

玉米肽钙螯合物的结构表征和螯合机制

吴晗硕^{1,2}, 任杰², 付少委², 张新雪², 冯志远², 李书国^{1*}, 刘文颖^{2*}

(¹河北科技大学食品与生物学院 石家庄 050091

²中国食品发酵工业研究院 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心 北京 100015)

摘要 为探究玉米肽钙螯合物的结构特性和肽段与钙离子的结合位点,以玉米肽和氯化钙为原料制备玉米肽钙螯合物,通过傅里叶变换红外光谱、核磁共振光谱分析、热重分析和质谱分析对玉米肽钙螯合物的结构进行表征,并用分子对接技术模拟玉米肽肽段和钙离子结合位点。傅里叶红外光谱测定结果表明:玉米肽和钙离子螯合后,酰胺 I 带和酰胺 II 带红移和 N-H 键蓝移,COO⁻的伸缩振动于 1400 cm⁻¹ 左右产生红移。核磁共振光谱分析显示,玉米肽钙螯合后吸收峰普遍减弱和消失。热重显示降解阶段降解率分别为 43.26%和 65.05%,残留率显著提高,由 19%提高到 38.6%。质谱分析得出 7 条肽段序列,选择两条疏水性氨基酸较多的肽段和钙离子做分子对接,模拟结合位点。Asn-Gln-Phe-Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg (NQFSLINPVLSR)、Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala (SLINPVLSRQQPIVGGA)和钙离子的结合能分别为-68.08 kJ/mol 和-67.56 kJ/mol。推测多肽氨基酸残基上的羧基氧原子和氨基是螯合钙离子的主要位点,玉米肽和钙螯合后热稳定性较玉米肽显著增强。

关键词 玉米肽; 钙; 螯合; 结构表征; 分子对接

文章编号 1009-7848(2024)10-0115-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.011

玉米是世界主要作物,我国玉米年产量曾达到 2.08 亿 t,约占世界产量的五分之一。玉米蛋白粉是玉米加工成淀粉过程中产生的一种副产物,包括球蛋白、玉米醇溶蛋白和谷蛋白等,其中玉米醇溶蛋白含量高达 65%~68%^[1-2]。玉米醇溶蛋白为疏水性,其所含的非极性氨基酸含量可达到其总氨基酸的 50%,如 Leu、Pro、Ala 等^[3]。玉米蛋白通过酶解可得到相对分子质量较低的玉米肽。玉米肽是由 2~20 个氨基酸构成的小分子短肽,它的来源广泛且具有价格较低,溶解性较强,易吸收,无毒副作用等性质,还具有许多生物学活性,如促进酒精代谢、降脂、护肝、抗疲劳、降血糖、抗氧化、抗炎等^[4]。

钙是一种人体需求量较大的常量矿物元素,它在人体中的含量约为 1.5%~2%。大多数存在于骨骼和牙齿中,并有少数钙离子存在于软组织、血液和细胞中,参与机体日常活动和代谢,如细胞内

信号传导、神经元传递等^[5]。人体缺钙会导致骨质疏松、佝偻病等许多疾病,人体需通过日常饮食或者药物来吸收足量的钙。现有许多以无机钙和有机钙形式的钙补充剂,然而前者的含量较高,消化不了的部分就会由肾脏排出体外,或者遗留在肾脏中导致肾结石,后者有一定的副作用。在肠道中,钙以离子状态存在于 pH 值较低的环境下,若 pH 呈中性或碱性,则钙离子易生成沉淀,影响机体钙的吸收效果^[6]。

氨基酸螯合钙已有较多研究,其能与钙离子结合的集团主要有氨基酸的 α -氨基、侧链配体基团和羧基,此外,肽键上的羰基或去质子化的氨基氮也可与钙离子配位结合,形成更稳固的结构^[7]。肽钙螯合物通常以钙离子为中心,其它原子和氨基酸结合并与钙离子形成五元或六元环结构,此结构较为稳定^[8-10]。人体吸收氨基酸或小分子肽段与钙离子的螯合物后,螯合物被分解成钙离子和氨基酸或小肽,被小肠分别吸收利用^[11]。人体不仅可以吸收螯合形式的钙,而且可以有效释放钙离子,肽钙螯合物可以作为一种新型钙补充剂^[12]。玉米肽有许多特定的基团和不同的活性位点,能以许多不同的方式和钙离子结合。有研究表明在玉米胞质中有 261~281 个位点的 21 个氨基酸序列

收稿日期: 2023-10-21

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEG02027)

第一作者: 吴晗硕,女,硕士生

通信作者: 李书国 E-mail: shuguolee@126.com

刘文颖 E-mail: wenyngliu888@126.com

是 CaM 结合位点,可以增加钙和骨骼的结合^[13]。目前,关于玉米肽钙螯合物的结构特征及钙结合机制的研究鲜有报道。本研究以玉米肽和氯化钙为原料制备玉米肽螯合钙,采用傅里叶变换红外光谱、核磁共振光谱分析、热重分析和质谱分析鉴定玉米肽钙螯合物的结合位点,并用软件模拟方法预测肽段和钙离子的结合位点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米肽,本实验室通过两步酶解法获得;超纯水,本实验室自制;乙腈(色谱纯),美国 Fisher 公司;氯化钙、无水乙醇、甲酸等均为分析纯级试剂,北京化学试剂公司;溴化钾(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SJ-3F 型 pH 计,上海精密仪器有限公司;PI403 型天平,梅特勒-托利多仪器公司;Nicolet6700 型傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司;STA449F3 Jupiter 同步 TG-DSC 热分析仪,耐驰;Q-Exactive 质谱仪,赛默飞世尔科技公司;picoSpin45 核磁共振波谱仪,赛默飞世尔科技公司;KQ-250E 超声波振荡器,昆山市超声仪器有限公司;VORTEX-5 漩涡混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;1204007 恒温水浴锅,苏州珀西瓦尔实验设备有限公司;DHG-9075A 电热恒温鼓风干燥箱,北京陆希科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米肽螯合钙的制备 将玉米肽粉溶解于蒸馏水中。根据后续不同试验条件,用 1 mol/L 盐酸和氢氧化钠调节 pH 至所需数值,按一定的肽盐比(质量分数)加入 CaCl_2 ,用漩涡混合仪混合均匀。然后恒温水浴螯合,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液逐渐加入 3 倍体积的无水乙醇,静置 2 h,在 8 000 r/min 离心 10 min,将沉淀真空冷冻干燥得到玉米肽钙螯合物。

1.3.2 傅里叶红外光谱分析 称取玉米肽和玉米肽钙螯合物各 5 mg 于玛瑙研钵中,加入 500 mg 干燥的 $\text{KBr}^{[14]}$,混合均匀,将混合物研磨至粒径为 2.5 μm 以下的粉末。将粉末置于压片机下压成透明薄片,用傅里叶变换红外光谱仪于 4 000~500

cm^{-1} 扫描范围进行全波长扫描,光谱分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描 32 次。每个样品重复测试 3 次,结果用透光率($T\%$)表示。

1.3.3 核磁共振光谱分析 分别取玉米肽和玉米肽钙螯合物 0.5 mg 溶解于 500 μL 去离子水中,调节 pH 值为 6.8,加入 50 μL 重水,将样品滴定在核磁共振管中,上机测试。

1.3.4 TG 热重分析 采用 TG-DSC 热分析仪扫描,分别称取玉米肽和玉米肽钙螯合物各 5 mg 于铝坩埚上,将样品皿及参比皿(空坩埚)放入热重分析仪样品池中。设置扫描温度 50~900 $^{\circ}\text{C}$,升温速率 10 K/min, N_2 流速 30 mL/min,记录样品的实时质量。在样品升温过程中得到温度-质量关系曲线,比较玉米肽与玉米肽钙螯合物的稳定性。

1.3.5 质谱结构鉴定 流速:0.30 $\mu\text{L}/\text{min}$;洗脱时间:65 min;分析柱:75 $\mu\text{m}\times 150$ mm;C18 捕获柱:300 A,5 μm ;流动相 A:0.1%甲酸和超纯水;流动相 B:80%乙腈和 0.1%甲酸;扫描方式:全扫描;分辨率:70 000;扫描范围:350~1 800 m/z ;碰撞能量:29%标准化碰撞能量。

1.3.6 分子对接 使用 Discovery Studio 2019 中的半柔性对接进行玉米肽肽段与 Ca^{2+} 的分子对接。玉米肽肽段三维结构在 Discovery Studio 2019 构建, Ca^{2+} (CID:271)的三维结构从 PubChem 数据库下载。将玉米肽肽段设置为受体, Ca^{2+} 设置为配体,创建覆盖整个肽段的对接口袋,进行对接。使用 Discovery studio 2019 软件对玉米肽肽段与 Ca^{2+} 的相互作用类型进行评估并绘制球棍模型。使用 pymol 进行可视化分析并绘制 3D 图,使用 ligplus 绘制 2D 图。

1.3.7 统计分析 所有测定均进行 3 次,光谱分析结果用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 傅里叶红外光谱分析

当使用连续变化频率的红外光照射多肽时,分子吸收特定频率的红外光,从基态跃迁到激发态,使这个区域的透射光减弱^[15]。多肽中有许多官能团,如羧基、羰基和氨基等,它们能与金属离子配位。在肽与金属离子螯合之后,这些特征基团在红外光谱中的吸收峰会产生一定的位移。整个红

外光谱可分为两个区域,波数 $4\ 000\sim 1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 的区域称为官能团区,波数为 $1\ 300\sim 600\ \text{cm}^{-1}$ 的区域称为指纹区^[16],通过比较多肽与肽钙整合物特征基团吸收峰的位移变化,推断肽钙整合位点。玉米肽和玉米肽钙整合物在 $500\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 波数范围的红外光谱图如图 1 所示。与玉米肽图谱相比,玉米肽和钙整合后的红外图谱发生明显的偏移,特别是在 $1\ 000\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 波段,说明肽和钙整合后,肽链中的某些氨基酸基团参与反应,导致振动频率发生变化,从而引起吸收峰的改变。在玉米肽的红外光谱图中, $3\ 281.41\ \text{cm}^{-1}$ 是由 N-H 伸缩振动引起的^[17]。玉米肽钙整合物的红外光谱图中,吸收峰在 $3\ 268.31\ \text{cm}^{-1}$ 处,发生蓝移,且强度增强,这可能是钙原子替代了氢原子,发生电子的跃迁,导致分子中化学键的振动频率发生变化,说明 N-H 的电子云密度增强是由于感应效应或是偶极场效应^[16]。推测玉米肽肽链中的 N 端氨基和侧链中的氨基与 Ca^{2+} 整合后形成 N-Ca。

在玉米肽和钙离子整合时,酰胺 I 带($1\ 700\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$)的吸收峰主要由 C=O 伸缩振动所引起^[18]。谱图中玉米肽吸收峰在 $1\ 645.29\ \text{cm}^{-1}$ 处,整合后移至 $1\ 651.83\ \text{cm}^{-1}$,化学键振动频率减小,发生红移,强度减弱,说明玉米肽和钙整合后,C=O 的伸缩振动受到抑制,C=O 与钙离子之间存在某种化学作用^[17]。这种作用可能是羧酸和钙离子的配位整合所产生。酰胺 II 带($1\ 550\sim 1\ 460\ \text{cm}^{-1}$)由 N-H 的面内变形振动引起,玉米肽的红外光谱图中,N-H 的吸收峰由 $1\ 518.32\ \text{cm}^{-1}$ 移至 $1\ 556.28\ \text{cm}^{-1}$,N-H 提供了钙离子的配位点^[19]。COO⁻ 的伸缩振动在 $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 左右,玉米肽钙整合物前、后吸收峰从 $1\ 392.67\ \text{cm}^{-1}$ 红移至 $1\ 404.45\ \text{cm}^{-1}$,表明羧基与钙离子发生相互作用,形成 COO-Ca,在指纹区,吸收峰由 $1\ 036.65\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 243.46\ \text{cm}^{-1}$ 分别移至 $1\ 041.88\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 248.69\ \text{cm}^{-1}$,这可能是由 C-N,C-C 伸缩振动,N-H 弯曲振动共同引起的^[20-22]。 $1\ 000\sim 500\ \text{cm}^{-1}$ 中多个吸收峰发生改变,可能是由于 C-H 拉伸、N-H 弯曲耦合振动引起的^[23-24]。基于以上结果推测 Ca^{2+} 与玉米肽发生多点结合反应,可通过与羧基氧原子(-COO⁻)和氨基氮原子(-NH₂)的相互作用结合到玉米肽上,

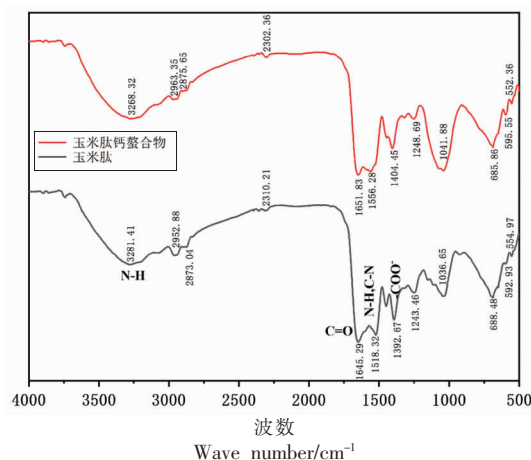


图 1 玉米肽和玉米肽钙整合物傅里叶红外光谱图
Fig.1 FTIR of corn peptides and corn peptide calcium chelate

也可与酰胺基上的氮原子相互结合。

2.2 核磁共振光谱分析

核磁共振是一种根据原子核自旋运动,能检测样本中具核磁矩核素的成分,将检测样本中含有的化合物相对含量呈现到谱图上,呈现的方式为吸收峰的信号强度,并能够测定检测样本的结构。其具有准确度高,操作简便,速度快等特点,且对待测样本不具有破坏性^[25-26]。如图 2 所示,在 $\delta = 0.7$ 和 $\delta = 0.9$ 间峰值减弱,可能是肽链中的游离氨基或是在周围和钙离子反应形成配位键所导致^[27]。 $\delta = 2.31$ 和 $\delta = 2.34$ 之间, $\delta = 3.34$ 和 $\delta = 2.48$ 之间峰值明显减弱,可能是钙离子玉米肽中的氨基反应,导致峰值发生改变。当玉米肽与钙离子整合后,不同位移处的 H 自旋偶合产生的裂解峰发生变化。这是由于钙与玉米肽上的羧基配位,影响不同位置上 H 的化学环境,H 核周围电子云密度发生变化。当 H 核周围电子云密度变大,受到电子屏蔽效应也随之变强,共振频率下降,化学位移便减小;反之当电子云密度变小时,化学位移增大。和玉米肽相比,玉米肽钙整合物从 $\delta = 2.5$ 开始所有的峰值减弱,可能是整合反应后,b-H 原子的信号也向较低值偏移,一部分信号峰消失。而且,玉米肽在 $\delta = 8.2$ 和 $\delta = 8.5$ 处出现的单峰是氨基上的 H 自旋裂解峰,当玉米肽和钙离子整合时,玉米肽上的氨基与钙离子配位,裂解峰也随之消失。

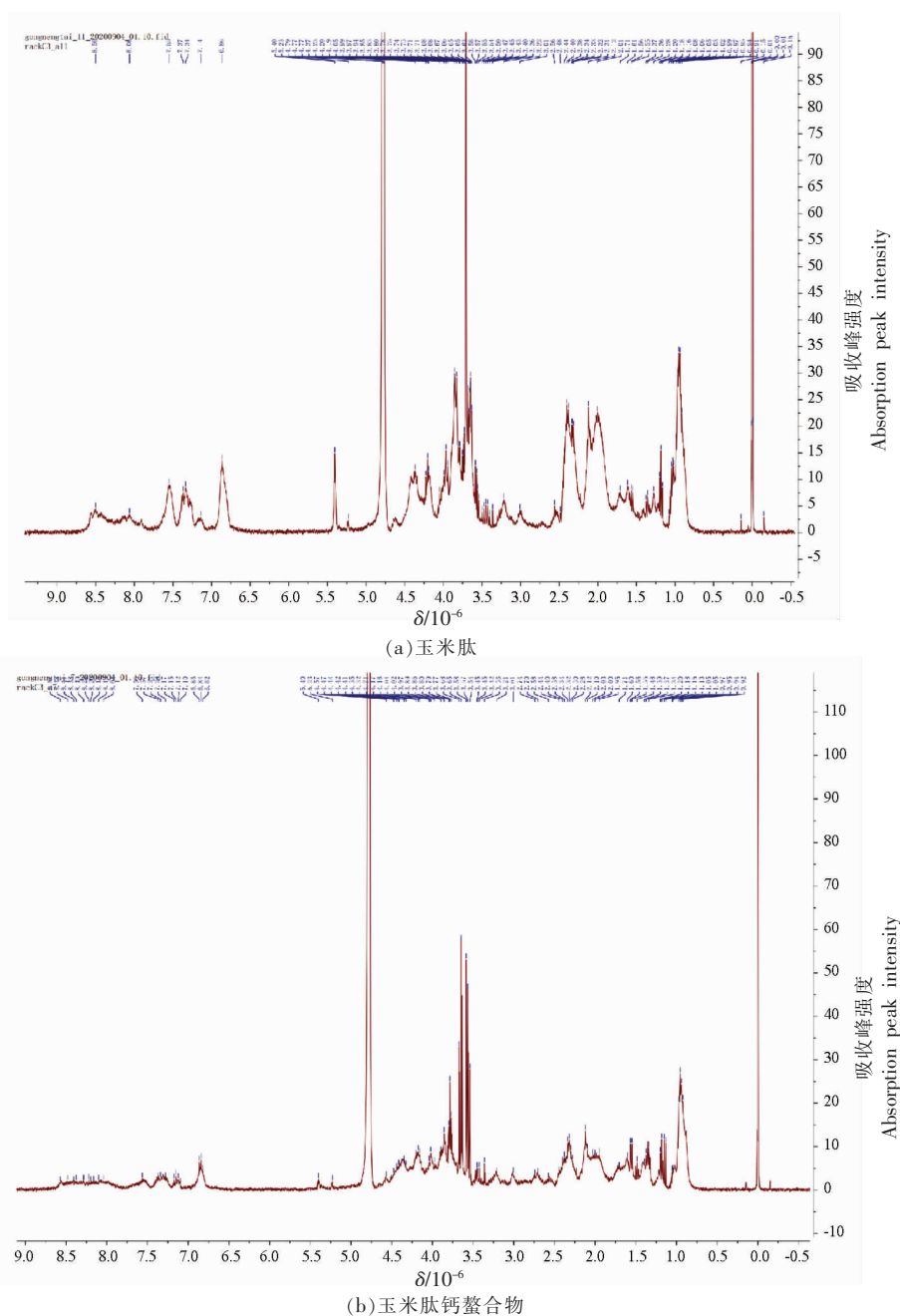


图2 玉米肽和玉米肽钙螯合物核磁共振图

Fig.2 NMR of corn peptides and corn peptide calcium chelate

2.3 TG 热重分析

TG 是指在一定的温度范围,目标物质在加热过程中质量随温度的变化,可以反映受热样本的稳定性,具有灵敏度高、结果精准和操作方便等优点^[28]。如图3所示,观察样品的热重曲线,可得两个样品的热降解均分为3个阶段:玉米肽螯合钙在50℃开始发生热降解,第1阶段为50~204.65℃,降解率为13.21%,可能包含一部分结合水和

小分子的挥发。第2阶段为204.65~455.40℃,为主要降解阶段,降解率为43.26%,可能是由于化学结构降解,比如糖环脱水、解聚以及水和二氧化碳的形成^[29]。第3阶段发生在455.60~900℃的高温区间,仅有4.93%的热降解,此阶段的损失可能是由于玉米肽钙螯合物碳化导致^[28],残留率为38.6%。玉米肽同样在50~175℃出现第1阶段热降解,降解率为10.66%,可能包含一部分结合水

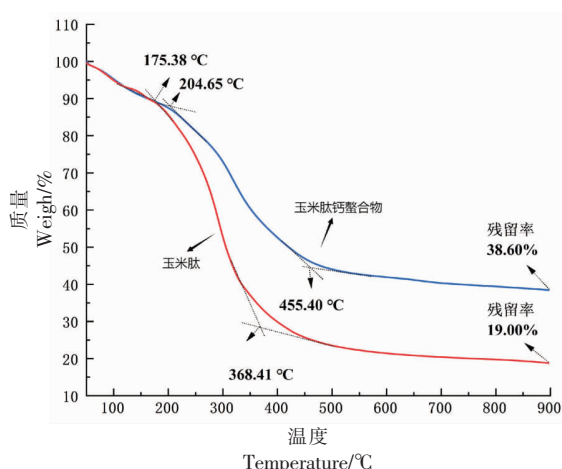


图 3 玉米肽和玉米肽钙整合物 TG 曲线图

Fig.3 TG curve of corn peptides and corn peptide calcium chelate

和小分子的挥发,此阶段降解速率与玉米肽钙整合物大致相同。第 2 阶段热降解为 175.38~368.41 °C,为主要热降解阶段,绝大多数组分在此阶段发生降解,降解率为 65.05%。该阶段降解速率与玉米肽整合钙相比明显加快,最终残留率较低,仅 19%。此结果与陈铭^[32]在扁舵鲮鱼蛋白肽整合钙的研究结果一致,肽的分解速率高于肽钙整合物,说明肽钙整合物相对于肽具有更强的热稳定性。表明玉米肽钙整合物的热稳定性比玉米肽显著增强,结构更加紧密,各化学键的键能增大,可能产生新的化学键,断裂需更多的能量和更高的温度,结构稳定,不易被破坏^[31]。玉米肽在较低温度时会发生热降解,且在主要热降解阶段降解量超过一半,残留量不及玉米肽钙整合物的一半。

表 1 玉米肽钙整合物的肽段序列

Table 1 Peptide sequences of corn peptide calcium chelate

氨基酸序列	分子量/u	疏水氨基酸
Asn-Ser-Ala-Ala-Tyr-Leu-Gln-Gln-Arg-Gln-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro-Leu (NSAAYLQQRQQLLNPL)	1 856.99565	3(ALP)
Ala-Tyr-Leu-Gln-Gln-Arg-Gln-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro-Leu (AYLQQRQQLLNPL)	1 584.88506	4(ALPF)
Se-rAsn-Se-rAla-Ala-Tyr-Leu-Gln-Gln-Arg-Gln-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro-Leu (SNSAAYLQQRQQLLNPL)	1 944.02971	3(ALP)
Ala-Ala-Tyr-Leu-Gln-Gln-Arg-Gln-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro-Leu(AAYLQQRQQLLNPL)	1 655.91838	4(ALPF)
Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala (SLINPVLSRQQPIVGGA)	1 748.99578	6(GAVLIP)
Asn-Gln-Phe-Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg(NQFSLINPVLSR)	1 387.77263	5(VLIPF)

注:疏水氨基酸:甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、甲硫氨酸(Met)。

2.4 质谱结构鉴定和分子对接模拟

蛋白质和多肽序列分析的传统方法,如埃德曼(Edman)降解法等需要更多的样品量,样品纯度要求高,并且耗时较长。近年来质谱技术在蛋白质和多肽领域得到广泛应用。本研究利用 Q-Ex-active 质谱仪对玉米肽钙整合物进行肽段序列分析,共鉴定出 6 条肽段,都是数量为 20 个氨基酸以下的短肽。其结构及相关信息如表 1 所示。有研究指出含疏水氨基酸越多,与钙离子的结合力越强。如 Liu 等^[33]通过对小麦胚芽蛋白水解物的钙结合能力及肽-钙复合物的鉴定,得出具有高钙结合能力的肽片段分子质量小于 2 000 u,钙结合肽主要是与疏水氨基酸含量有关。Liu 等^[34]发现大豆肽中的亲水氨基酸(E、D、S、R)和疏水氨基酸(L、I、G)在钙结合能力中起重要作用。本研究选择两条疏水氨基酸含量多的肽段与钙离子进行分子对接,模拟肽钙的结合位点。

分子对接技术是通过计算相互作用能、结合位点等方法来估算小分子配体与受体之间的结合模式。两条肽段 Asn-Gln-Phe-Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg (NQFSLINPVLSR)、Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala(SLINPVLSRQQPIVGGA)和钙离子的结合能分别为:-68.08,-67.56 kJ/mol, NQFSLINPVLSR 的结合能较强。因为肽链长短和空间结构都有所不同,空间位阻也不同,因此钙离子和肽链结合的位点也有差异,通常钙离子与氨基酸末端氨基和羧基更容易螯合^[32,35],而且氨基酸

序列的空间构象也会导致肽段和钙离子螯合活性不同。这与本研究结果一致。如图4所示,分子对接结果表明,为NQFSLINPVLSR-Ca的结合提供结合位点的是Gln2(谷氨酰胺)和Ser4(丝氨酸),分别位于Gln2(谷氨酰胺)的羧基氧原子和Ser4(丝氨酸)的氨基上,键长分别为3.32 Å和2.56 Å。SLINPVLSRQQPIVGGa-Ca的结合位点在Gln6(谷氨酰胺)的羧基氧原子上,键长为3.30 Å。

康云^[36]通过分子动力学模拟发现,谷氨酰胺的氨基以及谷氨酸和Asn4(天冬氨酸)的羧基均可能参与肽和铁锌等金属离子的螯合,从而形成稳定的折叠环状结构。Hou等^[37]通过对磷虾蛋白的水解物及钙肽的结合位点的研究发现,肽链中Gln残基的羧基参与和Ca²⁺的螯合,与氨基氮原子相比,Ca²⁺更容易和带负电荷的羧基结合,这与本研究结果一致。

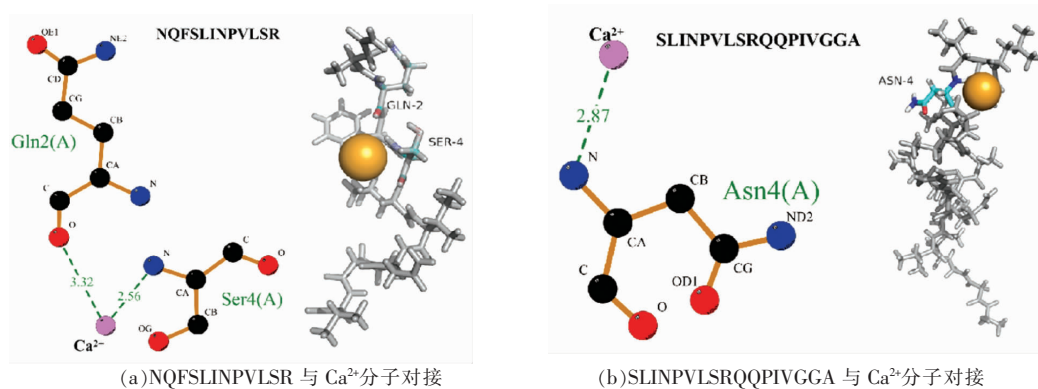


图4 肽段和Ca²⁺分子对接模拟图

Fig.4 Simulation of peptides and Ca²⁺ molecular docking

3 结论

本研究以玉米肽和氯化钙为原料制备玉米肽钙螯合物,通过傅里叶变换红外光谱、核磁共振光谱分析、TG热重分析和质谱分析对玉米肽钙螯合物的结构进行表征,并对质谱鉴定出的肽段进行肽段和钙离子结合位点的探究。FTIR分析表明玉米肽和钙离子螯合后,酰胺I带和酰胺II带红移,N-H键蓝移,COO⁻的伸缩振动于1400 cm⁻¹左右产生红移,推测玉米肽氨基酸残基上的羧基氧原子和氨基是螯合钙离子的主要位点,发生配位反应。核磁共振光谱分析显示,玉米肽钙螯合后吸收峰普遍减弱和消失,钙与玉米肽上的羧基配位,H核周围化学环境发生变化,导致电子云密度发生变化。电子云密度变大,共振频率便降低,化学位移便减小。当玉米肽和钙离子螯合时,氨基上的H自旋裂解峰,裂解峰也随之消失。TG热重分析显示,在第2阶段(主要降解阶段)玉米肽和玉米肽钙螯合物的降解率分别为65.05%和43.26%,玉米肽钙螯合物的热稳定性比玉米肽显著增强,

结构更加紧密,各化学键的键能增大,可能产生新的化学键,断裂需更多的能量和更高的温度,结构稳定,不易被破坏。玉米肽钙螯合后最终残留率也显著提高,由螯合前的19%提高到38.6%。质谱分析得出6条肽段,都是由20个以下氨基酸组成的短肽。研究表明,疏水性氨基酸含量与钙离子结合有关,选择两条疏水氨基酸较多的肽段和钙离子做分子对接,模拟结合位点。两条肽段NQFSLINPVLSR、SLINPVLSRQQPIVGGa和钙离子的结合能分别为-68.08,-67.56 kJ/mol,钙离子结合位点分别在Gln2(谷氨酰胺)的羧基氧原子和Ser4(丝氨酸)的氨基、Asn4(天冬氨酸)的氨基、Gln6(谷氨酰胺)的羧基氧原子。与FTIR结果一致,肽段和钙离子的结合位点主要在氨基酸残基上的羧基氧原子和氨基。以上结果均表明,玉米肽与钙通过螯合反应生成一种新物质——玉米肽钙螯合物,可作为一种新型补钙载体材料,这为食源性补钙剂的开发提供了一条新途径。

参 考 文 献

- [1] 丛万锁, 王晓杰. 玉米肽的生物学功能及产品开
发的研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(5): 82-88.
WAN W S, WANG X J. Research progress on the
biological functions and product development of corn
peptides[J]. Cereals & Oils, 2021, 46(5): 82-88.
- [2] LIANG Q, CHALAMAIAH M, REN X, et al. I-
dentification of new anti-inflammatory peptides from
zein hydrolysate after simulated gastrointestinal di-
gestion and transport in Caco-2 cells[J]. Journal of
Agricultural and Food Chemistry Chem, 2018, 66
(5): 1114-1120.
- [3] 闫昌誉, 李怡芳, 李晓敏, 等. 玉米肽的研究与应
用进展[J]. 今日药学, 2021, 31(5): 321-333, 338.
YAN C Y, LI Y F, LI X M, et al. Progress of
research and application of corn peptides[J]. Pharma-
cy Today, 2021, 31(5): 321-333, 338.
- [4] SUN S L, ZHANG G W, MU H Y, et al. The
mixture of corn and wheat peptide prevent diabetes
in NOD mice[J]. Journal of Functional Foods, 2019,
56: 163-170.
- [5] AN J L, ZHANG Y X, YING Z W, et al. The for-
mation, structural characteristics, absorption path-
ways and bioavailability of calcium-peptide chelates
[J]. Foods, 2022, 11(18): 2762.
- [6] KAMYAR K Z, LINDA W M. Functional nutrition,
naturopathic nutrition, and integrative and holistic
renal nutrition in kidney health and value-based
kidney care models[J]. Journal of Renal Nutrition,
2022, 32(5): 493-497.
- [7] 付文雯. 牛骨胶原多肽整合钙的制备及其结构表征
[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
FU W W. Preparation and structural characterization
of calcium chelate from bovine collagen peptides[D].
Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [8] BAO X L, LV Y, YANG B C, et al. A study of
the soluble complexes formed during calcium binding
by soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Food
Science, 2008, 73(3): C117-C121.
- [9] CHAROENPHUN N, CHEIRSILP B, SIRINUPONG
N, et al. Calcium-binding peptides derived from
tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate[J].
European Food Research and Technology, 2013,
236(1): 57-63.
- [10] RUI X U. Calcium binding of peptides derived from
enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate
[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010,
62(2): 170-173.
- [11] SUN N, CUI P B, LIN S Y, et al. Characterization
of Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) Ovum hy-
drolysates: Calcium chelation, solu-bility and ab-
sorption into intestinal epithelial cells[J]. Journal of
the Science of Food and Agriculture, 2017, 97
(13): 4604-4611.
- [12] ASHMEAD D W. Amino acid chelation in human an-
d animal nutrition [J]. Biology Chemistry, 2013, 236
(1): 57-63.
- [13] SUN X T, LI B, ZHOU G M, et al. Binding of the
maize cytosolic Hsp70 to calmodulin, and identifica-
tion of calmodulin-binding site in Hsp70[J]. Plant &
cell physiology, 2000, 41(6): 804-810.
- [14] 张新雪, 卢知浩, 刘家生, 等. 玉米低聚肽整合铁
(II) 的制备和结构表征[J]. 食品工业科技, 2023,
44(4): 243-251.
ZHANG X X, LU Z H, LIU J S, et al. Prepara-
tion and structural characterization of iron (II)
chelate from maize oligopeptides [J]. Food Industry
Science and Technology, 2023, 44(4): 243-251.
- [15] CUI P B, LIN S Y, HAN W W, et al. Calcium
delivery system assembled by a nanostructured pep-
tide derived from the sea cucumber ovum[J]. Journal
of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(44):
12283-12292.
- [16] 何金伦. 罗非鱼骨源高钙整合肽的制备及其成骨活
性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.
HE J L. Preparation of high calcium chelating pep-
tide of tilapia bone source and its osteogenic activity
[D]. Kunming: Kunming University of Technology,
2022.
- [17] 连红佳. 小球藻蛋白及其水解肽-钙整合物的制备与
功能特性的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
LIAN H J. Preparation and functional properties of
Chlorella protein and its hydrolyzed peptide-calcium
chelate[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [18] 关爽, 刘宇杭, 孙博, 等. 林蛙皮胶原多肽整合钙
的制备及表征[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 127-
133.
GUAN S, LIU Y H, SUN B, et al. Preparation and
characterization of calcium chelate from collagen

- polypeptide of forest frog skin[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(11): 127-133.
- [19] 张妹, 过世东. 氨基酸多肽螯合钙的制备及其工艺优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(4): 422-425.
- ZHANG M, GUO S D. Preparation of calcium amino acid peptide chelate and its process optimization[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2014, 33(4): 422-425.
- [20] YANG X, YU X J, YAGOUB A G, et al. Structure and stability of low molecular weight collagen peptide (prepared from white carp skin) -calcium complex[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 136: 110335.
- [21] GAN J, XIAO Z Q, WANG K T, et al. Isolation, characterization, and molecular docking analyses of novel calcium-chelating peptide from soy yogurt and the study of its calcium chelation mechanism [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 106(6): 2939-2948.
- [22] WARREN F J, GIDLEY M J, FLANAGAN B M. Infrared spectroscopy as a tool to characterize starch ordered structure—a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 139: 35-42.
- [23] MORITZ A. N-H Stretching frequencies of amines and amides[J]. *Nature*, 1962, 195: 800.
- [24] CHEN D, LIU Z Y, HUANG W Q, et al. Purification and characterization of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 5(2): 689-697.
- [25] 张利, 赵冉. 现代分析方法和技术在药物分析中的应用[J]. *化工设计通讯*, 2023, 49(2): 203-205.
- ZHANG L, ZHAO R. Application of modern analytical methods and techniques in pharmaceutical analysis[J]. *Chemical Design Letters*, 2023, 49(2): 203-205.
- [26] 李学章. 现代分析技术在药物分析中的研究与应用 [J]. *化工时刊*, 2020, 34(7): 27-29.
- LI X Z. Research and application of modern analytical techniques in drug analysis[J]. *Chemical Times*, 2020, 34(7): 27-29.
- [27] 冷雨佳. 大豆肽锌螯合物的制备、螯合机理及其生物活性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2022.
- LENG Y J. Preparation of soybean peptide zinc chelate, chelation mechanism and its bioactivity[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2022.
- [28] 谢启源, 陈丹丹, 丁延伟. 热重分析技术及其在高分子表征中的应用[J]. *高分子学报*, 2022, 53(2): 193-210.
- XIE Q Y, CHEN D D, DING Y W. Thermogravimetric analysis technique and its application to polymer characterization[J]. *Journal of Polymer Science*, 2022, 53(2): 193-210.
- [29] YILMAZ T, TAVMAN S. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from hazelnut skin[J]. *Food Science and Technology International*, 2016, 22(2): 112-121.
- [30] AKHTAR H M S, RIAZ A, HAMED Y S, et al. Production and characterization of CMC-based antioxidant and antimicrobial films enriched with chickpea hull polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(A): 469-477.
- [31] 黄顺丽, 赵立娜, 蔡茜茜, 等. 乳清蛋白钙螯合肽的分离及结构性质表征[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(11): 212-218.
- HUANG S L, ZHAO L N, CAI Q Q, et al. Isolation and structural properties characterization of calcium chelating peptides from whey proteins[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2015, 15(11): 212-218.
- [32] 陈铭. 扁舵鲹鱼蛋白肽螯合钙的制备及其对大鼠骨骼生长影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- CHEN M. Preparation of calcium chelate from peptide of flat helm skipjack tuna and its effect on bone growth in rats[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.
- [33] LIU F R, WANG L, WANG R, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide calcium complex [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(31): 7537-7544.
- [34] LIU H, LV Y, XU J T, et al. Soybean peptide aggregates improved calcium binding capacity [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 67: 174-180.
- [35] GUO H H, HONG Z A, YI R Z. Core-shell collagen peptide chelated calcium/calcium alginate nanoparticles from fish scales for calcium supplementation [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(7): N1595-N1601.

- [36] 康云. 米糠肽-铁锌螯合物的制备及消化吸收特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2022.
KANG Y. Preparation and digestion and absorption characteristics of rice bran peptide-FeZn chelate[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2022.
- [37] 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.

Structural Characterization and Chelation Mechanism of Corn Peptide Calcium Chelate

Wu Hanshuo^{1,2}, Ren Jie², Fu Shaowei², Zhang Xinxue², Feng Zhiyuan², Li Shuguo^{1*}, Liu Wenyong^{2*}
(¹College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050091
²Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015)

Abstract To investigate the structure characteristics of the corn peptide calcium chelate and the binding sites of peptides with calcium ions, corn peptide calcium chelate was prepared using corn peptides and calcium chloride as raw materials. The structures of corn peptide calcium chelate were characterized by Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), thermogravimetry analysis (TG), and mass spectrometry, and the binding sites of peptides and calcium ions were simulated by molecular docking technique. FTIR indicated that after the chelation of corn peptides with calcium ions, the amide I and amide II bands exhibited the red-shift and the N-H bond showed the blue-shift, and exhibited the red-shift at around 1400 cm^{-1} because of stretching vibration of COO^- . NMR showed that the absorption peak of corn peptide calcium chelate generally weakened and disappeared. The TG result showed that the degradation rates during the degradation stage were 43.26% and 65.05%, respectively, and the residual rate significantly increased from 19% to 38.6%. Seven peptide sequences were identified through mass spectrometry analysis. Two peptide segments with more hydrophobic amino acids were selected for molecular docking with calcium ions to simulate binding sites. The binding energies of Asn-Gln-Phe-Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg (NQFSLINPVLSR) and Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala (SLINPVLSRQQPIVGGA) with calcium ions were -68.08 kJ/mol and -67.56 kJ/mol , respectively. It is speculated that the carboxyl oxygen atom and the amino groups on the amino acid residues of peptides were the main binding sites for chelating calcium ions. The thermal stability of corn peptide calcium chelate was significantly enhanced compared to corn peptides.

Keywords corn peptides; calcium; chelation; structural characterization; molecular docking