

# 钙结合卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备及其肽钙螯合物的结构表征

宋 丽, 朱临娴, 宋璐杉, 司 凯, 巩婷婷, 刘会平, 张晓维\*

(天津科技大学食品科学与工程学院, 食品营养与安全国家重点实验室, 天津市食品质量与健康重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 以鸡蛋蛋黄为原料制备卵黄高磷蛋白磷酸肽 (phosvitin phosphopeptide, PPP), 并与钙离子螯合制备肽钙补充剂。通过高温高压处理卵黄高磷蛋白, 先用胰蛋白酶酶解, 以水解度和肽钙结合率为指标, 进一步优化碱性蛋白酶的酶解条件以制备PPP。PPP与钙螯合获得螯合物PPP-Ca, 通过紫外光谱、红外光谱分析、圆二色谱分析、扫描电镜和Zeta电位分析表征PPP-Ca的结构特性。结果表明最佳酶解条件为加酶量5%、酶解90 min、pH 9.0、温度40 °C, 在此最优条件下水解度为(25.45±0.17)%, 肽钙结合率为(93.41±1.10)%。结构表征发现PPP-Ca主要通过羧基、氨基和磷酸基团相互作用结合, PPP和钙离子结合后其结构变得紧密有序, 且有聚集现象。

**关键词:** 卵黄高磷蛋白磷酸肽; 肽钙螯合物; 复合酶酶解; 结构表征

## Preparation of Calcium-Binding Phosvitin Phosphopeptide and Structural Characterization of Its Calcium Chelate

SONG Li, ZHU Linxian, SONG Lushan, SI Kai, GONG Tingting, LIU Huiping, ZHANG Xiaowei\*

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin Key Laboratory of Food Quality and Health,

College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To prepare a calcium-binding peptide as calcium supplement, phosvitin phosphopeptide (PPP) was prepared from egg yolk and chelated with calcium ions. Phosvitin (PV) was treated at high temperature and high pressure, and then sequentially hydrolyzed with trypsin and alkaline protease. Based on hydrolysis degree and calcium binding efficiency of peptide, the hydrolysis conditions of alkaline protease were optimized. Phosvitin phosphopeptide-calcium chelate (PPP-Ca) was characterized by ultraviolet (UV) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and zeta potential analysis. The results revealed that the optimal hydrolysis conditions were as follows: enzyme dosage 5%, hydrolysis time 90 min, pH 9.0 and 40 °C. Under these conditions, the degree of hydrolysis was (25.45 ± 0.17)% and the calcium binding efficiency of peptide was (93.41 ± 1.10)%. The structural characterization showed that Ca bound to PPP mainly through interactions between carboxyl, amino and phosphate groups, and the structure of PPP-Ca was tightly ordered and had aggregation phenomenon.

**Keywords:** phosvitin phosphopeptide; peptide-calcium chelate; sequential enzymatic hydrolysis; structural characterization

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220414-167

中图分类号: TS253.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 06-0125-09

引文格式:

宋丽, 朱临娴, 宋璐杉, 等. 钙结合卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备及其肽钙螯合物的结构表征[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 125-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220414-167. <http://www.spkx.net.cn>

SONG Li, ZHU Linxian, SONG Lushan, et al. Preparation of calcium-binding phosvitin phosphopeptide and structural characterization of its calcium chelate[J]. Food Science, 2023, 44(6): 125-133. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220414-167. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-04-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31801568); 天津市科技局项目 (21YDTPJC00060; 18JCQNJC79300); 天津市教委项目 (2019KJ204)

第一作者简介: 宋丽 (1996—) (ORCID: 0000-0002-7210-0487), 女, 硕士, 研究方向为动物资源开发与功能食品。

E-mail: songli20200505@163.com

\*通信作者简介: 张晓维 (1985—) (ORCID: 0000-0003-3015-6092), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为动物资源开发与功能食品。E-mail: zhangxw@tust.edu.cn

钙作为人类体内一种必需矿物质成分,其参与人体代谢、骨骼生长和酶调节等多种生理过程,钙摄入不足会导致机体不良反应,严重时可导致某些疾病产生,如骨质疏松、高血压和某些癌症等疾病<sup>[1]</sup>。目前,为缓解缺钙引发的健康问题,大量钙补充剂应运而生,其主要是以碳酸钙、葡萄糖酸钙及乳酸钙等为代表的离子钙,虽然其钙含量满足了人体所需量,但钙离子经过小肠时容易产生磷酸钙沉淀,使得生物利用率大大降低<sup>[2]</sup>。有研究证实<sup>[3]</sup>,生物活性肽能与钙离子结合,形成较为稳定的肽钙螯合物,可被肠道整体吸收,具有高吸收率和高利用率<sup>[4-5]</sup>等特点。因此,高利用率的肽钙螯合物,成为钙补充剂市场上的必然趋势。

我国是鸡蛋产量大国,其中卵黄高磷蛋白(phosvitin, PV)是鸡蛋蛋黄中的一种高度磷酸化的糖蛋白<sup>[6]</sup>,富含磷酸化丝氨酸残基<sup>[7]</sup>,形成了极性的酸性结构域<sup>[8]</sup>,有利于螯合Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>等金属离子,进而抑制不溶性金属磷酸盐的形成<sup>[9]</sup>,使金属离子维持高度溶解状态,从而提高生物利用率。PV是生物活性肽的极好来源,其酶解物可制备高利用率的肽钙螯合物。早期研究表明含有磷酸化氨基酸残基的蛋白质对蛋白酶活性具有拮抗作用<sup>[10]</sup>,PV中的磷酸基团带负电荷从而吸引水分子包围PV<sup>[11]</sup>,抑制了酶接近PV分子的肽键,使其不易被蛋白酶所水解,水解度(degree of hydrolysis, DH)相比于无磷蛋白大大降低。若将PV在酶解前进行预处理,除去部分磷酸基团<sup>[12]</sup>或打开其结构,以帮助酶接近其酶解位点,从而提高酶解效率。常用去磷酸化的方法有加碱和磷酸酶处理,这些方法在去磷酸化时会导致PV大部分磷酸基团丢失,进而在一定程度上减弱PV酶解物结合金属离子的能力。因此,需要严格控制PV去磷酸化的程度;且磷酸酶处理后的PV经蛋白酶酶解后得到的肽段分子质量较大<sup>[13]</sup>。常压热处理(100℃, 60 min)通过打开PV的紧凑结构,从而有利于蛋白酶作用其分子内部的肽键,但其效果远不如部分去磷酸化方法<sup>[14]</sup>。Itoh等<sup>[15]</sup>证实PV耐热性强,其经140℃处理后可打开蛋白结构;且高温高压处理(121℃, 0.15 MPa, 60 min)有助于破坏PV的核心部分并显著改善其酶水解<sup>[16]</sup>,提高DH。因此,本研究首先对PV进行高温高压处理(121℃, 0.1 MPa, 15 min),打开其内部结构有助于酶解。PV的氨基酸序列显示其多聚磷酸化丝氨酸核心区域被赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和天冬氨酸(Asp)不规则的打断<sup>[17]</sup>。胰蛋白酶和碱性蛋白酶都是丝氨酸酶,胰蛋白酶主要裂解Lys和Arg的羧基,因此采用胰蛋白酶酶解可以达到解离PV的效果。有研究表明胰蛋白酶酶解得到的肽段含磷酸基团较高,但不足的是其小肽得率低<sup>[14]</sup>。PV序列的N端和C端分别有9个和3个疏水性氨基酸残基,形成两端疏水中间亲水的两亲性结构<sup>[17]</sup>,而碱性蛋白酶主要裂解

疏水性氨基酸的羧基,因此,可在胰蛋白酶酶解基础上再利用碱性蛋白酶做二次水解,进一步提高酶解效率,增加小肽的产率。本研究通过正交试验法优化双酶酶解制备卵黄高磷蛋白磷酸肽(phosvitin phosphopeptide, PPP),再制备得到螯合物PPP-Ca,并采用紫外吸收光谱、红外吸收光谱和圆二色谱分析等对其结合特性进行分析。该研究可改善PV DH值低的问题,增加小分子多肽的产率,对PPP作为促钙吸收剂的功能因子应用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡蛋采购于天津市滨海新区明耀超市;胰蛋白酶(>250 U/mg)、碱性蛋白酶(>200 000 U/g)、无水氯化钙(99.8%)、氯化钠、聚乙二醇6000、酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPP)、邻苯二甲醛、1,4-二巯基苏糖醇(纯度99%)、无水乙醇、磷酸二氢钠及磷酸氢二钠等所用试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DF-101S磁力搅拌器 杭州旌斐仪器科技有限公司;FE20 pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;H1850R台式高速冷冻离心机 长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司;Kjeltec 8400全自动凯氏定氮仪 丹麦FOSS公司;UV-1500紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;Synergy HTX酶标仪 美国伯腾公司;IS50傅里叶变换红外光谱仪 美国尼高利公司;SU1510扫描电子显微镜 日本日立公司;New MOS-450圆二色谱仪 法国Biologic公司;90 PLUS/BI激光粒度仪 美国布鲁克公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PV的制备

参照张晓维<sup>[17]</sup>的方法,采用聚乙二醇沉淀法提取PV。从鸡蛋中分离得到蛋黄,加入等质量去离子水在4℃搅拌1 h,随后4℃、10 000×g离心10 min。保留沉淀,并加入与其等质量0.17 mol/L NaCl溶液,搅拌和离心的条件同上,离心得到黄色沉淀,再按1:10(g/mL)加入1.74 mol/L NaCl溶液搅拌至沉淀溶解完全,调pH 4.0,搅拌和离心条件同上,离心得到上清液,用去离子水透析4 d,最后冻干即得PV。

#### 1.3.2 蛋白质含量测定

参考GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》,取适量PV进行消解,采用全自动凯氏定氮仪测定其含氮量,蛋白质质量分数按式(1)计算:

$$P\% = m_1 \times F \times 100 \quad (1)$$

式中： $P$ 为样品中蛋白质质量分数/%； $m_1$ 为PV中含氮量/(mg/g)； $F$ 为氮与蛋白质转换系数(6.25)。

### 1.3.3 PPP的制备

#### 1.3.3.1 酶解前预处理

参照Huang Xi等<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改，称取适量的PV溶解于超纯水中制备10 mg/mL底物溶液，调pH 6.5，在121 °C、0.1 MPa处理15 min，此预处理为高温高压组。沿用本实验室方法，称取适量的PV溶解于0.1 mol/L NaOH溶液中制备10 mg/mL底物溶液，37 °C恒温磁力搅拌孵育3 h，将PV进行部分脱磷酸化处理，此预处理为碱处理组。10 mg/mL底物溶液不作任何处理，定义为未处理组。

#### 1.3.3.2 胰蛋白酶酶解

沿用本实验室方法并稍作调整<sup>[18]</sup>，取适量经过预处理的PV溶液，调pH 8.0，加入胰蛋白酶（酶与底物质量比1:50），置于摇床中50 °C酶解反应4 h。酶解完成后，95 °C灭酶10 min。

#### 1.3.3.3 碱性蛋白酶酶解优化

待高温灭酶后的胰蛋白酶酶解物冷却至室温，调至适宜的pH值，加入适量碱性蛋白酶进行二次酶解<sup>[19]</sup>，待酶解结束后95 °C灭酶10 min，随后4 °C、10 000×g离心15 min，上清液过0.45 μm微滤膜后冻干，得到PPP。

单因素试验：考虑到酶解pH值、加酶量、酶解温度和时间对酶解效果均有一定影响，因此，以DH及钙结合率为指标，对上述进行单因素试验。以底物质量分数1%、加酶量5%、酶解时间90 min、酶解温度40 °C、pH 9为固定酶解条件<sup>[20]</sup>，考察单因素条件对酶解效果的影响：加酶量为1%、3%、5%、7%和9%；酶解时间<sup>[21]</sup>为30、60、90、120 min和150 min；酶解温度20、30、40、50 °C和60 °C；pH 7、8、9、10和11<sup>[22]</sup>。

正交试验优化：基于单因素试验结果分析，选用pH值、加酶量、反应温度为自变量，以DH及钙结合率为考察指标，研究碱性蛋白酶酶解的优化工艺，设计3因素3水平正交试验见表1。

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Levels of each variable used in orthogonal array design

水平	因素		
	A pH	B 反应温度/°C	C 加酶量/%
1	8	30	3
2	9	40	5
3	10	50	7

### 1.3.4 DH测定

参照邻苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA)法<sup>[23]</sup>。准确配制0.1 mg/mL丝氨酸标准液，配制0、0.025、0.05、0.075、0.1 mg/mL的标准溶液。各取400 μL梯度标准液加入3 mL OPA试剂充分混匀5 s，计时反应2 min，

于340 nm波长处测定吸光度，得到丝氨酸标准曲线( $y=0.7987x+0.2467$ ,  $R^2=0.9999$ )。将酶解液样品稀释至标准曲线内浓度测定吸光度，根据标准曲线计算得到单位蛋白含有的丝氨酸游离氨基浓度 $C_{\text{serin-NH}_2}$  (mmol/L)。根据下式<sup>[24]</sup>计算样品DH：

$$W/(\text{mmol/g}) = C_{\text{serin-NH}_2} \times \frac{V \times N}{X \times P} \quad (2)$$

$$h/(\text{mmol/g}) = \frac{W_{\text{serin-NH}_2} - \beta}{\alpha} \quad (3)$$

$$\text{DH}/\% = \frac{h}{W_{\text{serin-NH}_2}} \times 100 \quad (4)$$

式中： $W_{\text{serin-NH}_2}$ 为每克蛋白质中含有丝氨酸游离氨基的量/(mmol/g)； $X$ 为样品质量/g； $P$ 为PV中蛋白质质量分数/(测定值(8.50±2.50)% )； $V$ 为酶解液样品体积/L； $N$ 为酶解液样品稀释倍数； $h$ 为水解每克PV被断裂的肽键数/(mmol/g) ( $\alpha=1$ ,  $\beta=0.4$ )。

### 1.3.5 钙结合率的测定

采用邻甲酚酞比色法<sup>[25]</sup>。使用钙含量检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)，按其要求配制钙标准品，在96孔板每孔加入50 μL钙标准样品，再加150 μL显色液，摇匀孵育6 min后于575 nm波长处测吸光度，制得标准曲线( $y=0.1918x+0.3048$ ,  $R^2=0.9951$ )。测定样品时，将5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>溶液和0.2 mol/L pH 7.0磷酸钠缓冲液以体积比1:2充分混合<sup>[26-27]</sup>。然后加入500 μL的1 mg/mL PPP溶液在40 °C反应50 min，9 000×g、4 °C离心15 min，收集上清液，同上步骤测定上清液中的钙含量。钙结合率( $w_1$ )按式(5)进行计算：

$$w_1/\% = \frac{M_1}{M_0} \times 100 \quad (5)$$

式中： $M_1$ 为上清液中钙含量/μg； $M_0$ 为总钙添加量/μg。

### 1.3.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法确定酶解物的分子量

SDS-PAGE胶采用12%、18%<sup>[28]</sup>(添加尿素)的分离胶和5%的浓缩胶。12%分离胶：将提取PV制备成1 mg/mL的溶液，吸取20 μL溶液后加入80 μL上样缓冲液，混匀置于沸水浴中煮沸10 min，取出冷却至室温后，10 000×g离心3 min，取15 μL上清液上样，预染色蛋白质Marker分子量范围选用10~180 kDa。18%分离胶：将处理PV(高温高压处理蛋白)、多肽1(单酶酶解)和多肽2(双酶酶解)使用30 kDa超滤管进行超滤去除大分子蛋白，再用6 000~8 000 Da透析袋进行透析除盐，最后冻干。再将冻干后的样品分别制备成10、60、60 mg/mL的溶液，处理PV(高温高压处理蛋白)上样量5 μL，多肽上样量10 μL，预染色蛋白质Marker分子量范围选用5~245 kDa。浓缩胶电压为80 V，分离胶电压

为120 V。电泳结束后,染色参照Cutting等<sup>[29]</sup>染色方法并调整。凝胶在固定液中固定40 min,然后在45 °C染色液1中染色40 min;随即放入染色液2中染色40 min,最后在7%乙酸脱色液中脱色至条带清晰。

### 1.3.7 PPP-Ca的制备

PPP用0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)配制为5 mg/mL溶液<sup>[18]</sup>,按肽钙质量比为5:1的比例加入50 mmol/L的CaCl<sub>2</sub>进行混合,40 °C搅拌反应50 min。反应结束加入9倍体积无水乙醇,摇匀后静置1 h,13 000×g离心30 min,用无水乙醇洗涤沉淀两次,用超纯水复溶后冻干,得到PPP-Ca。

### 1.3.8 PPP-Ca的结构表征

#### 1.3.8.1 紫外-可见吸收光谱

参照Fang Shunxiang等<sup>[30]</sup>方法稍作修改,PPP和PPP-Ca分别用超纯水配制为1 mg/mL,紫外扫描波长范围为200~400 nm。

#### 1.3.8.2 红外吸收光谱

分别取1 mg的PPP和PPP-Ca样品,加入160 mg干燥KBr研磨均匀,压片成透明样品,采用红外吸收光谱设备以分辨率为4.0 cm<sup>-1</sup>在400~4 000 cm<sup>-1</sup>扫描16次<sup>[31]</sup>,每次扫描前需扣除KBr背景。

#### 1.3.8.3 圆二色谱

PPP和PPP-Ca分别溶解于超纯水中,质量浓度为1 mg/mL。收集远紫外区(190~260 nm)的圆二色谱,比色池光径为0.1 cm,扫描速率为200 nm/min,超纯水作空白校正,测定3次取均值<sup>[18]</sup>。PPP和PPP-Ca的二级结构组成使用杨氏算法计算。

#### 1.3.8.4 扫描电镜

沿用本实验室方法<sup>[18]</sup>,取适量PPP和PPP-Ca样品均匀涂在附有导电胶的载物台上喷金,随后在电压10 kV、束流6.9×10<sup>-2</sup> mA以及工作距离6.7 mm条件下进行观察,采集放大倍数1 000倍的图片。

#### 1.3.8.5 Zeta电位分析

参考王俊强<sup>[32]</sup>的方法进行适当修改,PPP、PPP-Ca、CPP和酪蛋白磷酸肽钙螯合物(CPP-Ca,制备方法同PPP-Ca)用超纯水配成1 mg/mL溶液,进行Zeta电位的测定。

### 1.4 数据分析

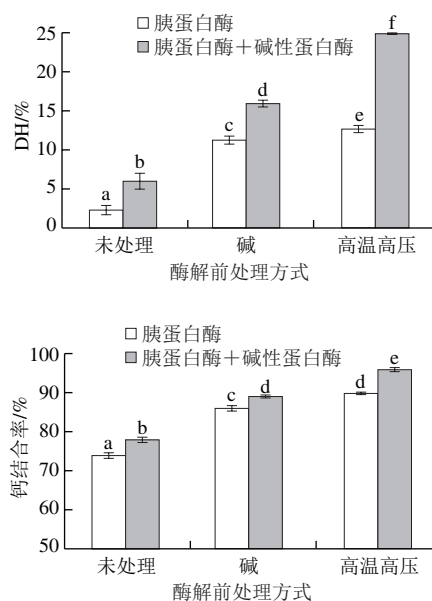
所有测定重复3次,所有实验结果均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用SPSS 13.0分析数据, $P < 0.05$ ,差异显著,采用Origin 2018软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解前预处理方式对PPP制备的影响

以DH和钙结合率为指标,考察酶解前处理方式对

PPP制备的影响,图1显示,在单一胰蛋白酶、胰蛋白酶和碱性蛋白酶双酶水解时,DH和钙结合率效果均依次为高温高压组>碱处理组>未处理组,表明无论是单一酶酶解还是双酶酶解,高温高压处理均有助于PV进一步被水解,且在双酶酶解中影响最大,得到更多的小分子肽,进而增加肽钙结合的机率。在高温高压处理组中单酶处理的DH达到(12.65±0.48)%,高于已有的研究(10.25%)<sup>[33]</sup>;双酶处理的DH高达(24.82±0.66)%,相比Huang Xi等<sup>[16]</sup>报道的结果(19.04±0.55)%较高,这说明高温高压处理可以在一定程度上打开PV内部多聚磷酸化丝氨酸区域和肽键的随机断裂,使得胰蛋白酶和碱性蛋白酶作用位点暴露,降低了磷酸基团对蛋白酶的拮抗作用,提升了酶解效率。单酶和双酶处理的钙结合率分别达到(89.88±0.36)%和(95.88±0.51)%,其变化趋势与DH呈正相关。这可能是因为高温高压处理后的PV在经胰蛋白酶和碱性蛋白酶酶解后产生更多含磷量较高的肽段和小分子质量多肽,进而使更多的PPP与Ca<sup>2+</sup>结合。



字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

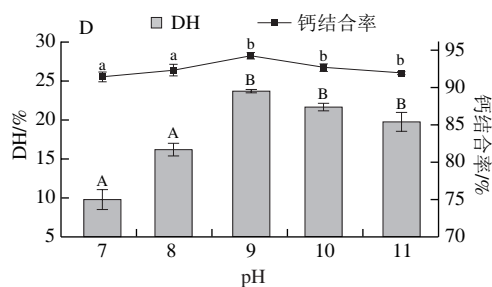
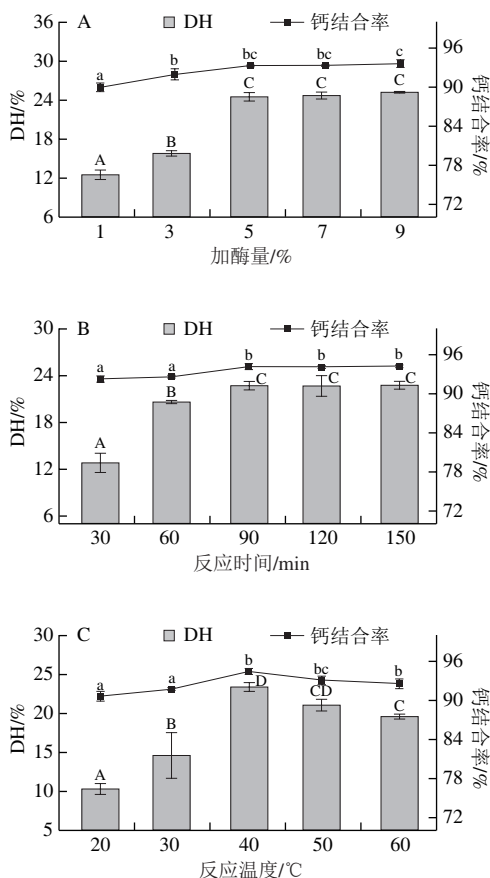
图1 酶解前处理方式对胰蛋白酶和双酶(胰蛋白酶+碱性蛋白酶)酶解PV效果的影响

Fig. 1 Effects of pretreatment methods on the enzymatic hydrolysis of PV by trypsin alone and in combination with alkaline protease

### 2.2 碱性蛋白酶酶解条件对PPP制备的影响

以DH和钙结合率为指标,采用单因素试验考察碱性蛋白酶酶解条件对PPP制备的影响。由图2A可知,当碱性蛋白酶加酶量小于5%时,DH呈近似线性增加,在5%加酶量时DH高达(24.50±0.61)%;继续增加加酶量其DH变化趋于平缓,这说明底物达到饱和,过量的加酶量对水解效率无显著影响<sup>[26]</sup>。PPP钙结合率变化趋势与DH变化趋势相似,这说明多肽产量与钙结合率有

一定的相关性, 在5%加酶量时PPP钙结合率最大, 为(93.29±0.34)%。图2B显示, 当反应时间从30 min延长至90 min时, DH和钙结合率分别从(12.78±1.23)%和(92.29±0.50)%增加到(22.70±0.68)%和(94.18±0.47)%。当继续延长反应时间时, 钙结合率和DH变化不显著, 整体趋势相对比较平缓<sup>[34]</sup>, 这表明酶解反应90 min后基本结束。反应温度在20~60℃, DH和钙结合率先增大后减少, 且在40℃时达到最大值, 分别高达(23.37±0.55)%和(94.42±0.49)%; 当反应温度继续增加时, 钙结合率和DH均明显降低(图2C), 这是由于在酶适宜温度下酶解反应速率随温度升高而升高, 超出酶适宜温度后酶会发生不同程度的变性<sup>[35]</sup>, 酶活丧失, 从而降低了PV的水解效率, 导致小分子肽产量低, 进而使得钙结合率降低。当pH值从7.0增加到9.0时, DH和钙结合率逐渐递增, 在pH 9.0时达到最大, 分别为(23.74±0.17)%和(94.19±0.45)%; 继续提高pH值, 过量的碱会使酶的空间结构被破坏, 导致酶活力的降低, 使得多肽产率降低。以上结果还显示改变酶解条件, 肽钙结合率没有DH变化那么显著, 可能是因为PPP所携带的磷酸基团分布不均匀导致<sup>[36]</sup>。综上所述, 反应时间对PPP的制备影响最小, 后续实验考虑反应时间90 min, 以加酶量5%、反应温度40 min和pH 9为中位数进行酶解正交试验优化。



A.加酶量; B.反应时间; C.反应温度; D. pH值。

图2 碱性蛋白酶酶解条件单因素试验结果

Fig. 2 Results of one-factor-at-a-time experiments on hydrolysis conditions of alkaline protease

2.3 碱性蛋白酶酶解正交试验优化

单因素分析虽分别确定了各因素酶解的最佳条件, 但考虑到因素与因素之间可能存在交互作用, 因此设计3因素3水平正交试验, 研究因素之间对碱性蛋白酶酶解作用的影响, 正交试验和极差(R)分析结果见表2。由R值可知, 影响DH和钙结合率的因素顺序为B>A>C。由K值可知, 碱性蛋白酶酶解最优工艺条件为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, 即酶解pH 9.0、反应温度40℃、加酶量5%。在该条件下进行实验验证求得, DH为(25.45±0.17)%, 钙结合率为(93.41±1.10)%。

表2 正交试验设计及结果

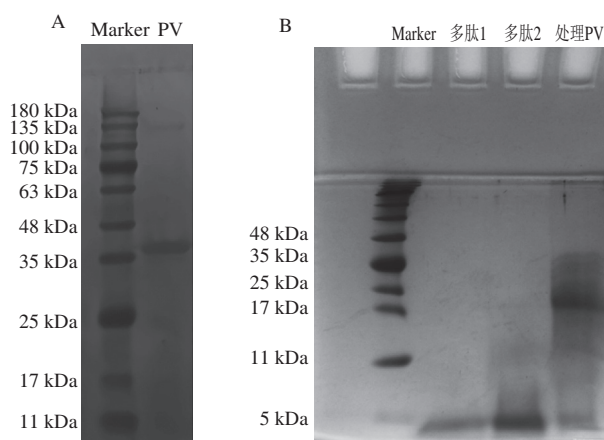
Table 2 Orthogonal array design with response variables

试验号	A pH	B 反应温度	C 加酶量	DH/%	钙结合率/%	
1	1	1	1	6.62	87.02	
2	1	2	2	18.53	91.14	
3	1	3	3	18.26	90.04	
4	2	1	2	16.48	89.65	
5	2	2	3	25.02	93.41	
6	2	3	1	19.58	92.35	
7	3	1	3	12.15	89.02	
8	3	2	1	18.44	91.44	
9	3	3	2	20.57	92.16	
K <sub>1</sub>				43.41	35.25	44.64
K <sub>2</sub>				61.08	61.99	55.58
K <sub>3</sub>				51.16	55.58	55.43
DH	k <sub>1</sub>	14.47	11.75	14.88		
	k <sub>2</sub>	20.36	20.66	18.53		
	k <sub>3</sub>	17.05	18.53	18.48		
R	5.89	8.91	3.65			
K <sub>1</sub>				268.2	265.69	272.62
K <sub>2</sub>				275.41	275.99	274.55
K <sub>3</sub>				272.62	272.95	272.47
钙结合率	k <sub>1</sub>	89.40	88.56	90.82		
	k <sub>2</sub>	91.80	92.00	91.52		
	k <sub>3</sub>	90.87	90.98	90.87		
R	2.40	3.43	0.64			

2.4 酶解物的分子质量分布情况

从图3得知, 未处理的PV分子质量>35 kDa, 这与现有研究一致<sup>[17]</sup>。处理PV的分子质量主要分布在

11~35 kDa, 少量分布在5 kDa处。相对于未处理PV, 经高温高压处理后的处理PV其分子质量有所下降, 这说明高温高压处理导致PV的空间构像被改变或破坏, 使得部分结构可能发生降解。多肽1和多肽2的分子质量主要集中在<11 kDa处; 且相较于多肽1, 多肽2在此处的条带颜色灰度更深, 说明多肽2中含<11 kDa的肽段含量高于多肽1。此外, 图3B条带不清晰且存在明显拖尾现象, 这可能是因为高温高压处理后PV中的肽链发生不同程度解离, 且经过内切酶作用, 导致产生的肽段比较复杂, 且多肽分子质量越小越复杂, 这些多肽小分子在电泳胶里运动不规则、电泳时间长或染色时间过长, 其可能会降解或部分从凝胶上脱离<sup>[37-38]</sup>。



A. Marker为11~180 kDa; PV为未处理。B. 多肽1为单一胰蛋白酶的酶解产物; 多肽2为胰蛋白酶和碱性蛋白酶的复合酶解产物; 处理PV为高温高压处理后PV; Marker为5~245 kDa。

图3 酶解物SDS-PAGE结果

Fig. 3 SDS-PAGE results of hydrolysates

## 2.5 PPP和PPP-Ca结构表征

### 2.5.1 紫外-可见吸收光谱分析

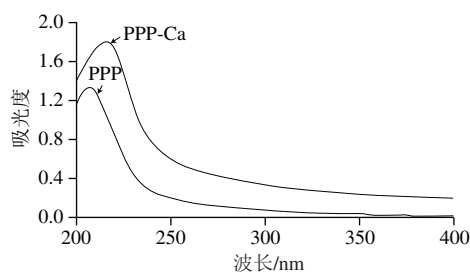


图4 PPP和PPP-Ca的紫外光谱图

Fig. 4 UV spectra of PPP and PPP-Ca

如图4所示, PPP和PPP-Ca的紫外吸收光谱有明显差异, PPP在207 nm左右出现最大吸收峰, 通常对应PPP中特定的羰基、羧基和酰胺键<sup>[39]</sup>。相较于PPP, PPP-Ca的紫外吸收峰出现吸收强度增强和红移现象, 在216 nm处达到最大, 这可能由于Ca<sup>2+</sup>与发色基团和助色基团相互

作用<sup>[40]</sup>, 影响电子跃迁, 导致吸收峰红移和强度增强, 与之前报道一致<sup>[41-42]</sup>, 此外还有一种原因可能是过渡金属离子可以吸收紫外线区域的光, 进而导致吸收峰强度增加。上述结果表明, PPP与Ca<sup>2+</sup>相互作用形成了不同于PPP的新化合物。

### 2.5.2 红外吸收光谱分析

如图5所示, PPP与Ca<sup>2+</sup>结合后, 相较于PPP红外光谱发生了显著变化。在3 434.59 cm<sup>-1</sup>处特征吸收峰是一NH伸缩振动的变化引起, 在结合钙后其红移至3 389.7 cm<sup>-1</sup>, 表明酰胺中一NH可能与钙离子发生反应, N—Ca键取代氢键导致N—H键延伸<sup>[41]</sup>。1 700~1 600 cm<sup>-1</sup>内的特征吸收峰是酰胺I带, 主要来源于C=O的伸缩振动<sup>[42]</sup>, 肽钙螯合后其由原来的1 654.1 cm<sup>-1</sup>移动到1 652.2 cm<sup>-1</sup>处, 这表明C=O参与了肽钙的结合, 这与文献[43]的报道类似。位于酰胺II带的1 543.73 cm<sup>-1</sup>处吸收峰红移至1 545.1 cm<sup>-1</sup>处, 这可能因为氮原子和钙离子的公共电子相互作用, 使碳原子的偶极性增强<sup>[44]</sup>。在1 541.8 cm<sup>-1</sup>处吸收峰是由C—N键伸缩振动引起, 但在结合钙后该吸收峰消失。1 467 cm<sup>-1</sup>是COO—的特征吸收峰, 在结合钙离子后此吸收峰消失, 这表明羧基的非键合自由电子转移到钙离子上<sup>[45-46]</sup>, 羧基氧参与了钙结合反应。1 280.5 cm<sup>-1</sup>处特征吸收峰是O—H变形振动引起, 在PPP与Ca<sup>2+</sup>结合后此吸收峰消失。在1 112.4 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰是P=O伸缩振动, 在与Ca<sup>2+</sup>结合后蓝移至1 092.9 cm<sup>-1</sup>处且波峰变宽, 这可能因为磷酸基团参与了钙螯合反应<sup>[47]</sup>。基于以上结果分析可推测, PPP与Ca<sup>2+</sup>结合位点主要是在氨基氮原子、羧基氧原子和磷酸基团上。

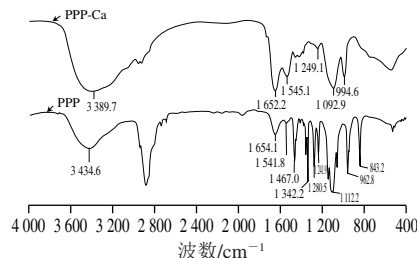


图5 PPP和PPP-Ca的红外光谱图

Fig. 5 FTIR spectra of PPP and PPP-Ca

### 2.5.3 圆二色谱分析

由图6可知, PPP与钙离子结合后, 吸收峰由202 nm偏移至205 nm,  $\alpha$ -螺旋增加至25%,  $\beta$ -折叠增加至34%,  $\beta$ -转角和无规卷曲结构分别减少至0.3%和40.8%, 这可能是因为之前带负电荷的肽链引入了带正电荷的钙离子, 在一定程度上降低了电荷之间的斥力, 使得 $\alpha$ -螺旋能够稳

定存在, 同时也有助于肽链的折叠<sup>[29]</sup>,  $\beta$ -转角和部分无规卷曲结构转变为 $\beta$ -折叠, 进一步形成排列紧凑的二级结构<sup>[48-49]</sup>。

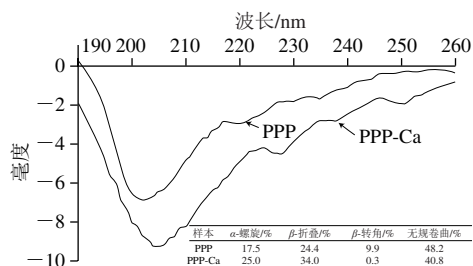


图6 PPP和PPP-Ca的圆二光谱图  
Fig. 6 CD spectra of PPP and PPP-Ca

### 2.5.4 扫描电镜分析

图7显示, PPP表面较为光滑, 多为片状、少部分为球状。PPP-Ca表面粗糙呈絮状, 有许多颗粒状和晶体状聚集体, 分布更致密, 与已有研究结果相似<sup>[44,49]</sup>。这可能是由于肽与钙离子之间的配位键导致内部结构发生变化, 此外钙离子可以促进肽链聚集折叠<sup>[43,50]</sup>, 导致形成了更紧密的颗粒, 也说明PPP与钙离子结合后形成了新的物质。

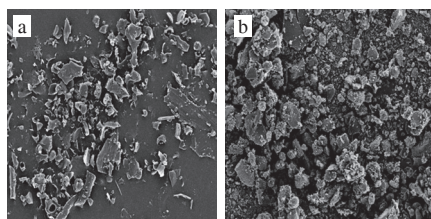


图7 PPP和PPP-Ca的扫描电镜图 (×1 000)  
Fig. 7 SEM images of PPP and PPP-Ca (×1 000)

### 2.5.5 Zeta电位分析

Zeta电位值可表征多肽溶液的稳定性, 有研究证实钙离子主要是与多肽中的游离氨基和羧基结合, 在结合过程中可能导致多肽表面电荷性质的改变<sup>[51-53]</sup>, 故可通过分析Zeta电位, 探究钙离子与多肽的结合情况。由图8可知, PPP和CPP电位分别为 $(-28.39 \pm 0.34)$  mV和 $(-28.22 \pm 1.23)$  mV, 这是因为PPP和CPP均含有大量的磷酸基团, 自身带有大量负电荷。在与钙离子结合后, PPP-Ca和CPP-Ca的电位绝对值有显著下降, 分别为 $(-13.19 \pm 0.39)$  mV和 $(-17.96 \pm 0.81)$  mV。由于PPP和CPP与钙离子相互作用, 多肽中带负电荷的磷酸基团和羧基基团与带正电荷的钙离子相结合, 导致多肽表面所带负电荷被中和, 整体电位发生明显变化。且相较于CPP-Ca, PPP-Ca的电位值变化更明显, 这说明PPP与钙离子的结合能力更强。

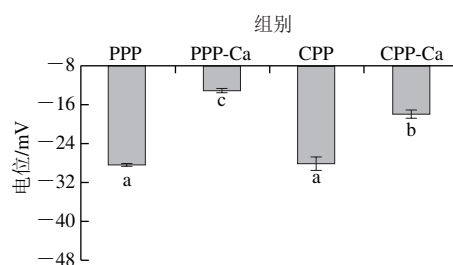


图8  $\text{Ca}^{2+}$ 对PPP和CPP的Zeta电位的影响  
Fig. 8 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on zeta potential of PPP and CPP

## 3 结论

碱性蛋白酶的最佳酶解条件为pH 9.0、温度40 °C、加酶量5%、酶解90 min, 在此条件下DH为 $(25.45 \pm 0.17)$ %, 钙结合率为 $(93.41 \pm 1.10)$ %。基于紫外-可见吸收光谱、红外吸收光谱、圆二色谱和扫描电镜分析, 可证实PPP和 $\text{Ca}^{2+}$ 主要通过羧基氧原子、氨基氮原子和磷酸基团相互作用, 无规卷曲结构含量降低且转变成 $\beta$ -折叠结构, PPP和钙离子结合后结构变得更加有序, 形成致密的聚集体。同时, Zeta电位结果也表明与PPP相比, PPP与 $\text{Ca}^{2+}$ 相互作用后所带负电荷明显减少, 进而证实PPP-Ca是不同于PPP的新化合物。本研究表明PPP-Ca有潜力作为一种新型肽钙补充剂。

### 参考文献:

- [1] 胡冠华, 王德宝, 苏琳, 等. 食源性钙整合肽的研究概况[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 224-229. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024344.
- [2] SUN N, WU H T, DU M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 140-148. DOI:10.1016/j.tifs.2016.10.004.
- [3] CHENG L, ZHANG S M, CHEN P P, et al. Fabrication and characterization of nano-hydroxyapatite/poly(D,L-lactide) composite porous scaffolds for human cartilage tissue engineering[J]. Key Engineering Materials, 2006, 309/310/311: 943-948. DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.943.
- [4] 赵梓月, 王思远, 廖森泰, 等. 多肽整合钙的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 200-206.
- [5] XU C N, YANG C B, YIN Y G, et al. Phosphopeptides (PPPs) from hen egg yolk phosvitin exert anti-inflammatory activity via modulation of cytokine expression[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(4): 718-726. DOI:10.1016/j.jff.2012.04.011.
- [6] CASTELLANI O, MARTINET V, DAVID-BRIAND E, et al. Egg yolk phosvitin: preparation of metal-free purified protein by fast protein liquid chromatography using aqueous solvents[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 791(1): 273-284. DOI:10.1016/S1570-0232(03)00230-7.
- [7] 介怡琳, 陈婵, 刘晴丽, 等. 卵黄高磷蛋白调控生物矿化的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 220-226. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609041.

- [8] KITTTS D D. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(12): 549-554. DOI:10.1016/j.tifs.2005.08.009.
- [9] 江波, MINE Y. 卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备及钙结合性质研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2000(4): 325-330.
- [10] 皮钰珍, 王淑琴, 岳喜庆. 卵黄高磷蛋白磷酸肽制备工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 28(8): 110-112. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.
- [11] GOULAS A, TRIPLETT E L, TABORSKY G. Oligophosphopeptides of varied structural complexity derived from the egg phosphoprotein, phosvitin[J]. Journal of Protein Chemistry, 1996, 15(1): 1-9. DOI:10.1007/BF01886805.
- [12] HECKER A, TESTENIÈRE O, MARIN F, et al. Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures[J]. FEBS Letters, 2003, 535(1): 49-54. DOI:10.1016/S0014-5793(02)03856-5.
- [13] VOLK S P, AHN D U, ZEECE M, et al. Effects of high-pressure processing and enzymatic dephosphorylation on phosvitin properties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(15): 3095-3098. DOI:10.1002/jsfa.5778.
- [14] SAMARAWEEERA H, MOON S H, LEE E J, et al. Characterisation of phosvitin phosphopeptides using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2014, 165: 98-103. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.05.098.
- [15] ITOH T, ABE Y, ADACHI S. Comparative studies on the  $\alpha$  and  $\beta$ -phosvitin from hen's egg yolk[J]. Journal of Food Science, 1983, 48(6): 1755-1757. DOI:10.1111/j.1365-2621.1983.tb05077.x.
- [16] HUANG X, MOON S H, LEE J, et al. Effective preparation method of phosphopeptides from phosvitin and the analysis of peptide profiles using tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14086-14101. DOI:10.1021/acs.jafc.9b05973.
- [17] 张晓维. 卵黄高磷蛋白的分离纯化、结构表征及功能特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 18-22.
- [18] ZHANG X, JIA Q, LI M, 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: 110169. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110169.
- [19] 郎佳雪, 刘畅, 赵淼, 等. 响应面法优化碱性蛋白酶水解豆渣蛋白质的研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(3): 129-135.
- [20] 徐彩娜. 卵黄高磷蛋白磷酸肽的酶解制备及其持钙功能特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009: 16-23.
- [21] 马诗文. 复合酶法制备绿豆抗氧化活性多肽及其应用研究[D]. 鞍山: 辽宁科技大学, 2020: 16-18.
- [22] 郝晓华, 郑凯南, 刘可心. 碱性蛋白酶酶解藜麦芽制备多肽工艺的研究[J]. 中国饲料, 2022(9): 104-107; 112. DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20220920.
- [23] ZHANG Q, CHEN Q H, HE G Q. Effect of ultrasonic-ionic liquid pretreatment on the hydrolysis degree and antigenicity of enzymatic hydrolysates from whey protein[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 63: 104926. DOI:10.1016/j.ulsonch.2019.104926.
- [24] 林虬, 黄薇, 宋永康, 等. 棉籽蛋白水解物水硬度3种测定方法的比较[J]. 福建农业学报, 2011, 26(6): 1076-1080. DOI:10.19303/j.issn.1008-0384.2011.06.030.
- [25] SUN N, CUI P B, LIN S G, et al. Characterization of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates: calcium chelation, solubility and absorption into intestinal epithelial cells: characterization of scohs: calcium chelation, solubility and absorption[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(13): 4604-4611. DOI:10.1002/jsfa.8330.
- [26] WU J H, CAI X X, TANG M R, et al. Novel calcium-chelating peptides from octopus scraps and their corresponding calcium bioavailability: novel calcium-chelating peptides of octopus scraps[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(2): 536-545. DOI:10.1002/jsfa.9212.
- [27] 黄文, 余可楠, 廖婉雯, 等. 响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 190-196. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021020099.
- [28] 姚瑶. 新的低分子多肽电泳体系X-尿素-PAGE体系的建立及应用[D]. 济南: 山东大学, 2006: 13-14.
- [29] CUTTING J A, ROTH T F. Staining of phospho-proteins on acrylamide gel electropherograms[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 386-394. DOI:10.1016/0003-2697(73)90367-9.
- [30] 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: 109632. DOI:10.1016/j.lwt.2020.109632.
- [31] SUN N, JIN Z Q, LI D M, et al. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide, Asp-His-Thr-Lys-Glu, and *in vitro* calcium absorption studies of peptide-calcium complex[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(44): 9782-9789. DOI:10.1021/acs.jafc.7b03705.
- [32] 王俊强. 大豆肽钙螯合物的结合机理及其性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 10; 19.
- [33] 徐彩娜, 林松毅, 刘静波, 等. 双酶分步水解制备卵黄高磷蛋白磷酸肽的实验研究[J]. 食品科技, 2008(11): 6-10.
- [34] 许青, 徐昕, 公丽艳. 响应面法优化草鱼鳞胶原蛋白钙结合肽的制备[J]. 食品工业, 2021, 42(3): 1-4.
- [35] 马诗文, 高云, 代西龙, 等. 碱性蛋白酶酶解绿豆蛋白制备低聚肽工艺优化[J]. 食品工业, 2019, 40(6): 62-65.
- [36] 焦涵. 卵黄高磷蛋白磷酸肽的工业化生产工艺研究及车间设计[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 62-65.
- [37] 王丽荣, 程福亮, 陈雷, 等. 尿素-SDS-PAGE测定小分子多肽相对分子质量方法的建立[J]. 饲料博览, 2013(9): 5-8.
- [38] 张晓楠, 张延凤, 曹云新, 等. 尿素-SDS-PAGE快速测定多肽的相对分子质量[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(1): 87-88. DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.00.
- [39] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.103.
- [40] 吴佳南, 孙娜, 林松毅, 等. 鳕鱼皮明胶肽钙复合物的制备及结构表征[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 87-93. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191212-138.
- [41] LUO J, YAO X, SOLADOYE O P, et al. Phosphorylation modification of collagen peptides from fish bone enhances their calcium-chelating and antioxidant activity[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112978. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112978.
- [42] MALISON A, ARPANUTUD P, KEERATIPIBUL S. Chicken foot broth byproduct: a new source for highly effective peptide-calcium chelate[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128713. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128713.
- [43] 冯思敏, 王晶, 王羽莹, 等. 珍珠肽螯合钙的制备与性质表征[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 119-126. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021040018.



- [44] 高敏, 汪建明, 甄灵慧, 等. 牛骨多肽螯合物的制备及结构表征[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 251-261. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181217-183.
- [45] CHEN M, JI H W, ZHANG Z W, 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: 103447. DOI:10.1016/j.jff.2019.103447.
- [46] WANG Y, CUI F Z, ZHAI Y, et al. Investigations of the initial stage of recombinant human-like collagen mineralization[J]. Materials Science and Engineering: C, 2006, 26(4): 635-638. DOI:10.1016/j.msec.2005.07.019.
- [47] 王孟丽, 布冠好, 陈复生, 等. 花生肽-钙螯合物的制备及其结构表征[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(5): 47-54; 76. DOI:10.16433/j.1673-2383.2021.05.006.
- [48] WALTERS M, ESFANDI R, TSOPMO A. Potential of food hydrolyzed proteins and peptides to chelate iron or calcium and enhance their absorption[J]. Foods, 2018, 7(10): 172. DOI:10.3390/foods7100172.
- [49] PENG Z, HOU H, ZHANG K, et al. Effect of calcium-binding peptide from pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 373-378. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.10.078.
- [50] 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. DOI:10.1016/j.jff.2018.11.042.
- [51] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.02.121.
- [52] SUN N, WANG Y X, BAO Z J, et al. Calcium binding to herring egg phosphopeptides: binding characteristics, conformational structure and intermolecular forces[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125867. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125867.
- [53] LUO J Q, ZHOU Z S, YAO X T, et al. Mineral-chelating peptides derived from fish collagen: preparation, bioactivity and bioavailability[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 110209. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110209.