皮胶原蛋白与锌、铁双金属螯合<sup>[13-14]</sup>类似的报道较少,有关多肽螯合钙、锌两种金属的研究尚未见报道。基于以上背景,本试验利用枯草芽孢杆菌和嗜热链球菌混合发酵薏米,通过葡聚糖凝胶、反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化得到薏米多肽(CSP),采用单因素和响应面法优化 CSP 与钙、锌两种金属螯合工艺,研究其螯合结构,以期对薏米活性肽的加工和利用提供新思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

薏米,浙江杭州谊品生鲜超市;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CICC 10453、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)CICC 6220,中国工业微生物菌种保藏管理中心。

收稿日期: 2023-07-16

第一作者: 胡香莲,女,硕士生

通信作者: 施永清 E-mail: shiyq@zjsu.edu.cn

$\alpha$ -淀粉酶, 南宁庞博生物工程有限公司; 指示剂级二甲酚橙四钠, 上海源叶生物科技有限公司; Sephadex G-15 填料, 台州市路桥四甲生化塑料厂; 三氟乙酸、乙腈(色谱级), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 指示剂级铬黑 T, 上海麦克林有限公司; 无水氯化钙, 永华化学科技(江苏)有限公司; 七水合硫酸锌、无水乙醇、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na), 西陇化工股份有限公司; 超低分子量蛋白质 Marker(标准品), 北京 Solarbio 科技有限公司; 其它试剂均为分析纯级。

## 1.2 仪器与设备

Infinite 200 Pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; UV-2600 型紫外-分光光度计, 日本岛津公司; HD-5 型电脑紫外检测仪, 上海青浦沪西仪器厂; Nicolet 型傅里叶红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; BioBasic-18 RP-HPLC 色谱柱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; TGL-16gR 型台式高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; FreeZone2.5 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 薏米发酵液的制备 发酵剂的制备: 将活化至对数生长期的枯草芽孢杆菌和嗜热链球菌离心(8 000 r/min, 5 min)后保留菌体, 加入等体积 0.9% 的无菌生理盐水冲洗 2 次, 平板计数法计数, 使菌悬液浓度为  $10^7$  CFU/mL。

发酵液的制备: 称取 40 g 薏米, 加入 600 mL 蒸馏水, 4 °C 浸泡过夜, 打浆。 $\alpha$ -淀粉酶 90 °C 液化 40 min, 巴氏杀菌(80 °C, 20 min)处理后, 冷却至室温。按照质量分数 3% 的接种量吸取发酵剂菌悬液(枯草芽孢杆菌:嗜热链球菌 = 1:1)至 pH 值为 6.5 的薏米液中, 37 °C 生化培养箱中发酵 4 d, 将发酵液以 8 000 r/min, 离心 5 min, 取上层清液。

1.3.2 Sephadex G-15 分离纯化 一定浓度的发酵液上样前经滤膜(0.45  $\mu$ m)过滤, 用凝胶色谱柱 Sephadex G-15(1.6 cm $\times$ 60 cm)进行分离纯化, 以超纯水 1.6 mL/min 的流速洗脱, 收集钙、锌螯合率最强的组分<sup>[15]</sup>。

锌离子、钙离子螯合率测定计算公式<sup>[16-17]</sup>:

$$\text{螯合率}(\%) = \frac{CVM}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $C$  为乙二胺四乙酸二钠的浓度, mol/L;  $V$  为滴定所消耗的乙二胺四乙酸二钠的体积, mL;  $M$  为钙或锌的摩尔质量, g/mol;  $m$  为加入体系的钙或锌的质量, g。

1.3.3 反相高效液相色谱分离纯化 参考 Kheeree 等<sup>[18]</sup>的方法, 并稍作修改。组分 A3 上样于 RP-HPLC (BioBasic-18 250 mm $\times$ 4.6 mm, 300  $\text{\AA}$ , 5  $\mu$ m)中, 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸-水溶液, 流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸-乙腈溶液。梯度洗脱程序为: 0~5 min, 90% A; 5~20 min, 90%~70% A; 21~30 min, 50%~10% A; 35~40 min, 10%~90% A。进样 50  $\mu$ L, 流速 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长: 220 nm。多次收集钙、锌螯合活性较强的峰并进行纯度鉴定。

1.3.4 Tricine-SDS-PAGE 电泳测定分子质量 参考王雪燕等<sup>[19]</sup>的方法测定薏米多肽分子质量, 并稍作修改。电泳胶配方如表 1 所示。

表 1 电泳胶配方

Table 1 Electrophoretic gel formula

成分	浓缩胶	夹层胶	尿素分离胶
AB-6 分离胶/mL	—	—	1.98
AB-3 浓缩胶/mL	0.25	0.6	—
甘油/g	—	0.3	—
尿素/g	—	—	2
超纯水/mL	2	1.1	1.5
凝胶缓冲液/mL	0.75	1.0	1.5
10%APS/ $\mu$ L	30	15	50
TEMED/ $\mu$ L	3	3	5

1.3.5 CSP-Ca-Zn 螯合物制备工艺 CSP 溶液 $\rightarrow$ 按比例添加无水氯化钙和七水合硫酸锌 $\rightarrow$ 调节 pH 值和温度 $\rightarrow$ 超声 20 min 后, 恒温振荡 $\rightarrow$ 螯合反应 $\rightarrow$ 冷却, 离心, 上清液加 3 倍无水乙醇 $\rightarrow$ 离心, 取沉淀 $\rightarrow$ 烘干。

预先超声 20 min, 固定振动时间 60 min, 温度 20 °C, pH 3, 钙、锌质量比为 1:1, CSP 与钙、锌质量比为 2:1, 对时间(20, 40, 60, 80, 100 min)、温度(20, 30, 40, 50, 60, 70 °C)、pH 值(2, 3, 4, 5, 6)、钙、锌质量比(2:1, 3:2, 1:1, 1:2, 2:3)和 CSP 与钙、锌质量比(1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1)5 个因素进

表 2 响应面因素及水平

Table 2 Response surface factors and level

因素	水平		
	-1	0	1
A(CSP 与钙、锌质量比)	-1	0	1
B(钙、锌质量比)	-1	0	1
C(pH)	-1	0	1

行工艺优化,分别测定钙螯合率和锌螯合率。在单因素实验的基础上,以钙螯合率和锌螯合率为响应指标,采用 3 因素 3 水平进行响应面优化设计。

1.3.6 紫外光谱分析 将 CSP 和 CSP-Ca-Zn 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,紫外分光光度计设置波长 190~400 nm 范围内进行扫描分析<sup>[20]</sup>。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱分析 取一定质量的样品与 KBr 混合,用研钵均匀研细、压片,红外光谱仪扫描 4 000~400 cm<sup>-1</sup>。

1.3.8 荧光光谱分析 将 CSP 和 CSP-Ca-Zn 配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,设置激发波长

280 nm,发射波长范围 320~500 nm,同时以蒸馏水作为空白<sup>[21]</sup>。

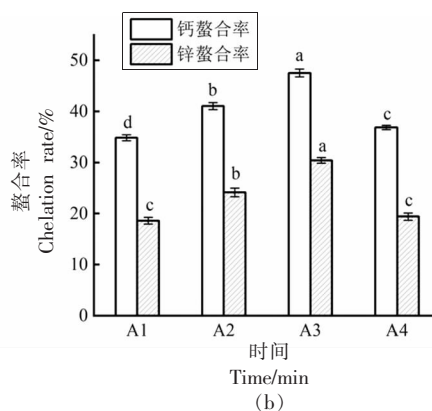
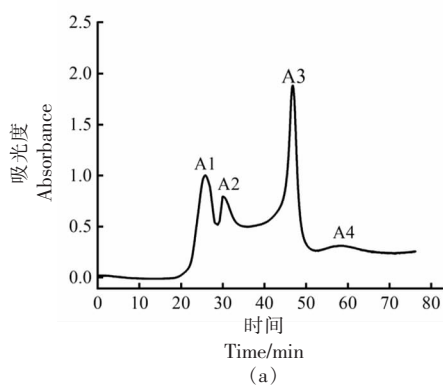
#### 1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次,结果均采用 Origin 2018 软件绘制图表,采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 Sephadex G-15 分离纯化

凝胶色谱是一种基于样品分子质量的分离方法。分子质量较大的样品无法进入凝胶颗粒的凝胶网而先洗脱出来,然后将小分子洗脱出来。薏米发酵上清液经 Sephadex G-15 分离后得到 4 个峰,分别命名为 A1、A2、A3、A4。由图 1b 可以看出,A3 与钙、锌螯合效果最高,分别为 30.42%和 47.54%。研究表明低分子质量肽更有可能与金属螯合,与扁鹊蛋白水解物经 Sephadex G-15 分离后的研究结果相似<sup>[22]</sup>。收集组分 A3 进一步分离。



注:图 b 不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图 1 Sephadex G-15 凝胶层析图谱(a)及各分离峰的钙、锌螯合率(b)

Fig.1 Sephadex G-15 chromatogram (a) and the chelating capacity of calcium and zinc of isolated peak (b)

### 2.2 反相高效液相色谱分离纯化

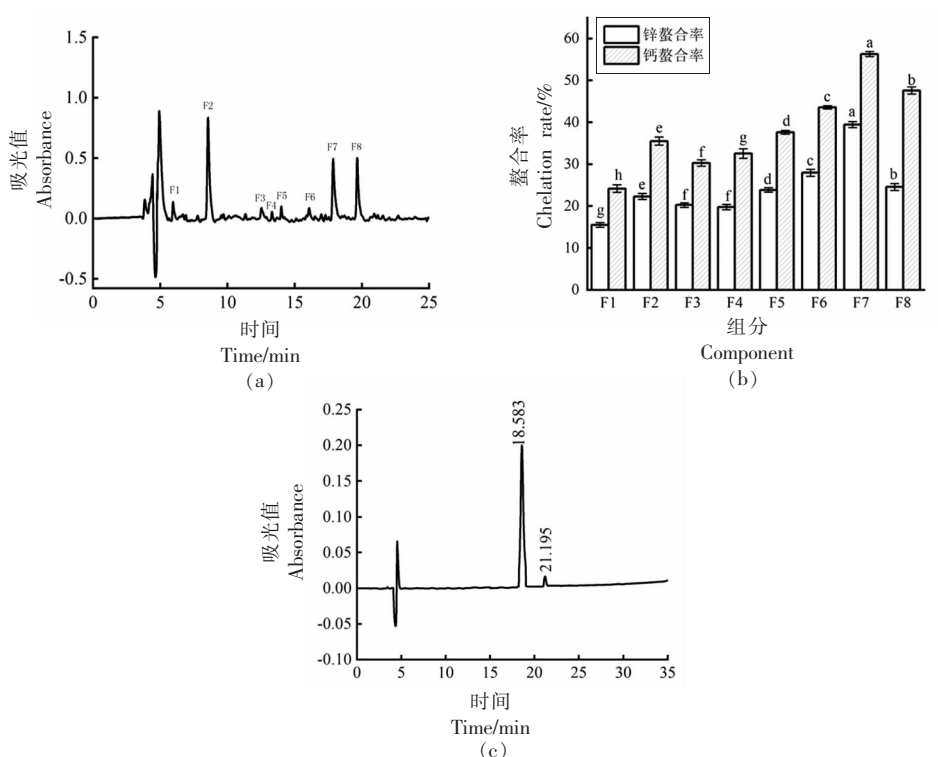
由图 2a 可知,0~5 min 内为溶剂峰,A3 组分经 RP-HPLC 分离后得到 8 个峰,分别为 F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8,各个组分冻干后测定螯合率,结果见图 2b,F7 组分的钙、锌离子螯合率最高,收集 F7 组分,进行纯度分析。在保留时间 18.583 min 处出现信号较强的单一峰(图 2c),纯度达 93.91%,将其命名为 CSP。

### 2.3 CSP 分子质量分析

由图 3 可知,薏米多肽粗发酵液经分离纯化得到的薏米多肽在 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱中显示为单一条带,说明 CSP 达到电泳纯,其分子质量约为 7.8 ku。

### 2.4 CSP-Ca-Zn 螯合物单因素实验结果分析

如图 4 所示,CSP 与锌离子、钙离子的螯合率随着时间的延长,呈先增加后下降的趋势。螯合时



注:图 b 不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 2 A3 组分的 RP-HPLC 分离图 (a) 及其分离峰的钙、锌螯合率 (b) 和 F7 组分纯度鉴定 (c)

Fig.2 RP-HPLC chromatogram of A3 (a) and the chelating capacity of calcium and zinc of its separation peak (b) and the purity identification of component F7 (c)

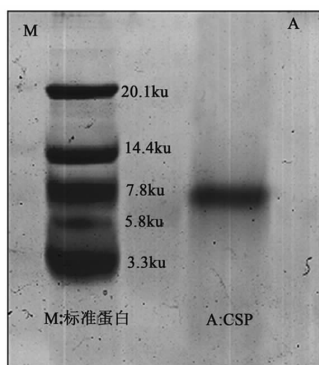


图 3 CSP 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE electrophoretogram of CSP

间过长影响螯合物稳定性,导致螯合率降低<sup>[23]</sup>,表明肽与钙、锌螯合反应快,类似于猪骨胶原肽与钙螯合研究<sup>[4]</sup>。因此,后续优化试验的螯合时间确定为 60 min。

由图 5 可以看出,随着温度的升高,CSP 与锌、钙离子的螯合率先缓慢增加后下降。温度高时,CSP 与两种金属离子的螯合率急剧降低;表

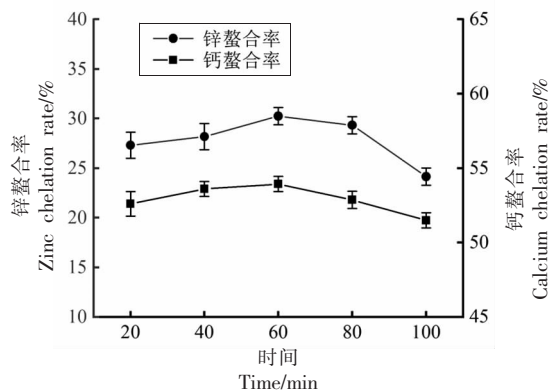


图 4 时间对螯合反应的影响

Fig.4 The effect of time on the chelation reaction

明高温显著影响 CSP 与两种金属离子的螯合,可能原因是温度升高后 CSP 可能发生羧基反应,使得其与金属离子的螯合位点减少,从而影响螯合率<sup>[24]</sup>。因此,选择 50 °C 为后续优化试验的螯合温度。

如图 6 所示,随着 pH 值的升高,CSP 的钙、锌螯合率均呈现先上升后下降的趋势。pH 5~6 时,



CSP 与两种金属离子的螯合率骤降;可能由于 pH 值升高后,溶液中 OH<sup>-</sup>离子增多,与钙、锌两种金属离子形成沉淀,使得螯合物减少,从而降低螯合率<sup>[25]</sup>。

由图 7 可以看出,随着钙、锌比的降低,钙、锌螯合率呈先上升后下降的趋势。在钙、锌质量比为 1:1 时,钙螯合率最高为 52.7%,锌螯合率最高为 34.8%,说明无论钙或锌含量过多时,其螯合率并不会提升。因此,选用钙、锌质量比例 1:1 最为合适。

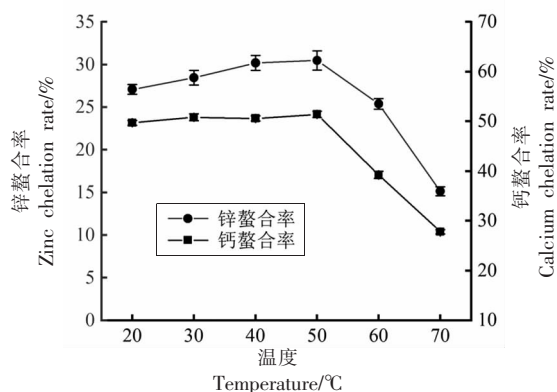


图 5 温度对螯合反应的影响

Fig.5 The effect of temperature on the chelation reaction

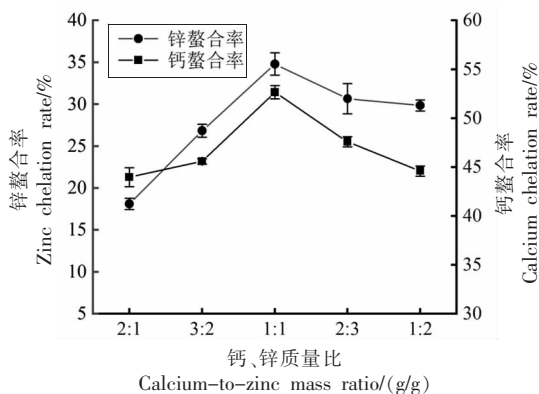


图 7 钙、锌质量比对螯合反应的影响

Fig.7 The effect of calcium-to-zinc mass ratio on the chelation reaction

### 2.5 响应面分析

在单因素实验结果的基础上,选取 CSP 与钙、锌质量比(A)、钙、锌质量比(B)、pH(C)3 个主要因素,以锌螯合率(Y<sub>1</sub>)和钙螯合率(Y<sub>2</sub>)为响应值,采用 3 因素 3 水平响应面法确定最佳工艺条件,响应面优化试验设计见表 3。

如图 8 所示,随着 CSP 与钙、锌质量比的增大,钙、锌螯合率上升至不变或缓慢下降。CSP 与钙、锌质量比在 4:1 时,钙、锌螯合率最高;当 CSP 含量低时,大部分钙、锌离子未参与螯合<sup>[26]</sup>,因此 CSP 含量增多,有利于提高螯合率;当 CSP 含量升高至一定程度,多肽与金属螯合位点饱和,不利于螯合反应进行,螯合率也不会提升,且会造成 CSP 浪费<sup>[27]</sup>。

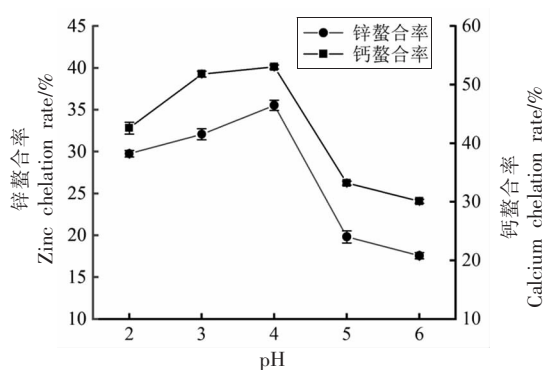


图 6 pH 对螯合反应的影响

Fig.6 The effect of pH on the chelation reaction

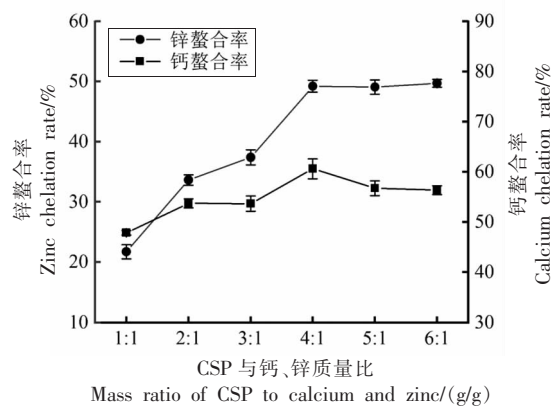


图 8 CSP 与钙、锌质量比对螯合反应的影响

Fig.8 The effect of mass ratio of CSP to calcium and zinc on chelating reaction

如表 3 所示,使用 Design Expert 10.0.7 软件对数据进行多元回归拟合,得到的回归方程如下:

$$Y_1 = 49.05 + 2.52A - 1.33B - 10.10C - 3.74AB - 1.94AC + 2.38BC - 7.85A^2 - 5.47B^2 - 13.52C^2$$

$$Y_2 = 62.65 + 5.24A - 1.17B - 3.31C - 6.22AB - 2.91AC - 0.010BC - 7.55A^2 - 11.58B^2 - 17.53C^2$$

表3 响应面试验设计方案及结果

Table 3 Design scheme and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	$Y_1$ 锌螯合率/%	$Y_2$ 钙螯合率/%
1	-1	0	-1	32.78	30.69
2	1	0	-1	41.40	48.71
3	0	0	0	52.61	60.72
4	-1	-1	0	31.62	32.90
5	0	0	0	47.44	61.89
6	0	0	0	45.28	65.39
7	-1	1	0	34.50	45.37
8	-1	0	1	17.83	32.25
9	0	0	0	51.32	62.22
10	0	1	-1	38.10	35.68
11	0	1	1	21.28	26.69
12	0	0	0	48.60	63.05
13	0	-1	1	17.25	31.42
14	1	-1	0	44.42	54.10
15	1	0	1	18.69	38.64
16	0	-1	-1	43.59	40.37
17	1	1	0	32.36	41.70

由表4可知,对于锌螯合率和钙螯合率这2个响应值,模型 $P$ 值均小于0.0001,表明模型显著;失拟项 $P$ 值均大于0.05,不显著;从表5可知,锌螯合率和钙螯合率的 $R^2$ 分别为0.9798和0.9858,校正后 $R^2$ 分别为0.9538和0.9676,说明模型拟合度较好。由 $F$ 值可以看出,以锌螯合率为响应指标,该模型显示,一次项中, $A$ 影响显著, $C$ 影响极显著;二次项 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 影响极显著( $P < 0.01$ ),交互项 $AB$ 的影响显著( $P < 0.05$ ),而其它

交互项则影响不显著( $P > 0.05$ ),3个因素对锌螯合率的影响程度为 $C > A > B$ ,即 $\text{pH} > \text{CSP}$ 与钙、锌质量比 $>$ 钙、锌质量比。以钙螯合率为响应指标,该模型显示,一次项中, $A$ 、 $C$ 影响极显著;二次项 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 影响极显著( $P < 0.01$ ),交互项 $AB$ 的影响显著( $P < 0.05$ ), $AC$ 影响显著( $P < 0.05$ ),3个因素对钙螯合率的影响程度为 $A > C > B$ ,即 $\text{CSP}$ 与钙、锌质量比 $>$  $\text{pH} >$ 钙、锌质量比。

表4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

响应值	来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性
锌螯合率	模型	2 242.32	9	249.15	37.72	< 0.0001	**
	$A$	50.7	1	50.7	7.68	0.0277	*
	$B$	14.15	1	14.15	2.14	0.1867	
	$C$	816.48	1	816.48	123.61	< 0.0001	**
	$AB$	55.8	1	55.8	8.45	0.0228	*
	$AC$	15.05	1	15.05	2.28	0.1749	
	$BC$	22.66	1	22.66	3.43	0.1064	
	$A^2$	259.63	1	259.63	39.3	0.0004	**
	$B^2$	126.1	1	126.1	19.09	0.0033	**
	$C^2$	769.93	1	769.93	116.56	< 0.0001	**
	残差	46.24	7	6.61			
	失拟项	11.41	3	3.8	0.44	0.7391	
	纯误差	34.83	4	8.71			
总误差	2 288.56	16					

(续表 4)

响应值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
钙螯合率	模型	2 817.09	9	313.01	54.17	< 0.0001	**
	A	219.87	1	219.87	38.05	0.0005	**
	B	10.93	1	10.93	1.89	0.2114	
	C	87.45	1	87.45	15.14	0.006	**
	AB	154.63	1	154.63	26.76	0.0013	**
	AC	33.81	1	33.81	5.85	0.0461	*
	BC	4.00×10 <sup>-4</sup>	1	4.00×10 <sup>-4</sup>	6.92×10 <sup>-5</sup>	0.9936	
	A <sup>2</sup>	240.14	1	240.14	41.56	0.0004	**
	B <sup>2</sup>	565.06	1	565.06	97.8	< 0.0001	**
	C <sup>2</sup>	1 293.82	1	1 293.82	223.93	< 0.0001	**
	残差	40.44	7	5.78			
	失拟项	28.29	3	9.43	3.1	0.1513	
	纯误差	12.15	4	3.04			
总误差	2 857.53	16					

注:\*. 影响显著( $P < 0.05$ );\*\*. 影响极显著( $P < 0.01$ )。

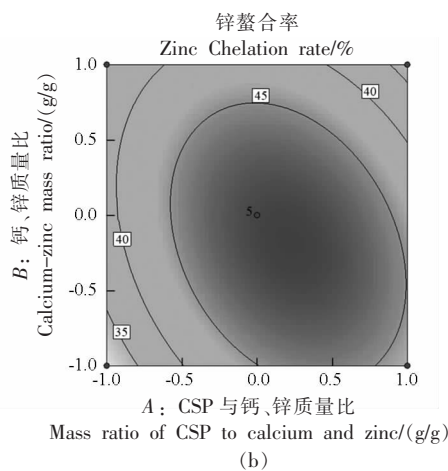
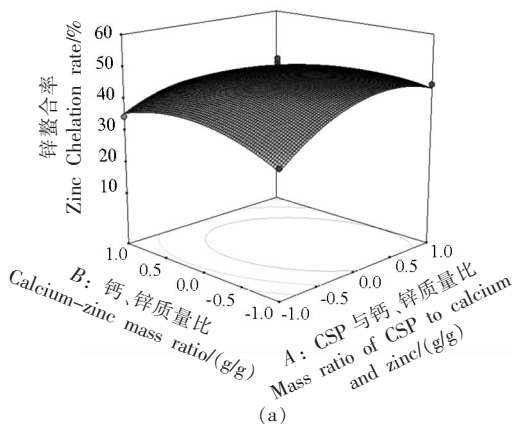
表 5 模型可信度分析

Table 5 Reliability analysis of models

响应值	R <sup>2</sup>	校正 R <sup>2</sup>	变异系数/%
锌螯合率	0.9798	0.9538	0.8965
钙螯合率	0.9858	0.9676	0.8350

响应面坡度越陡表明影响越显著。对于锌螯合率响应值, AB 交互作用形成的响应曲面较陡(图 9a), 说明 AB 交互作用对锌螯合率的影响显著; 从图 9b 可以看出, AB 等高线呈椭圆形, 交互作用明显, 与方差分析结果一致。而对于钙螯合率响应值, 由图 9c 和 9e 可知, AC 交互作用形成的响应曲面更陡, 表明 AC 交互作用影响更显著。由图 9d 和 9f 可知, AB 和 AC 等高线均呈现椭圆形, 交互作用明显; 且 AB 等高线的椭圆程度大于 AC, 与方差分析结果一致。

经 Design-Expert 10.0.7 软件分析得出最佳制备工艺: CSP 与钙、锌质量比 4.351:1, 钙、锌质量比为 0.998:1, pH 值为 3.743; 模型预测的锌螯合率 51.27%, 钙螯合率 63.731%。根据试验的可操作性, 稍微调整最佳条件: CSP 与钙、锌质量比 4.4:1, 钙、锌质量比为 1:1, pH 值为 3.7, 重复 3 次试验, 锌螯合率、钙螯合率的实际值分别为 52.63% 和 63.79%, 与模型预测值基本吻合, 说明此模型可用来制备 CSP-Ca/Zn 螯合物。



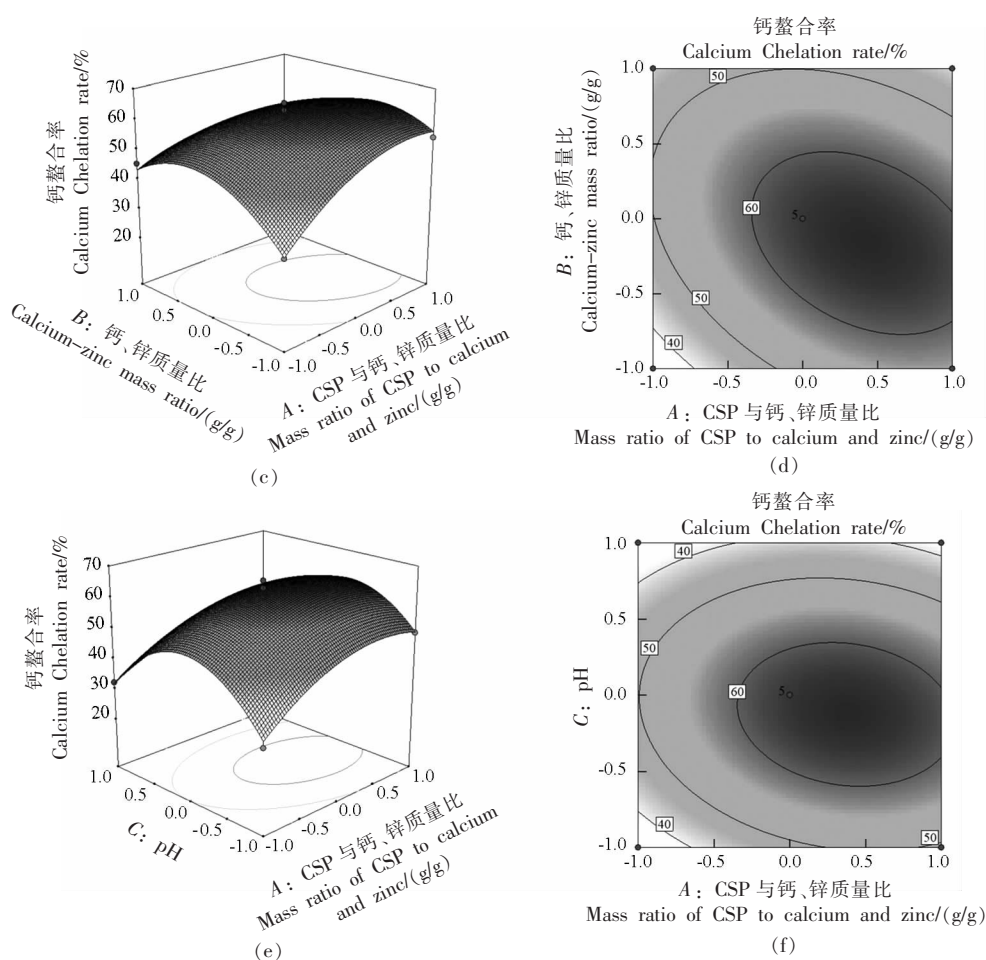


图9 各因子交互作用的响应面图和等高线图

Fig.9 Response surface map and contour map of each factor interaction

## 2.6 紫外光谱分析

金属离子与有机配体形成的络合物可能导致新吸收峰的出现或原始吸收峰的位移或消失<sup>[28]</sup>。如图10所示,CSP与CSP-Ca-Zn螯合物的紫外光谱有明显区别,CSP在269 nm和199 nm处均产生吸收峰,280 nm附近的吸光度被认为是苯丙氨酸的特征吸收,CSP与钙、锌螯合后吸收峰由269 nm移动到259 nm,且吸收强度增强,可能是因为涉及C=O,COOH,-OH和-NH<sub>2</sub>基团手性结构发生改变<sup>[29]</sup>;肽骨架的紫外吸收主要在199~220 nm,CSP与钙、锌螯合后的最大吸收峰由199 nm改变到197 nm,最大吸收波向短波长偏移<sup>[30]</sup>;可能原因是钙、锌与CSP肽键中的基团形成络合物,导致原有基团的相应原子价电子跃迁发生变化<sup>[31]</sup>。表明CSP-Ca-Zn螯合物是一种不同于CSP的新物质。

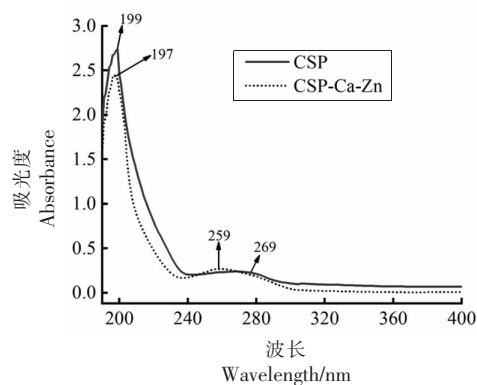


图10 CSP与CSP-Ca-Zn螯合物的紫外光谱图

Fig.10 Ultraviolet spectra of chelates of CSP and CSP-Ca-Zn

## 2.7 傅里叶变换红外光谱分析

由图11可以看出,3387.02 cm<sup>-1</sup>附近由N-H伸缩振动产生的宽吸收峰红移至3452.32 cm<sup>-1</sup>;



2 929.05  $\text{cm}^{-1}$  左右处由 C-H 伸缩振动的吸收峰蓝移至 2 924.34  $\text{cm}^{-1}$ ;可能是由于 CSP 与钙、锌配位引起的拉伸或氢键被取代所致<sup>[32]</sup>。酰胺一代 1 639.70  $\text{cm}^{-1}$  附近由 C=O 键伸缩振动产生的吸收峰降至 1 618.42  $\text{cm}^{-1}$ , 说明羧酸基参与了 CSP-Ca-Zn 复合体的形成; 酰胺二代 1 569.99  $\text{cm}^{-1}$  附近由 N-H 弯曲振动产生的特征吸收峰消失, 表明氨基有助于肽-钙锌螯合物形成<sup>[33]</sup>; 1 410.86  $\text{cm}^{-1}$  附近为肽键的特征吸收峰, 对应于羧酸基团 COO<sup>-</sup>, 偏移至 1 407.73  $\text{cm}^{-1}$  且吸收强度明显变弱且几乎消失, 说明可能是 COO<sup>-</sup>参与了结合<sup>[34]</sup>; 1 149.31, 1 035.19  $\text{cm}^{-1}$  附近的 C-O 键的伸缩振动产生的吸收峰分别偏移至 1 148.65  $\text{cm}^{-1}$  附近或消失, 表明 C-O 键参与了结合<sup>[35]</sup>。800~500  $\text{cm}^{-1}$  观察

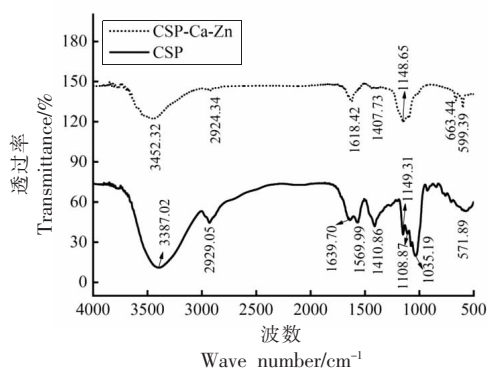


图 11 CSP 与 CSP-Ca-Zn 螯合物的红外光谱图

Fig.11 Infrared spectra of CSP and CSP-Ca-Zn

### 3 结论

本研究利用枯草芽孢杆菌和嗜热链球菌混合发酵薏米多肽粗发酵液, 然后依次经 Sephadex G-15 凝胶、反相高效液相色谱分离得到纯度为 93.91%, 分子质量约为 7.8 ku 的薏米多肽(CSP)。通过单因素和响应面试验优化螯合工艺, CSP-Ca-Zn 螯合物的最佳制备条件为: CSP 与钙、锌质量比 4.4:1, 钙、锌质量比为 1:1, pH 值为 3.7, 锌螯合率、钙螯合率分别为 52.63%和 63.79%, 与模型预测值接近。紫外光谱、红外光谱和荧光光谱分析结果发现 CSP 的氨基氮和羧酸根可能参与了钙、锌的螯合, 螯合前、后结构发生变化。然而关于 CSP 与金属螯合结构关系, 以及 CSP-Ca-Zn 螯合

到的几个谱带是由于 C-H 和 N-H 键的振动引起的, 而在 CSP-Ca-Zn 红外谱图中则不存在, 571.89  $\text{cm}^{-1}$  偏移为高强度的 599.39  $\text{cm}^{-1}$ , 新出现的谱带 663.44  $\text{cm}^{-1}$  是由于 N-Ca-Zn 伸缩振动引起的<sup>[36]</sup>。综上所述, 推测 CSP 的氨基氮、羧酸基可能参与了金属离子螯合。

### 2.8 荧光光谱分析

荧光强度的变化可以有效反映有机配体基团与金属离子的相互作用<sup>[37]</sup>。从图 12 可以看出, CSP 与钙、锌螯合后的吸收峰强度变弱, 吸收峰位置由 364 nm 红移至 376 nm。原因可能是发色团与钙、锌离子生成新的结构改变了激发态能量<sup>[38]</sup>。也有可能是钙、锌以配位键方式与多肽的-COO 和-NH 基团结合, 导致多肽的折叠, 降低了荧光强度<sup>[39]</sup>。

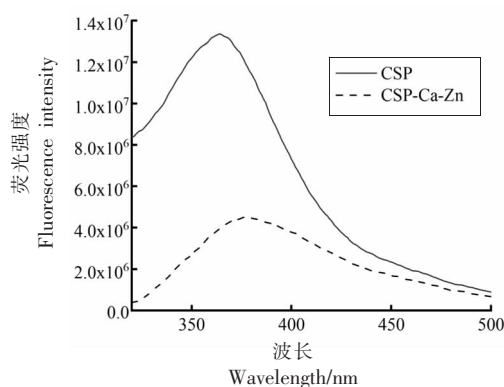


图 12 CSP 与 CSP-Ca-Zn 螯合物的荧光光谱图

Fig.12 Fluorescence spectra of chelates of CSP and CSP-Ca-Zn

物在胃肠道及体内吸收和转运机制尚不清楚, 有待深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG X W, JIA Q, LI M Y, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from phosvitin hydrolysates and the study of its calcium chelation mechanism[J]. Food Research International, 2021, 141(3): 110169.
- [2] WANI A L, PARVEEN N, ANSARI M O, et al. Zinc: an element of extensive medical importance[J]. Current Medicine Research and Practice, 2017, 7(3): 90-98.

- [3] UDECHUKWU M C, COLLINS S A, UDENIGWE C C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides[J]. Food & Function, 2016, 7(10): 4137-4144.
- [4] WU W M, HE L C, LIANG Y H, 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.
- [5] 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): 59-66.
- FU T X, ZHANG S, SHENG Y N, et al. Preparation, structure and in vitro digestibility of zinc-chelating mung bean peptide [J]. Food Science, 2020, 41(4): 59-66.
- [6] WANG Z X, SUN J T, MA X Y, et al. Characterization of a synthetic zinc-chelating peptide from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its gastrointestinal digestion and absorption *in vitro* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(11): 4542-4550.
- [7] ZHANG T, XIAO S Y, DING Z H, et al. Effects of superfine grinding on physicochemical properties and morphological structure of coix seed powders[J]. Journal of Cereal Science, 2021, 102: 103361.
- [8] 王清爽, 高珊, 朱灵灵, 等. 干酪乳杆菌发酵对发芽薏米营养成分和生物活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(4): 12-18.
- WANG Q S, GAO S, ZHU L L, et al. Effect of *Lactobacillus casei* fermentation on the nutritional components and biological activities of germinated adlay[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Associatio, 2020, 35(4): 12-18.
- [9] 石庆楠, 文安燕. 薏米发酵及其产物功能活性研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(6): 11-14.
- SHI Q N, WEN A Y. Research progress on *Coix lachrymajobi* fermentation and its functional activity [J]. China Brewing, 2021, 40(6): 11-14.
- [10] WEN A Y, XIE C Z, MAZHAR M, et al. Tetramethylpyrazine from adlay (*coix lacryma-jobi*) biotransformation by *Bacillus subtilis* and its quality characteristics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(11): 1-11.
- [11] YIN H M, ZHONG Y D, XIA S K, et al. Effects of fermentation with *Lactobacillus plantarum* NCU137 on nutritional, sensory and stability properties of Coix (*Coix lachryma-jobi* L.) seed[J]. Food Chemistry, 2020, 314(C): 126037.
- [12] 毛新亮, 张卉, 陈文杰, 等. 薏苡仁多菌发酵液的菌种优选及其抑制黑色素生成的作用研究[J]. 生物技术进展, 2022, 12(6): 929-936.
- MAO X L, ZHANG H, CHEN W J, et al. Study on strain optimization of coix seed multi lactobacillus fermentation broth and its inhibition on melanin production[J]. Current Biotechnology, 2022, 12(6): 929-936.
- [13] 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. Study on preparation technology of rice bran peptide-iron-zinc chelate[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(16): 6579-6585.
- [14] 赵仁英. 锌铁双金属与胶原蛋白螯合规律的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- ZHAO R Y. Study on the rule of zinc-iron bimetallic chelated with collagen[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017.
- [15] HOU H, WANG S K, 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.
- [16] 张海燕, 蒋丽. 有机酸钙锌盐中钙锌含量的快速检测方法[J]. 中国橡胶, 2017, 33(17): 43-45.
- ZHANG H Y, JIANG L. Rapid detection method of calcium and zinc content in organic acid zinc salt[J]. China Rubber, 2017, 33(17): 43-45.
- [17] FANG S X, RUAN G R, HAO J, et al. Characterization and antioxidant properties of Manchurian walnut meal hydrolysates after calcium chelation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 130(1): 1-9.
- [18] KHEEREE N, SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, et al. ACE inhibitory peptides derived from de-fatted lemon basil seeds: Optimization, purification, identification, structure-activity relationship and molecular docking analysis [J]. Food & Function, 2020, 11(9): 8161-8178.
- [19] 王雪燕, 陈瑛, 张嘉敏, 等. 草鱼鱼鳞抗菌肽与肉桂精油联合抑菌作用及机理[J]. 食品科学, 2020, 41

- (23): 100–106.
- WANG X Y, CHEN Y, ZHANG J M, et al. Combined antimicrobial effect and mechanism of antimicrobial peptide from grass carp scale and cinnamon essential oil[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 100–106.
- [20] 陈嘉琪, 张珍, 费莹莹, 等. 羊骨多肽亚铁螯合物的制备工艺优化及结构表征[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(5): 1–7, 21.
- CHEN J Q, ZHANG Z, FEI Y Y, et al. Preparation process optimization and structure characterization of sheep bone polypeptide chelate with ferrous iron[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2021, 57(5): 1–7, 21.
- [21] 刘晶晶, 徐蕴桃, 朱晨慧, 等. 河蚬抗氧化肽-锌螯合物的制备及结构表征[J]. *食品与机械*, 2020, 36(10): 28–31, 48.
- LIU J J, XU Y T, ZHU C H, et al. Preparation and structural characterization of zinc-binding antioxidant peptides from corbicula fluminea hydrolysate[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(10): 28–31, 48.
- [22] CHEN M, JI H W, ZHANG Z W, et al. A novel calcium-chelating peptide purified from auxis thazard protien hydrolysate and its binding properties with calcium[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103447.
- [23] 尹乐斌, 何平, 李乐乐, 等. 豌豆多肽-亚铁螯合物制备工艺优化及抗氧化研究[J]. *中国调味品*, 2022, 47(4): 149–153, 159.
- YIN L B, HE P, LI L L, et al. Optimization of preparation technology and antioxidant activity of pea polypeptide-ferrous chelate [J]. *China Condiment*, 2022, 47(4): 149–153, 159.
- [24] 许家宝, 贾晓彤, 陆世海, 等. 芝麻多肽螯合钙的制备及其补钙效果研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(5): 106–114.
- XU J B, JIA X T, LU S H, et al. Preparation and calcium supplement effect of sesame peptide chelated calcium [J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(5): 106–114.
- [25] 郑英敏, 袁杨, 苏东晓, 等. 大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 160–165.
- ZHENG Y M, YUAN Y, SU D X, et al. Preparation process optimization of soy peptides-zinc chelate and its structural characterization [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 160–165.
- [26] 遆光慧, 布冠好, 王美月, 等. 花生肽亚铁螯合物的制备工艺优化及结构特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3754–3761.
- TI G H, BU G H, WANG M Y, et al. Study on preparation process optimization and structural characteristics of peanut peptide ferrous chelate[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(12): 3754–3761.
- [27] 万婧惊, 吴鹏, 林凌, 等. 美国红鱼鱼鳞制备多肽金属螯合物的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 165–171.
- WAN J L, WU P, LIN L, et al. Optimization of preparation process of polypeptide metal chelates from the scales of american red fish (*Sciaenops ocellatus*) [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(8): 165–171.
- [28] 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.
- [29] LIU X Y, WANG Z X, ZHANG J, et al. Isolation and identification of zinc-chelating peptides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) protein hydrolysate [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(14): 6400–6407.
- [30] YUAN B, ZHAO C, CHENG C, et al. A peptide-Fe (II) complex from grifola frondosa protein hydrolysates and its immunomodulatory activity[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100459.
- [31] ZHANG X W, JIA Q, LI M Y, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from phosvitin hydrolysates and the study of its calcium chelation mechanism[J]. *Food Research International*, 2021, 141(3): 110169.
- [32] WANG X Q, ZHANG Z, XU H Y, et al. Preparation of sheep bone collagen peptide-calcium chelate using enzymolysis-fermentation methodology and its structural characterization and stability analysis [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(20): 11624–11633.
- [33] ZHANG K, LI J W, HOU H, et al. Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from pacific cod (*Gadus macrocephalus*)

- bone: Molecular properties and calcium chelating modes[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 670–679.
- [34] SUN N, WANG T T, WANG D, et al. Antarctic krill derived nonapeptide as an effective iron-binding ligand for facilitating iron absorption via the small intestine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(40): 11290–11300.
- [35] QU W J, FENG Y T, XIONG T, et al. Preparation of corn ACE inhibitory peptide-ferrous chelate by dual-frequency ultrasound and its structure and stability analyses[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 83: 105937.
- [36] WU W F, LI B F, HOU H, et al. Identification of iron-chelating peptides from pacific cod skin gelatin and the possible binding mode[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 35: 418–427.
- [37] LIN S T, HU X, LI L H, et al. Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 149: 111796.
- [38] 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.
- [39] ZHU S Y, ZHENG Y M, HE S, et al. Novel Zn-binding peptide isolated from soy protein hydrolysates: Purification, structure, and digestion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 69(1): 483–490.

### Preparation and Structural Characterization of Coix Seed Polypeptide-Calcium-Zinc Chelate

Hu Xianglian, Li Ping, Zhou Liusha, Yu Yuyuan, Xu Haixing, Shi Yongqing\*  
(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** This paper's main aim has been to prepare an polypeptide-calcium-zinc chelate from coix seed and to investigate its structure. *Bacillus subtilis* and *Streptococcus thermophilus* were used for fermentation of coix seed (CS). Polypeptide from coix seed (CSP) was separated and purified by gel filtration chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The molecular weight of CSP was detected by Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Tricine-SDS-PAGE) electrophoresis. Taking the chelation rate of zinc and calcium as indicators, single factor and response surface methodology were used to determine optimum preparation conditions of coix seed polypeptide-calcium-zinc (CSP-Ca-Zn) chelate. Ultraviolet spectra, fourier infrared and fluorescent light spectra were applied to predict the structure of CSP-Ca-Zn. The results showed that four components were separated by Sephadex G-15. Among them, A3 showed the highest the chelating capacity of calcium and zinc. A3 was separated by RP-HPLC. The purity of CSP was as high as 93.91%, and its molecular mass was around 7.8 ku. The optimal chelate conditions were determined as follows: mass ratio of CSP to Ca-Zn 4.4:1, mass ratio of calcium to zinc 1:1, and pH 3.7. Under these conditions, the chelation rates of zinc and calcium were 52.63% and 63.79%, respectively. The principal binding sites of CSP with calcium and zinc were amino nitrogen and carboxylic acid group, and its spatial structure was also changed. This optimal chelate conditions could obtain CSP-Ca-Zn, which has provided technical reference for the development of new products of coix seed peptide and a new idea for food-borne organic calcium and zinc supplements.

**Keywords** coix seed; fermentation; purification; peptide-calcium-zinc chelate; structure