

# 汉麻肽钙螯合物的制备及其结构表征和稳定性

龙芳

(长沙商贸旅游职业技术学院 湘菜学院,长沙 410116)

**摘要:**汉麻籽仁经脱脂、提取汉麻蛋白、酶法水解制备汉麻肽(HPIH),再与钙螯合制备汉麻肽钙螯合物(HPIH-Ca)。以钙螯合率为指标,采用单因素实验和正交实验优化 HPIH-Ca 制备工艺条件;运用红外光谱和圆二色谱分析 HPIH-Ca 的结构,利用扫描电镜表征 HPIH-Ca 微观结构,通过热处理、pH 和体外模拟消化评价 HPIH-Ca 的稳定性。结果表明:胰酶是最佳水解酶;HPIH-Ca 的最佳制备工艺条件为肽钙比 2:1(10 mg/mL HPIH 溶液与 0.05 mol/L 无水氯化钙溶液体积比)、pH 8.0、反应温度 60℃、反应时间 45 min,在最佳条件下钙螯合率为 47.61 mg/g;Ca<sup>2+</sup> 与汉麻肽主要通过羧基氧原子和氨基氮原子相互作用;Ca<sup>2+</sup> 与 HPIH 结合后形成了更为有序和紧凑的二级结构;HPIH 与 Ca<sup>2+</sup> 交联形成结构有序、紧密的呈片状或大颗粒的肽钙螯合物;HPIH-Ca 具有一定的耐热性,但在酸性条件下不稳定;体外模拟消化实验结果显示,HPIH-Ca 能保持 70% 以上的持钙率,具有较高的生物利用度。

**关键词:**汉麻肽;肽钙螯合物;结构表征;稳定性

中图分类号:TS201; TS218

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)09-0033-07

## Preparation of hemp peptide – calcium chelate and its structural characterization and stability properties

LONG Fang

(Department of Hunan Cuisine, Changsha Commerce and Tourism College, Changsha 410116, China)

**Abstract:** Hemp peptide(HPIH) was prepared by defatting, protein extraction and enzymatic hydrolysis of hemp seed kernel, then chelated with calcium to prepare hemp peptide – calcium chelate(HPIH – Ca), and the calcium chelation rate was used as the index to optimize preparation parameters by single factor experiment and orthogonal experiment. The structure of the chelate was analyzed by infrared spectroscopy and circular dichroism, and the microstructure of the chelate was characterized by scanning electron microscopy. The stability of the chelate was evaluated by heat treatment, pH and simulated digestion in vitro. The results showed that trypsin was the best hydrolase, and the optimal process parameters were obtained as follows: ratio of peptide to calcium 2:1 (volume ratio of 10 mg/mL HPIH solution to 0.05 mol/L anhydrous calcium chloride), pH 8.0, reaction temperature 60℃ and reaction time 45 min. Under these conditions, calcium chelation rate was 47.61 mg/g. The interaction between Ca<sup>2+</sup> and hemp peptide was mainly through carboxylic oxygen and amino nitrogen atoms. The Ca<sup>2+</sup> combined with HPIH to form a more ordered and compact secondary structure. HPIH was cross – linked with Ca<sup>2+</sup> to form a large granular and lamellar complex with orderly and tight structure. HPIH – Ca had certain heat resistance but was unstable under acidic conditions. Simulated digestion in vitro results showed that HPIH – Ca chelate could maintain calcium retention rate of more than 70% and had high bioavailability.

收稿日期:2020-10-29;修回日期:2021-05-31

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(18C1827)

作者简介:龙芳(1988),女,讲师,硕士,研究方向为天然产物绿色修饰及综合利用、食品检测技术(E-mail) longfang2013jie@163.com。

**Key words:** hemp peptide; peptide calcium chelate; structure characterization; stability

汉麻是四氢大麻酚含量低于 0.3% 的工业大

麻,含有 30% ~ 40% 的油脂和 25% ~ 30% 的蛋白质,是生产汉麻纤维和油脂的重要原料。汉麻蛋白主要由球蛋白和白蛋白组成,含量分别为 65% 和 35% 左右。汉麻蛋白含有 8 种必需氨基酸,具有较高的营养价值和易消化吸收特性,且致敏性低,一定程度上可以与大豆蛋白和蛋清蛋白相媲美,已经引起了学者的广泛关注<sup>[1-2]</sup>。目前,汉麻蛋白及其制品已在食品、医药和化妆品等领域有广泛应用<sup>[3]</sup>。

蛋白质在食品中的应用价值与其自身结构及功能密切相关。研究显示,汉麻蛋白因具有紧凑的蛋白质构象而导致其溶解度低,从而降低了其生物利用度,同时也限制了其在食品中应用的深度和广度<sup>[4]</sup>。因此,在应用汉麻蛋白时需对其进行一定程度的修饰。常用的蛋白质修饰方法主要有物理修饰、化学修饰和生物单一或复合修饰<sup>[5]</sup>。研究显示,一定程度的物理修饰和化学修饰能改变蛋白质亚基解离缔合行为而改变蛋白质空间构象,进而改善蛋白质的功能特性<sup>[6]</sup>。近年来,限制性酶解技术因能适度水解蛋白质提高蛋白质溶解度改善其功能特性,同时还能产生具有生物活性功能的多肽分子,被越来越多地应用于食品工业的蛋白质修饰过程中<sup>[7]</sup>,如研究显示酶解得到的汉麻肽具有抗氧化、抑制 ACE、降血脂、减弱氧化应激反应等功效<sup>[8]</sup>。此外,研究显示蛋白水解物易于结合金属离子进而提高金属离子的生物利用度,如大豆、玉米等植物蛋白肽与钙、锌等离子形成的螯合物能显著提高金属离子的生物利用度<sup>[9-10]</sup>。迄今为止,以汉麻肽为载体的金属螯合物的研究还很少,尚未有报道汉麻肽与钙结合提高钙生物利用度和增强汉麻蛋白营养价值的研究。钙是人体生长发育必不可少的微量元素,无机钙盐与有机钙盐相比,有机钙盐中钙含量更高且更易被人体吸收<sup>[11]</sup>。

本研究以汉麻籽仁为原料,经脱脂后提取汉麻分离蛋白,再用常用的 5 种蛋白酶和胰酶水解得到不同汉麻蛋白水解物,再与钙螯合制备汉麻肽钙螯合物。以钙螯合能力为指标,筛选出适宜的水解酶,并通过单因素实验和正交实验得到最佳肽钙螯合物制备工艺参数。在此基础上,研究汉麻肽钙螯合物的结构和稳定性,以期为开发汉麻蛋白产品和提高其营养价值提供技术支持和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

汉麻籽仁(蛋白质含量(30.83 ± 1.45)%、脂肪含量(51.16 ± 1.39)%),广西巴马;碱性蛋白酶(酶活力 166 824 U/g)、风味蛋白酶(酶活力

50 200 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 52 736 U/g),丹麦诺维信公司;胃蛋白酶(酶活力 78 060 U/g)、胰蛋白酶(酶活力 415 600 U/g)、胰酶(酶活力 4 000 U/g),江苏源盛通生物工程有限公司;无水氯化钙(纯度 99%),深圳盛海生物工程有限公司;浓硫酸、盐酸、氢氧化钠、硫酸钾、硼酸、硫酸铜、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等,均为分析纯。

BS224S 分析天平,赛多利斯科学有限公司;Spectrum Two 傅里叶变换近红外光谱仪,美国珀金埃尔默股份有限公司;ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机,德国 Christ 有限公司;S3400 扫描电镜(SEM),Hitachi 公司;Z326 离心机,德国贺默公司;AA7000 原子吸收分光光度计,日本岛津公司;Chirascan qCD 圆二色谱仪,英国应用光物理公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 汉麻分离蛋白的提取

在汉麻籽仁中按料液比 1:4 加入正己烷振荡脱脂 4 h,于 4 000 r/min 离心 15 min,沉淀在通风橱 40 °C 烘干得汉麻籽粕。称取一定量的汉麻籽粕,与去离子水按料液比 1:15 混合,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5,在 200 r/min、25 °C 下振荡提取 1 h,于 10 000 r/min 离心 20 min,上清液用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.7,静置 30 min 后,于 10 000 r/min 离心 20 min,得到汉麻籽蛋白凝乳,调节汉麻籽蛋白凝乳 pH 为 7.0,冷冻干燥得到汉麻分离蛋白(HPI),其蛋白质含量为(92.64 ± 2.05)%,脂肪含量为(1.14 ± 0.67)%,备用。

#### 1.2.2 汉麻分离蛋白水解物的制备

分别采用 5 种蛋白酶和胰酶按表 1 条件对 HPI 进行水解,反应结束后在 90 °C 水浴灭酶 10 min,然后用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 将酶解液 pH 调至 7.0。然后在 8 000 g 下离心 30 min,取上清液冻干得到汉麻分离蛋白水解物(HPIH),备用。

表 1 HPIH 制备条件

酶种类	HPI 质量 浓度/(mg/mL)	酶加量/ (U/g)	pH	温度/ °C	时间/ min
碱性蛋白酶	50	10 000	7.0	50	120
风味蛋白酶	50	10 000	7.0	50	120
木瓜蛋白酶	50	10 000	7.0	50	120
胃蛋白酶	50	10 000	2.0	37	120
胰蛋白酶	50	10 000	8.0	37	120
胰酶	50	10 000	7.0	37	120

#### 1.2.3 肽钙螯合物的制备

用 0.05 mol/L pH 7.2 的 Tris - HCl 配制 10 mg/mL HPIH 溶液,取 10 mL 加入 0.05 mol/L 无水

氯化钙溶液,调节体系 pH,在一定温度下水浴振荡反应一段时间后,在 8 000 g 下离心 30 min。取上清液用 3 倍体积无水乙醇冷沉,离心,沉淀用无水乙醇洗涤至上清液加入钙指示剂不变色,加入茛三酮指示剂加热后不变紫色,冷冻干燥得到汉麻肽钙螯合物(HPIH-Ca)。

参考文献[12]采用原子吸收分光光度法测定钙含量,按下式计算 Ca 螯合率。

$$A = \frac{C}{H} \quad (1)$$

式中:A 为 Ca 螯合率,mg/g;C 为 HPIH-Ca 中 Ca 的质量,mg;H 为 HPIH-Ca 中 HPIH 的质量,g。

#### 1.2.4 HPIH-Ca 的结构表征

##### 1.2.4.1 红外光谱测试

参考 Beck 等<sup>[13]</sup>的方法测定。精确称取 2 mg 样品,加入 200 mg KBr,研磨混合均匀,压片,置于恒温箱中平衡 5 min。红外光谱仪进行空气空白扫描,然后进行样品红外光谱扫描,测试参数:扫描波数 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次。

##### 1.2.4.2 圆二色谱测试

配制样品质量浓度为 0.2 mg/mL,以 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液为溶剂空白,采用 Chirascan qCD 圆二色谱仪获取样品远紫外区域圆二色谱,测试参数:波长范围 190~260 nm,光径 10 mm,扫描频率 90 nm/min,间隔时间 0.25 s,扫描次数 3 次。

##### 1.2.4.3 扫描电镜测试

取适量样品均匀粘在扫描电镜观察台上,用 Q150T ES 型粒子溅射镀膜仪给样品镀金,厚度约为 15 nm,采用 S3400 扫描电镜观测,观测参数:加速电压 5 kV,放大倍数 500 倍。

#### 1.2.5 HPIH-Ca 的稳定性测试

##### 1.2.5.1 热对 HPIH-Ca 稳定性的影响

将 HPIH-Ca 冻干粉用去离子水配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,分装于 8 个 50 mL 的离心管各 30 mL,分别在 20~90  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下加热 60 min;取出于冰水浴冷却至 20  $^{\circ}\text{C}$ ,离心,取上清液参考文献[12]测定钙含量,计算持钙率(见式(2))。

$$B = \left(1 - \frac{S_{\text{上清液}}}{T_{\text{总钙}}}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:B 为持钙率; $S_{\text{上清液}}$  为上清液游离钙质量,mg; $T_{\text{总钙}}$  为 HPIH-Ca 样品溶液中总钙质量,mg。

##### 1.2.5.2 pH 对 HPIH-Ca 稳定性的影响

取质量浓度为 5 mg/mL 的 HPIH-Ca 溶液,分装于 8 个 50 mL 的离心管各 30 mL,将 pH 分别调至 2~9,在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下放置 60 min;取出于冰水

浴冷却至 20  $^{\circ}\text{C}$ ,离心,取上清液参考文献[12]测定钙含量,计算持钙率。

##### 1.2.5.3 体外消化对 HPIH-Ca 稳定性的影响

取质量浓度为 5 mg/mL 的 HPIH-Ca 溶液,调节 pH 至 2.0,按体积比 20:1 加入质量分数为 2% 的胃蛋白酶溶液。在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下模拟胃消化,每隔 30 min 取样 1 mL 并加入 0.3 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止消化。胃模拟消化结束后,将溶液 pH 调至 7.0,按体积比 20:1 加入质量分数为 2% 的胰蛋白酶溶液,在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下模拟肠道消化,每隔 30 min 取样 1 mL 并加入 0.3 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止消化。消化样离心后取上清液参考文献[12]测定钙含量,计算持钙率。

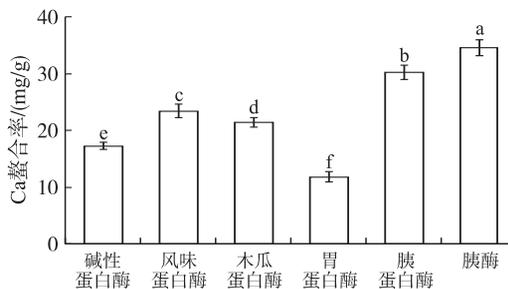
#### 1.2.6 数据分析

数据使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,实验结果用“ $\bar{X} \pm S$ ”表示,组间差异显著性采用  $t$  检验分析( $p < 0.05$ ),用 Origin 2017 软件绘图,每个指标至少做 3 次平行实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

按 1.2.2 制备不同 HPIH,在肽钙比(10 mg/mL HPIH 溶液与 0.05 mol/L 无水氯化钙溶液体积比,下同)1:1、pH 7.2、反应温度 40  $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 30 min 条件下,按 1.2.3 方法制备 HPIH-Ca,考察不同水解酶对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响,结果见图 1。



注:不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。下同

图 1 不同水解酶对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

从图 1 可知,在实验条件下,不同水解酶的 HPIH 的 Ca 螯合能力存在显著性差异( $p < 0.05$ )。其中胰酶的 HPIH 的 Ca 螯合能力最高,Ca 螯合率为 34.58 mg/g,其次是胰蛋白酶(30.22 mg/g),胃蛋白酶最小,HPIH 的 Ca 螯合率仅为 11.78 mg/g。不同水解酶的最适反应条件和专一性不同,不同的酶切位点产生氨基酸序列迥异的 C 末端和 N 末端多肽链,进而导致水解物与金属离子螯合能力的差异。因此,选择胰酶作为最佳水解酶。

## 2.2 肽钙螯合物制备的单因素实验

### 2.2.1 肽钙比对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

在反应温度 50 °C、pH 7.0、反应时间 90 min 条件下,研究肽钙比对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响,结果见图 2。

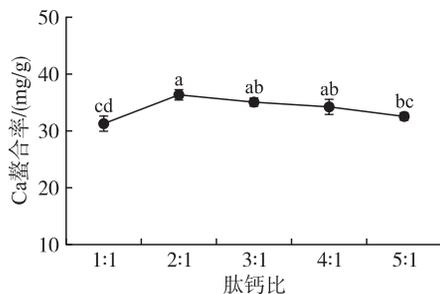


图 2 肽钙比对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

由图 2 可知,随着肽钙比增大,HPIH 的 Ca 螯合能力先增大后逐渐减小,在肽钙比为 2:1 时 HPIH 的 Ca 螯合率最大,为 36.39 mg/g。因此,选择肽钙比为 2:1。

### 2.2.2 pH 对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

在肽钙比 2:1、反应温度 50 °C、反应时间 90 min 条件下,研究 pH 对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响,结果见图 3。

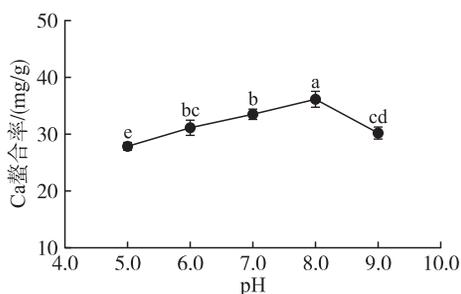


图 3 pH 对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

由图 3 可知,在 pH 5.0~9.0 范围内,HPIH 的 Ca 螯合能力先增大后减小,在 pH 为 8.0 时 Ca 螯合率最大,为 36.20 mg/g。原因可能是随着氢离子浓度的减少,氢离子与  $\text{Ca}^{2+}$  竞争供电子基团能力减弱,而  $\text{Ca}^{2+}$  与  $-\text{NH}_2$  和  $-\text{COOH}$  结合能力增强,但在强碱性环境中  $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{OH}^-$  形成  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  沉淀,降低了可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  与 HPIH 的可及性,因而导致 Ca 螯合率下降<sup>[12]</sup>。因此,选择 pH 为 8.0。

### 2.2.3 反应温度对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

在肽钙比 2:1、pH 8.0、反应时间 90 min 条件下,研究反应温度对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响,结果见图 4。

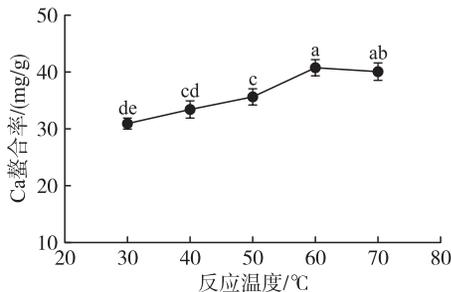


图 4 反应温度对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

由图 4 可知,随着反应温度的升高,HPIH 的 Ca 螯合能力先逐渐增加后降低,在 60 °C 时 Ca 螯合率最大,为 40.76 mg/g。原因可能是随着反应温度的升高,体系中分子运动加剧,肽、钙有效碰撞概率增加,因而 Ca 螯合率提高。而当反应温度过高时,HPIH 易自组装形成可溶性的纤维结构或无序聚集体而掩盖了与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的位点<sup>[14]</sup>,从而导致其 Ca 螯合能力降低。此外,肽钙螯合反应为放热反应,过高的温度不利于反应的正向进行。因此,选择反应温度为 60 °C。

### 2.2.4 反应时间对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

在肽钙比 2:1、pH 8.0、反应温度 60 °C 条件下,研究反应时间对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响,结果见图 5。

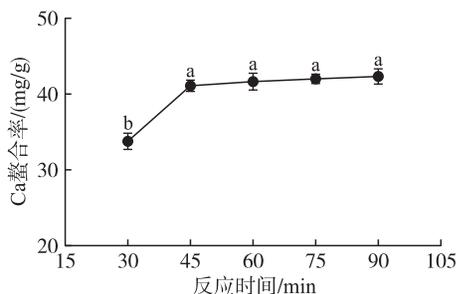


图 5 反应时间对 HPIH 的 Ca 螯合能力的影响

由图 5 可知,随着反应时间的延长,HPIH 的 Ca 螯合能力先增大后趋于稳定,在 45 min 后 Ca 螯合率无显著变化( $p > 0.05$ )。因此,选择反应时间为 45 min。

## 2.3 肽钙螯合物制备的正交实验

在单因素实验基础上,固定反应时间为 45 min,以肽钙比、pH、反应温度为因素,以 Ca 螯合率为指标,进行  $L_9(3^4)$  正交实验。正交实验因素水平见表 2,正交实验设计及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 正交实验因素水平

水平	A 肽钙比	B pH	C 反应温度/°C
1	1:1	6.0	50
2	2:1	7.0	60
3	3:1	8.0	70

表3 正交实验设计及结果

实验号	A	B	C	空列	Ca 螯合率/ (mg/g)
1	1	1	1	1	34.54
2	1	2	2	2	40.27
3	1	3	3	3	43.37
4	2	1	2	3	39.01
5	2	2	3	1	43.23
6	2	3	1	2	44.10
7	3	1	3	2	36.93
8	3	2	1	3	40.04
9	3	3	2	1	44.54
$k_1$	39.39	36.83	39.56	40.77	
$k_2$	42.11	41.18	41.27	40.43	
$k_3$	40.50	44.00	41.18	40.81	
R	2.72	7.17	1.71	0.38	

表4 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	显著性
A	11.22	2	44.19	显著
B	78.43	2	308.78	显著
C	5.56	2	21.88	显著
空列	0.25	2	1	
总误差	0.25	8		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由表3、表4可知,各因素对HPIH的Ca螯合能力影响大小为 $B > A > C$ ,即 $\text{pH} > \text{肽钙比} > \text{反应温度}$ ,最优组合为 $A_2B_3C_2$ ,即肽钙比为2:1, pH为8.0,反应温度为 $60^\circ\text{C}$ 。3次平行实验得到Ca螯合率为47.61 mg/g。

## 2.4 HPIH-Ca的结构表征

### 2.4.1 红外光谱分析

HPIH与HPIH-Ca的红外光谱图如图6所示。

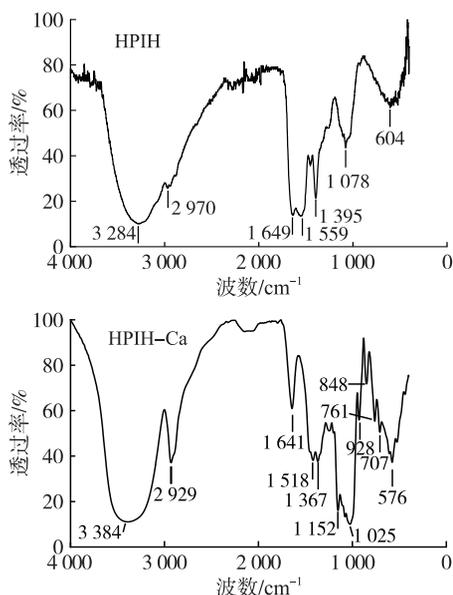


图6 HPIH与HPIH-Ca的红外光谱图

由图6可知,HPIH具有明显的酰胺I带( $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ )和酰胺II带( $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ )的结构特征,吸收峰分别在 $1649$ 、 $1559 \text{ cm}^{-1}$ ,主要由酰胺基团( $-\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ )中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动和 $\text{N}-\text{H}$ 的弯曲振动产生。 $3284 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰可能是由 $\text{O}-\text{H}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 的伸缩振动引起; $2970 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰主要是 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动产生; $1395 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰主要是 $\text{C}=\text{O}$ 反对称伸缩振动产生; $1078 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰主要是由 $\text{C}-\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{N}$ 的伸缩振动产生<sup>[15]</sup>。

当加入 $\text{Ca}^{2+}$ 后,酰胺I带和II带向低波长移动,分别移至 $1641$ 、 $1518 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}=\text{O}$ 反对称伸缩振动峰红移至 $1367 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{N}$ 的伸缩振动峰红移至 $1025 \text{ cm}^{-1}$ ,同时吸收强度下降;另外,由于 $\text{Ca}^{2+}$ 对HPIH的影响,在指纹区出现如 $928$ 、 $848 \text{ cm}^{-1}$ 等新的特征峰。推测HPIH与 $\text{Ca}^{2+}$ 的结合方式为 $\text{COO}-\text{Ca}$ 和 $\text{N}-\text{Ca}$ ,在 $\text{Ca}^{2+} \leftarrow -\text{COOH}/-\text{NH}$ 中, $-\text{COOH}/-\text{NH}$ 是给电子基团,导致 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 的键合常数减小,引起振动频率降低而发生红移<sup>[16]</sup>。Hou等<sup>[17]</sup>研究同样发现,在南极磷虾钙肽复合物中, $\text{Ca}^{2+}$ 与肽主要通过羧基氧和氨基氮原子相互作用。

### 2.4.2 圆二色谱分析

HPIH与HPIH-Ca的圆二色谱图如图7(a)所示,根据HPIH与HPIH-Ca的圆二色谱图分析其二级结构含量,结果如图7(b)所示。

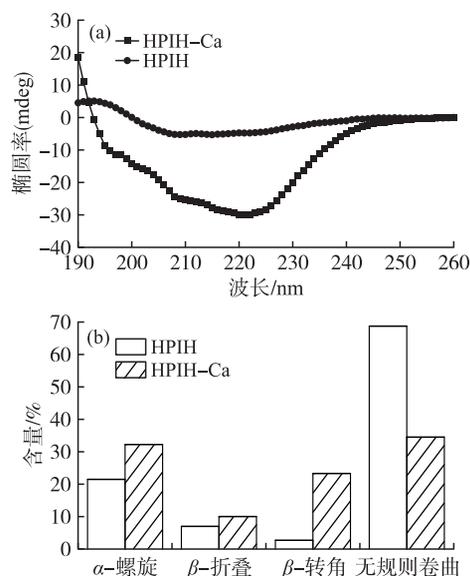


图7 HPIH与HPIH-Ca的圆二色谱图及二级结构含量

由图7可知,HPIH的 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲结构含量分别为21.5%、7.1%、2.7%和68.7%,表明HPI经水解形成的HPIH的二级结构以无规则卷曲为主。 $\text{Ca}^{2+}$ 加入后,显著改变了HPIH的圆二色谱图,208 nm处的凹槽峰红移至

222 nm,  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角含量分别增加到32.2%、10.0%和23.3%,而无规则卷曲含量降至34.5%。表明 $\text{Ca}^{2+}$ 与HPIH结合形成了二级结构更为紧凑的肽钙螯合物。同样,Zhang等<sup>[18]</sup>研究也发现,鳕鱼肽加入 $\text{Ca}^{2+}$ 后,其松散的二级结构变得规则、有序而紧密。

#### 2.4.3 扫描电镜分析

HPIH与HPIH-Ca的扫描电镜图如图8所示。

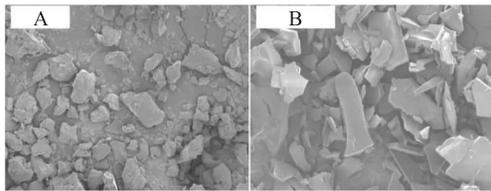
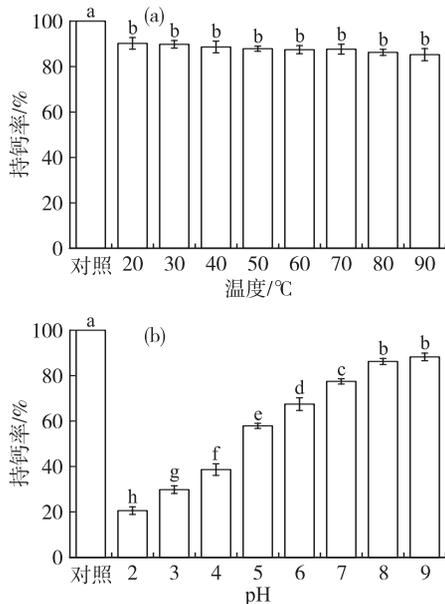


图8 HPIH(A)与HPIH-Ca(B)的扫描电镜图

由图8可知,HPIH多呈松散的小颗粒状,引进 $\text{Ca}^{2+}$ 后,由于 $\text{Ca}^{2+}$ 与 $-\text{COOH}/-\text{NH}$ 通过离子键和配位键相互作用,交联形成结构有序、紧密的呈片状或大颗粒的肽钙螯合物。丁媛媛等<sup>[19]</sup>在麦胚肽钙螯合物中也观测到类似的实验现象。

#### 2.5 HPIH-Ca的稳定性(见图9~图10)



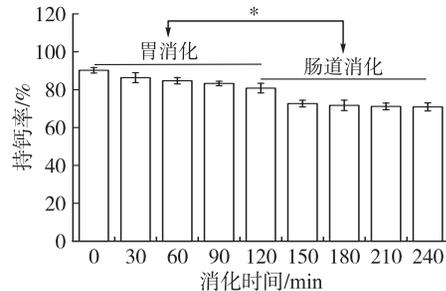
注:对照为未处理的5 mg/mL HPIH-Ca溶液。

图9 热(a)和pH(b)对HPIH-Ca稳定性的影响

由图9(a)可知,随着热处理温度的升高(20~90 $^{\circ}\text{C}$ ),持钙率逐渐下降,由90.23%降至85.26%,但持钙率均大于85%,且无显著性差异( $p > 0.05$ ),表明HPIH-Ca具有较好的热稳定性,这可能与 $\text{Ca}^{2+}$ 与HPIH通过离子键和配位键相互作用形成有序、紧密的结构有关。Wang等<sup>[20]</sup>在研究绵羊骨胶原肽钙螯合物中也得出类似的结果。

由图9(b)可知,随着pH的增大,持钙率呈现

逐渐增大的趋势,由20.56%增加至88.26%。酸性条件下持钙率较低,推测可能是在强酸条件下,高浓度的 $\text{H}^{+}$ 会与 $\text{Ca}^{2+}$ 同时与HPIH竞争活性结合位点,从而使HPIH-Ca解离出钙离子而导致持钙率下降。而在pH 9.0条件下,与pH 8.0相比持钙率没有下降,表明HPIH-Ca具有一定的耐碱性。



注:\*表示存在显著性差异( $p < 0.05$ )。

图10 体外模拟消化对HPIH-Ca稳定性的影响

由图10可知,在胃蛋白酶消化过程中(0~120 min),持钙率由90.24%降至80.82%,但持钙率仍大于80%,表明HPIH-Ca对胃蛋白酶敏感度较低,同时也存在氢离子的影响<sup>[21]</sup>。在加入胰蛋白酶后,与胃消化阶段相比(120 min),持钙率显著下降( $p < 0.05$ ),原因可能是在胃消化阶段,酸性环境改变了HPIH-Ca的结构,使得HPIH与 $\text{Ca}^{2+}$ 的结合能力减弱,此外胰蛋白酶的存在可能导致HPIH的降解,从而降低其钙螯合能力。但总的来说,消化后,持钙率仍在70%以上,表明HPIH-Ca在胃肠道环境中较稳定,能促进机体对钙的吸收,从而提高 $\text{Ca}^{2+}$ 的生物利用度。

### 3 结论

以汉麻籽仁为原料,脱脂后提取汉麻分离蛋白,再经酶水解后与氯化钙反应制备汉麻肽钙螯合物,以钙螯合率为指标,筛选出胰酶为最佳水解酶,通过单因素实验和正交实验得到最佳制备工艺条件为肽钙比2:1(10 mg/mL HPIH溶液与0.05 mol/L无水氯化钙溶液体积比)、pH 8.0、反应温度60 $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间45 min,在最佳条件下钙螯合率为47.61 mg/g。红外光谱结果显示, $\text{Ca}^{2+}$ 与汉麻肽主要通过羧基氧和氨基氮原子相互作用。圆二色谱分析结果显示, $\text{Ca}^{2+}$ 与HPIH结合后形成了更为有序和紧凑的二级结构。扫描电镜分析显示,HPIH与 $\text{Ca}^{2+}$ 交联形成结构有序、紧密的呈片状或大颗粒的肽钙螯合物。稳定性分析结果显示,HPIH-Ca具有一定的耐热性,但在酸性条件下不稳定;体外模拟消化显示HPIH-Ca螯合物能保持70%以上的持钙率,具有较高的生物利用度。

## 参考文献:

- [1] WANG Q, XIONG Y L. Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: a review [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2019, 18(4): 936–952.
- [2] 孟妍, 曾剑华, 王尚杰, 等. 汉麻籽蛋白研究进展 [J]. *食品工业*, 2020, 41(1): 268–273.
- [3] LEONARD W, ZHANG P, YING D, et al. Hempseed in food industry: nutritional value, health benefits, and industrial applications [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2020, 19(1): 282–308.
- [4] MALOMO S A, HE R, ALUKO R E. Structural and functional properties of hemp seed protein products [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(8): 1512–1521.
- [5] CHEN L, CHEN J, REN J, et al. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties [J]. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25(5): 887–897.
- [6] 曾剑华, 杨杨, 刘琳琳, 等. 热处理过程中大豆 11S 球蛋白解离缔合行为研究进展 [J]. *食品科学*, 2019, 40(11): 303–312.
- [7] NADAR S S, RATHOD V K. Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review [J/OL]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(9): 170[2020-10-20]. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2322-6>.
- [8] ALUKO R E. Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins: composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties [M]//Sustainable protein sources. Manhattan, NY: Academic Press, 2017: 121–132.
- [9] SUN N, WU H, DU M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: a review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 58: 140–148.
- [10] UDECHUKWU M C, COLLINS S A, UDENIGWE C C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides [J]. *Food Funct*, 2016, 7(10): 4137–4144.
- [11] 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.
- [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 Chem*, 2019, 284: 80–89.
- [13] BECK S M, KNOERZER K, ARCOT J. Effect of low moisture extrusion on a pea protein isolate's expansion, solubility, molecular weight distribution and secondary structure as determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [J]. *J Food Eng*, 2017, 214: 166–174.
- [14] 卫海琴, 阮丽萍. 温度对设计肽稳定性及自组装性能的影响 [J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(1): 42–46.
- [15] HE Q, SUN X, HE S, et al. Pegylation of black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with potential functional properties [J]. *Colloids Surfaces B Biointerf*, 2018, 164: 89–97.
- [16] LIU F R, WANG L, WANG R, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(31): 7537–7544.
- [17] 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 Chem*, 2018, 243: 389–395.
- [18] ZHANG K, LI J, 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]. *J Funct Foods*, 2019, 52: 670–679.
- [19] 丁媛媛, 王莉, 张新霞, 等. 麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征 [J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 215–221.
- [20] WANG X, ZHANG Z, XU H, et al. Preparation of sheep bone collagen peptide-calcium chelate using enzymolysis-fermentation methodology and its structural characterization and stability analysis [J]. *RSC Adv*, 2020, 10: 11624–11633.
- [21] WU J, DING X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. *Food Res Int*, 2002, 35(4): 367–375.