

玉米肽亚铁螯合物的结构特性及稳定性

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

(1. 河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 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: 以玉米肽和氯化亚铁为原料制备玉米肽亚铁螯合物, 既能提高玉米肽的利用率, 还能为开发铁补剂提供一条新思路。通过紫外光谱和热重分析检测玉米肽亚铁螯合物的结构特性和热稳定性, 用分子对接技术对鉴定出的玉米肽段和亚铁离子的结合位点进行模拟, 并在不同温度、不同 pH 值和不同体外消化方式条件下观察玉米肽亚铁螯合物的稳定性。结果表明: 紫外吸收峰产生变化, 螯合前后特征吸收峰由 274.99 nm 处移到了 275.01 nm, 玉米肽和玉米肽亚铁螯合物是两种不同的物质; 热重分析显示螯合物和肽的残留率分别为 34.94% 和 18.74%, 玉米肽亚铁螯合物的热稳定性相较玉米肽显著提高; FSAASYPDLIDALP、LQQRQQLLNPL 和 Fe²⁺ 的结合能分别为 -50.50 和 -48.61 kJ/mol, 提供配位点的是 Asp8 (天冬氨酸) 的氨基, 还有 Pro7 (脯氨酸)、Ser5 (丝氨酸)、Tyr6 (酪氨酸)、Leu7 (亮氨酸) 等和亚铁离子形成了疏水作用力; 不同温度作用下相对分子质量都集中在 1000 u 以下, 小肽更易螯合和吸收, 在 pH 为中性时较酸碱条件下更稳定。

关键词: 玉米肽; 铁; 螯合; 稳定性; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2024)07-137-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0779

Structural Characteristics and Stability of Corn Peptide-iron Chelates

WU Hanshuo^{1,2}, REN Jie², ZHANG Xinxue², FU Shaowei², LI Shuguo^{1*}, LIU Wenying^{2*}

(1. College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050091, China)

(2. Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

Abstract: Corn peptide-iron chelates serve a dual purpose, enhancing the utilization of corn peptides while also offering a novel approach for the development of iron supplements. To examine the structural properties and thermal stability of corn peptide-iron chelates, samples of this compound were prepared from corn peptides and ferrous chloride. Following ultraviolet spectroscopy and thermogravimetric analysis, the binding sites of the identified corn peptide fragments and ferrous ions were simulated by molecular docking. The stability of the corn peptide-iron chelate was observed at different temperatures and pH values, as well as under different *in vitro* digestion conditions. The results showed that the ultraviolet absorption peak changed. More specifically, the characteristic absorption peak shifted from 274.99 nm to 275.01 nm. Moreover, the corn peptide and corn peptide-iron chelate were compared and found to differ in a number of their properties.

引文格式:

吴晗硕,任杰,张新雪,等.玉米肽亚铁螯合物的结构特性及稳定性[J].现代食品科技,2024,40(7):137-144.

WU Hanshuo, REN Jie, ZHANG Xinxue, et al. Structural characteristics and stability of corn peptide-iron chelates [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 137-144.

收稿日期: 2023-06-27

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2021BEG02027); 河北省重点研发计划项目 (19227112D)

作者简介: 吴晗硕 (1999-), 女, 硕士生, 研究方向: 食源性肽, E-mail: 1104883374@qq.com

通讯作者: 李书国 (1969-) 博士, 教授, 研究方向: 粮油与食品加工, E-mail: shuguolee@126.com; 共同通讯作者: 刘文颖 (1984-), 博士研究生, 高级工程师, 研究方向: 农产品加工工程, E-mail: wenyingliu888@126.com

Thermogravimetric analysis revealed residual rates of 34.94% and 18.74% for corn chelate and peptide, respectively, while thermal stability of the corn peptide-iron chelate was found to be significantly higher than that of the corn peptide. The binding energy levels of FSAASYPDLIDALP and LQQRQQLNPL with Fe^{2+} were -50.50 and -48.61 kJ/mol, respectively, and the amino group of Asp8 (aspartic acid) was found to provide the ligand site. In addition, Pro7 (proline), Ser5 (serine), Tyr6 (tyrosine), and Leu7 (leucine) were found to bind to the ferrous ions to form hydrophobic interactions. The relative molecular masses were mostly below 1 000 u under the action of different temperatures. In addition, small peptides were more easily chelated and absorbed, and were stable under relatively alkaline conditions.

Key words: corn peptides; iron; chelation; stability; molecular docking

玉米是世界最主要的农作物之一，玉米加工为淀粉过程中会产生玉米蛋白粉这一副产物。由玉米蛋白粉通过蛋白酶水解或微生物发酵可获得玉米肽，玉米肽是由2~20个氨基酸构成的相对分子质量较低的小分子短肽^[1]。因玉米肽来自天然产物，安全健康且获得它的成本较低、来源丰富。近年来不断对玉米肽进行深入研究和相应产品的开发，已发现较玉米蛋白，玉米肽更易吸收、溶解性更高、热稳定性更强、流动性更好、黏度较低等，并且有多种生物学活性，比如促进酒精代谢、护肝降脂、抗疲劳、抗氧化、抗炎等，市面上已有许多这些生物学功能所相应的产品^[2]。

铁是人体必需的微量元素之一，铁在人的许多生理过程中发挥着不可替代的作用，比如，参与血红蛋白和多种氧化还原酶的构成，通过血红蛋白运输氧和二氧化碳，通过肌红蛋白固定和储存氧气等^[3,4]。若人体缺乏铁元素，血红蛋白、肌红蛋白的合成受阻，影响人体吸收氧气和释放二氧化碳，导致机体内电子传递、氧化还原等许多正常机体内的生理活动和代谢发生紊乱^[5]。由此，市面上有许多铁补充剂，传统补铁剂多为无机型的补铁剂，其吸收率和生物利用率都较低。有许多研究表明多肽金属元素螯合物有更高的配合率和稳定性并且在体内利用率较高，且当血红素与肽共存时，血红素的溶解度随之提高，铁的吸收利用也会提高^[6,7]，肽亚铁作为一种新型的生物态铁，具有吸收率高、安全无毒副作用、不刺激肠道等特点。目前已有许多对大豆肽^[8]、花椒籽肽^[9]、花生肽^[10]、南极磷虾衍生肽^[11]、乳清蛋白肽^[12]为主要原料制备肽铁螯合物的研究，关于玉米肽亚铁螯合物的稳定性及结合机制的研究鲜见报道。本研究以玉米肽和氯化亚铁为原料制备玉米肽亚铁螯合物，利用紫外光谱和热重分析研究其结构特性。采用软件模拟，预测肽段和亚铁离子的结合位点。并在不同温度、不同pH值、

模拟不同体外消化情况下探究玉米肽亚铁螯合物的稳定性，在提高玉米肽利用率的基础上又能为铁补剂的开发提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

玉米肽，实验室两步酶解法获得；超纯水，实验室自制；乙腈（色谱纯），美国Fisher公司；氯化亚铁、抗坏血酸、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸等化学试剂均为分析纯，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；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；PI403型天平，梅特勒-托利多仪器公司；DHG-9075A电热恒温鼓风干燥箱，北京陆希科技有限公司；FD-1A-50冷冻干燥机，北京华圣科仪实验设备有限公司；LC-20A高效液相色谱仪，日本Shimadzu公司；Q-Exactive质谱仪，赛默飞世尔科技公司；UV-1780紫外可见分光光度计，日本SHIMADZU公司；STA449F3 Jupiter同步TG-DSC热分析仪，耐驰。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米肽制备

将质量分数为8%的玉米蛋白粉溶液pH调节为8.5，55℃下均质15min，随后加入0.4g碱性蛋白酶，酶解反应3h。反应结束后再将反应液pH调为7.0，温度调为50℃，加入0.45g中性蛋白酶，继续酶解2h。酶解结束后，将温度升至100℃，灭酶15min。冷却至室温，6000r/min离心10min，取上清液。最后进行喷雾干燥得到玉米肽干粉。干

干燥条件: 进料温度为 25 °C, 进料速度为 14 mL/min, 进风温度 135 °C, 进风压力 20 kPa。

1.3.2 玉米肽亚铁螯合物的制备

在张新雪等^[13]的方法基础上加以改进。将玉米肽粉于蒸馏水中充分溶解, 加入质量分数为 0.1% 的抗坏血酸, 防止 Fe²⁺ 氧化为 Fe³⁺ 用摩尔浓度为 1 mol/L 的盐酸和氢氧化钠调节至后续实验条件所需 pH 值, 按肽盐比为 5:1 (m/m) 的比例加入氯化亚铁, 用漩涡混合仪混合均匀。将恒温水域振荡器调至所需温度, 将样品溶液恒温水浴螯合, 反应结束后, 4 000 r/min 下离心 15 min, 于上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇洗涤, 静置 2 h 得到沉淀物, 将沉淀物真空冷冻干燥得到玉米肽亚铁螯合物。

1.3.3 玉米肽亚铁螯合物紫外扫描

分别对玉米肽和玉米肽亚铁螯合物进行紫外全波长扫描。扫描条件: 扫描波长 240~400 nm; 狭缝宽度 1.0 mm; 采样间隔 0.5 nm。

1.3.4 TG热重分析

分别称取玉米肽和玉米肽亚铁螯合物各 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。扫描条件: 扫描温度为 50~900 °C; 升温速率 10 K/min; N₂ 流速为 30 mL/min。记录升温过程中样品实时质量, 绘制温度-质量关系曲线图。

1.3.5 玉米肽序列鉴定

用 Q-Exactive 质谱仪进行鉴定。将 10 μL 样品溶液以 10 μL/min 的流速加载到捕获柱上, 在分析柱中线性洗脱分离。流速: 0.30 μL/min; 洗脱时间: 65 min; 分析柱: 75 μm×150 mm; C18 捕获柱: 300 Å, 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 中的半柔性对接对玉米肽肽段与亚铁离子进行分子对接模拟。玉米肽肽段三维结构在 Diacoverly Studio 2019 软件的 Build and Edit Nucleic Acid Tools 一栏下构建, Fe²⁺ 的三维结构从 PubChem 数据库下载, 其 CID: 23925。将玉米肽肽段设置为受体, Fe²⁺ 设置为配体, 创建大小合适的对接盒子包裹受体, 进行对接。使用 Discovery studio 2019 软件对玉米肽肽段与 Fe²⁺ 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 玉米肽亚铁螯合物的稳定性测定

1.3.7.1 玉米肽亚铁螯合物的热稳定性测定

将玉米肽亚铁螯合物溶解于去离子水中, 配置成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 分别于 20、40、60、80、100 °C 条件下水浴 2 h, 冷却至室温后, 对其相对分子质量分布进行测定。

1.3.7.2 玉米肽亚铁螯合物的酸碱稳定性测定

将玉米肽亚铁螯合物溶解于去离子水中至质量浓度为 10 mg/mL, 用摩尔浓度为 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值, 将 pH 值分别为 2、4、6、8、10 的样品溶液于 37 °C 下水浴 2 h, 冷却至室温后进行相对分子质量分布测定。

1.3.7.3 玉米肽亚铁螯合物体外模拟消化稳定性测定

(1) 胃蛋白酶消化

样品溶于去离子水中至质量浓度为 1 mg/mL, 用摩尔浓度为 1 mol/L HCl 溶液将样品溶液 pH 值调至 2, 在 37 °C 水浴条件下预热 5 min, 再加入 3% (m/m) 胃蛋白酶, 混合均匀后在 37 °C 水浴条件下消化 3 h, 反应结束后于 100 °C 下水浴灭酶 10 min, 冷却后测定相对分子质量分布^[14]。

(2) 胰蛋白酶消化

样品溶于去离子水中至质量浓度为 1 mg/mL, 用浓度为 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 6.8, 在 37 °C 水浴条件下预热 5 min, 加入 3% (m/m) 胰蛋白酶, 混匀后在 37 °C 水浴条件下消化 3 h, 立即于 100 °C 水浴灭酶 10 min, 冷却后测定相对分子质量分布^[14]。

(3) 胃蛋白酶消化后再胰蛋白酶消化

将质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液用浓度为 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调至 2, 并加入 3% (m/m) 胃蛋白酶, 然后在 37 °C 下水浴反应 3 h。随后将反应液用浓度为 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 6.8, 加入 3% (m/m) 胰蛋白酶, 混匀后在 37 °C 水浴条件下消化 3 h, 100 °C 下灭酶 10 min, 冷却后测定相对分子质量分布^[14]。

1.3.8 分子质量分布测定

使用高效凝胶过滤色谱法测定。将样品溶液用 0.2 μm 的聚四氟乙烯滤膜过滤后, 上机过滤。以乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(相对分子质量 189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(相对分子质量 451 u)、杆菌酶(相对分子质量 1 450 u)、细胞色素 C(相对分子质量 12 500 u) 为肽标准品, 配制

成质量浓度为 0.001 g/mL 的溶液, 过膜后进样, 绘制相对分子质量校正曲线^[15,16]。

流动相: 乙腈:水:三氟乙酸为 45:55:0.1(体积比); 色谱柱: TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm; 流速: 0.5 mL/min; 样品质量浓度: 1.0 mg/mL; 进样体积: 10 μ L; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

1.3.9 数据分析

所有测定均进行三次, 紫外扫描和热重分析结果使用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 玉米肽分子量分布

玉米肽分子质量凝胶色谱如图 1 所示。肽段含量占比越多, 则峰值越高, 可以看出玉米肽分子量都集中在 189~1 000 u 区间, 占比高达 79.56%。分子质量的大小与吸收利用率、透过血脑屏障率、抗氧化功能等之间都存在密切关系^[15-17]。

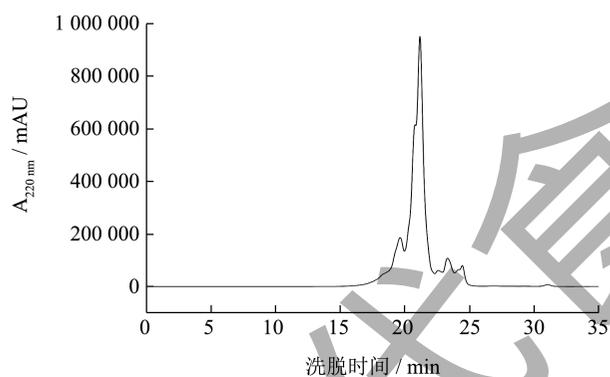


图 1 玉米肽分子量分布

Fig.1 The molecular weight distribution of corn peptide

2.2 紫外光谱

紫外光谱是一种能探究物质是否发生变化, 鉴定是否有新物质出现的分析方法^[18,19]。金属离子和活性肽形成新的复合物会导致原始吸收峰发生位移甚至消失, 或有新的吸收峰出现。图 2 显示, 玉米肽的特征吸收峰在 274.99 nm 处, 玉米肽亚铁螯合物的最大吸收峰在 275.01 nm 处, 与亚铁离子螯合后的玉米肽最大吸收峰发生了红移, 是由于玉米肽上的 N、O 原子参与螯合反应, 导致 C=O 跃迁产生影响。表明玉米肽与亚铁离子作用形成了新的物质。胡乔迁等^[20]对芝麻蛋白肽及其亚铁螯合物的研究、Xu 等^[21]对谷子麸皮球蛋白水解物衍生的四肽及其亚铁螯合物的研究和 Yuan 等^[22]对灰叶蛋白水解物的肽亚

铁螯合物的研究所呈现紫外光谱的变化相似。

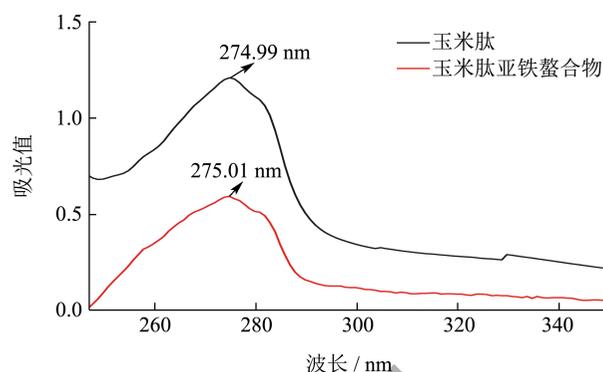


图 2 玉米肽和玉米肽亚铁螯合物紫外光谱

Fig.2 UV spectrum of corn peptide and corn peptide ferrous chelate

2.3 热重分析

热重分析可测量出物质从天然构象到变性状态(即变性温度)时的温度变化, 在一定的温度范围内, 样品在加热过程中, 质量和随温度变化关系可以反映受热样本的稳定性, 具有高灵敏度、结果精准和操作便捷等优点^[23,24]。如图 3 示, 观察玉米肽和玉米肽亚铁螯合物的温度-质量关系曲线图, 可知两样品的热降解均分为三个阶段。玉米肽的第一降解阶段在 50~195.74 $^{\circ}$ C 脱水干燥阶段, 此阶段的降解率为 11.48%, 因为水分的挥发玉米肽仅有轻微的重量损失; 第二阶段在 195.74~359.10 $^{\circ}$ C, 这是玉米肽的主要降解阶段且降解率高达 55.66%, 超过一半的物质在此阶段降解; 第三阶段在 359.10~900 $^{\circ}$ C 高温区段, 降解率为 14.12%; 玉米肽亚铁螯合物的第一降解阶段为 50~203.86 $^{\circ}$ C, 降解率为 15.1%, 所需温度较玉米肽稍高; 第二降解阶段在 203.86~432.95 $^{\circ}$ C, 此阶段也是玉米肽亚铁螯合物的降解反应的主导阶段, 降解率为 36.22%, 损失率远远小于玉米肽, 其热稳定性较玉米肽显著提高; 第三降解阶段在 432.96~900 $^{\circ}$ C, 降解率仅为 13.74%。最终螯合物和肽的残留率分别为 34.94% 和 18.74%。相比两者热稳定性, 玉米肽亚铁螯合物热稳定性较高, 不同的吸热峰是由 C-N 键在高温下断裂引起的^[25], 在第一降解阶段水挥发, 可能螯合物是由于结构的紧密需更高的温度才能将水分挥发出来。在第二阶段主要降解阶段, 玉米肽较螯合物所损失的质量多将近 20%, 并且最终残碳率螯合物比玉米肽多将近一半。两者之间显著的差别可能是由于玉米肽和亚铁离子之间发生了螯合, 螯合物的结构更加紧密, 热变性温度整体升高, 化学键断裂所需要更大的能量^[26], 所以所需断裂温度也明显

升高。石景等^[27]对鸡血球肽铁螯合物的研究也得出螯合物较肽热稳定性高的结果。

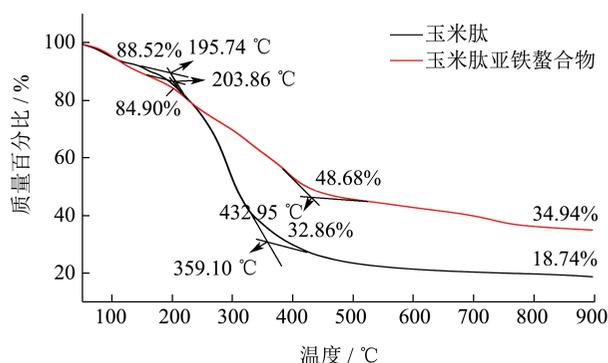


图3 玉米肽和玉米肽钙 TG 曲线图

Fig.3 TG curve of corn peptide and corn peptide ferrous chelate

2.4 肽段鉴定和对接模拟

通过质谱鉴定出两条肽段 Leu-Gln-Gln-Arg-Gln-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro-Leu (LQQRQQLLNPL) 和 Phe-Ser-Ala-Ala-Ser-Tyr-Pro-Asp-Leu-Ile-Asp-Ala-Leu-Pro (FSAASYPDLIDALP) 分子量分别为 1 350.56 和 1 479.62 u。通过分子对接技术, FSAASYPDLIDALP、LQQRQQLLNPL 和 Fe^{2+} 的结合能分别为 -50.50 kJ/mol 和 -48.61 kJ/mol。如图 4 示, 其中 FSAASYPDLIDALP- Fe^{2+} 的结合提供结合位点的是 Asp8 (天冬氨酸), 位于 Asp8 的氨基上, 键长为 1.63Å。还有 Pro7 (脯氨酸)、Ser5 (丝氨酸)、Tyr6 (酪氨酸) 和亚铁离子形成了疏水作用力。LQQRQQLLNPL- Fe^{2+} 的模拟图中, Leu7、Leu8、Leu11 (亮氨酸) 和亚铁离子形成了疏水作用力。根据先前已有多种肽段和亚铁离子结合能力的研究, 肽的分子量也是肽亚铁螯合能力影响因素之一, Shu 等^[28]发现 500~2 000 u 之间的胶原衍生肽和金属螯合活性比其他肽段都要高。其次氨基酸的种类也是肽铁螯合能力的影响因素, Gomez 等^[29]、Zhang 等^[30]发现 Ser (丝氨酸) 的羟基残基和巯基而有助于铁螯合活性, Asp (天冬氨酸) 和 Lys (赖氨酸) 的羧酸 O 原子和 Lys 的侧链氨基 N 原子对钙有很强

的作用力, 并且丝氨酸的磷酸化也可以产生适合用于铁、钙和锌等带正电荷的金属的螯合位点。Lin 等^[31]通过 FT-IR 光谱分析和 Zeta 电位等方法, 预测出了罗非鱼胶原肽与铁离子主要通过 Arg (精氨酸) 和 Lys (赖氨酸) 的羰基形成 Fe-O、Fe-N、O-Fe-O 或 N-Fe-O 键。Tam 等^[32]研究多种肽段发现, 肽段中的 Asn (天冬酰胺) 和 Phe (苯丙氨酸) 是和的亚铁离子结合有效的氨基酸, Asn (天冬酰胺) 和 Phe (苯丙氨酸) 在亚铁离子周围形成了一个保护围墙, 限制水分子对 Fe^{2+} 的影响。还有和亚铁离子结合力较强的肽段主要成分为疏水氨基酸 Leu (亮氨酸) 和 Ile (异亮氨酸)。脂肪族氨基酸侧链阻止了水分子的进入, 增强了铁肽复合物的稳定性。鉴定出的这两条肽段的氨基酸组成和分子量与先前研究发现具有较高的铁螯合能力相一致。两条肽段均含有 Ser (丝氨酸) 或 Arg (精氨酸), 富含脂肪族氨基酸 Leu (亮氨酸)、Ile (异亮氨酸)、Asp (天冬氨酸)、Asn (天冬酰胺)、Gln (谷氨酰胺) 等, 且分子量均小于 1 500 u。

2.5 玉米肽亚铁螯合物的稳定性测定

2.5.1 玉米肽亚铁螯合物的热稳定性测定

玉米肽铁螯合物在 20、40、60、80、100 °C 处理 2 h 后, 其分子质量分布如表 1 所示。分子质量在 1 000 u 以下的部分所占比例都在 72%~80% 之间, 其中 80 °C 处理的螯合物相对分子质量 1 000 u 以下高达 79.53%, 在 80 和 100 °C 时可能是温度过高, 铁离子和肽之间的配位键在高温下断裂导致, 150~189 u、150 u 以下的组分较其他温度下减少。除此之外其他组分无明显变化, 热稳定性较好。分子质量大小在肽的螯合能力中起关键作用, 而且研究表明小肽更容易被人体吸收, 具有多种生物活性, 低分子质量肽的金属元素螯合能力更强。

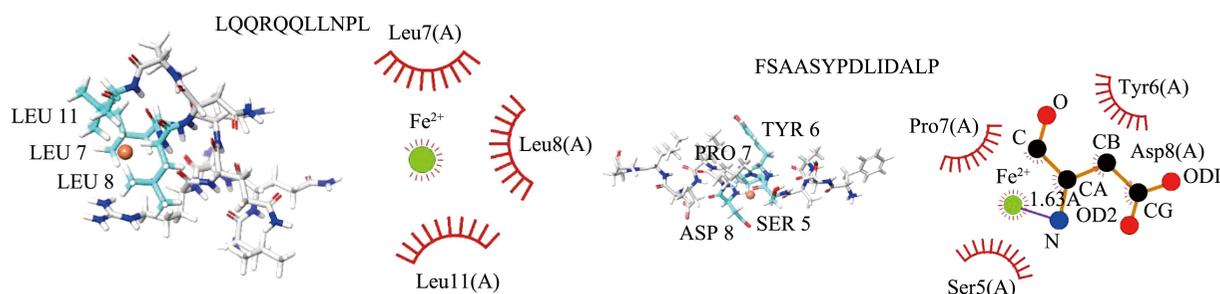


图4 肽段和 Fe^{2+} 分子对接模拟图

Fig.4 Simulation of peptides and Fe^{2+} molecular docking

表 1 不同温度下玉米肽亚铁螯合物的相对分子质量分布

Table 1 Relative molecular mass distribution of corn peptide ferrous chelate at different temperatures

温度 /℃	相对分子质量分布/%						
	10 000 u 以上	5 000~10 000 u	2 000~5 000 u	1 000~2 000 u	189~1 000 u	150~189 u	150 u 以下
20	5.88	8.36	6.21	3.45	31.15	7.96	37.01
40	6.21	10.28	7.41	4.61	30.53	7.31	33.65
60	6.87	7.89	5.23	3.42	38.04	7.07	31.48
80	4.96	7.01	4.60	3.90	43.40	6.12	30.01
100	5.99	7.58	5.31	3.84	40.49	6.350	30.45

表 2 不同pH下玉米肽亚铁螯合物的相对分子质量分布

Table 2 Relative molecular mass distribution of corn peptide ferrous chelate at different PH

pH 值	相对分子质量分布/%						
	10 000 u 以上	5 000~10 000 u	2 000~5 000 u	1 000~2000 u	189~1000 u	150~189 u	150 u 以下
对照	4.05	5.83	4.29	5.60	47.74	5.61	26.89
2	4.33	5.55	5.31	7.35	42.84	4.27	30.35
4	5.83	8.77	6.64	5.53	38.82	5.48	28.94
6	4.60	6.48	4.38	5.25	44.40	5.33	29.56
8	5.78	7.90	5.44	4.17	37.89	6.96	32.86
10	4.84	6.57	4.83	5.61	39.93	5.50	32.73

表 3 不同消化方式下玉米肽亚铁螯合物的相对分子质量

Table 3 Relative molecular mass distribution of corn peptide ferrous chelate at different digestion methods

消化 方式	相对分子质量分布/%						
	10 000 u 以上	5 000~10 000 u	2 000~5 000 u	1 000~2 000 u	189~1 000 u	150~189 u	150 u 以下
对照	5.71	8.11	5.88	5.05	37.01	5.53	32.71
胃蛋白酶	4.72	6.94	6.26	6.37	37.62	4.54	33.56
胰蛋白酶	7.43	9.02	5.83	3.35	35.35	6.03	33.00
先胃后胰	5.85	7.42	5.24	4.38	35.70	5.39	36.02

2.5.2 玉米肽亚铁螯合物的酸碱稳定性测定

由表 2 可以看出相对分子质量 1 000 u 以下的占比分别为 80.24%、77.46%、73.24%、79.30%、76.67%、78.15%，含量最多。和对照组相比，150 u 以下相对分子质量都显著增加。189~1 000 u 的组分都相应减少，可能是在酸性环境中，过量的 H⁺ 会与 Fe²⁺ 争夺电子基团；碱性环境中，OH⁻ 会与 Fe²⁺ 生成氢氧化物沉淀，影响螯合效果，但此时肽释放出更多的氨基和羧基，多肽又与游离亚铁离子结合形成多肽亚铁偶联物，Hu 等^[33] 也有相似的研究结果。然而 pH 趋中性时，各组分综合来看变化最小，此时螯合物最稳定。

2.5.3 玉米肽亚铁螯合物体外消化模拟稳定性影响

不同消化模式下相对分子质量分布如表 3 所示，对照及三种消化模式下相对分子质量小于 1 000 u

占比分别为 75.3%、75.71%、74.38%、77.11%，变化不明显，较稳定。三种体外模拟消化方式下，相对分子质量 150 u 以下的占比都有所提高，说明三种消化模式都把肽段分解成较短的肽段，更有利于消化吸收发挥作用。先胃蛋白酶后胰蛋白酶消化模式下 150 u 以下相对分子质量显著增多，且胃蛋白酶消化方式比胰蛋白酶消化方式含量增加稍多。说明玉米肽亚铁螯合物对胰蛋白酶耐受力强比对胃蛋白酶的耐受力强。而且由于胃环境中高浓度的 H⁺ 可能与亚铁离子竞争活性结合位点^[34]，从而导致螯合率降低，肽链又产生了断裂等反应，导致了组分的变化。从胃到肠道，pH 值的增加可以促进 Fe²⁺ 转化为到不溶性铁盐^[35,36]，导致铁溶解度显著降低，螯合物在胃肠道水解过程中可能导致一些亚铁离子从螯合物中释放出来，玉米肽会进一步分解导致各

组分的变化,这与上述对螯合物酸碱稳定性测定结果一致。

3 结论

本研究以玉米肽和氯化亚铁为原料,制备玉米肽亚铁螯合物,并对其结构特性和稳定性探究。紫外光谱表明,可能是玉米肽上的N、O原子参与螯合反应。TG热重分析显示,玉米肽和螯合物最终残留率为34.94%和18.74%。螯合物的热稳定性比肽显著增强,因为通过螯合反应使其结构更加紧密,化学键的键能增大,断裂需要更多的能量和更高的温度,结构稳定,不易被破坏。质谱分析得出两条肽段,FSAASYPDLIDALP、LQQRQQLLNPL和 Fe^{2+} 的结合能分别为-50.50 kJ/mol和-48.61 kJ/mol,提供配位点的是Asp8(天冬氨酸)的氨基,还有Pro7(脯氨酸)、Ser5(丝氨酸)、Tyr6(酪氨酸)Leu7(亮氨酸)等和亚铁离子形成了疏水作用力。肽段和亚铁离子的结合位点主要在氨基酸残基上的氨基。脂肪族氨基酸侧链也阻止了水分子的进入,增强了肽铁复合物的稳定性。在不同温度作用下,各组分变化不大,热稳定性较好和热重分析结果一致。在不同pH和不同消化方式下,可能是在酸性环境中过量的 H^+ 会与 Fe^{2+} 争夺电子基团,而碱性环境中, OH^- 会与 Fe^{2+} 生成氢氧化物沉淀,此时肽释放出更多的氨基和羧基,多肽又与游离亚铁离子结合形成多肽亚铁偶联物,所以各组分变化幅度较小,较为稳定。玉米肽亚铁螯合物性质较稳定,可作为一种补铁剂,拓展铁补充剂的来源。

参考文献

- [1] 丛万锁,王晓杰.玉米肽的生物学功能及产品开 展的研究进展[J].中国油脂,2021,46(5):82-88.
- [2] 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.
- [3] 刘温,娄乔明,杨文鸽.多肽金属元素螯合物研究进展[J].食品与发酵工业,2014,40(4):142-146.
- [4] 郑敏,王钊.螯合铁工艺的研究进展[J].现代食品,2019,22:32-34,37.
- [5] WEN J Q, YI T F, TING X, et al. Preparation of corn ACE inhibitory peptide-ferrous chelate by dual-frequency ultrasound and its structure and stability analyses [J]. Published in Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 83: 105937.
- [6] MA X M, LIU C Y, SONG W S, et al. Evaluating the efficiency of a ferrous-ion-chelating peptide from Alaska pollock frame for the improvement of iron nutritional status in rats [J]. Food & Function, 2019, 10(8): 4888-4896.
- [7] ATHIRA S, MANN B, SHARMA R, et al. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification [J]. Food Research International, 2021, 141: 110133.
- [8] 林洋,刘再胜,单春乔,等.大豆小肽螯合铁的制备工艺及光谱分析研究[J].大豆科学,2017,36(1):108-115.
- [9] 原洪,柴丽琴,王立霞,等.花椒籽肽-铁螯合物的制备及其理化性质[J].食品与发酵工业,2018,44(6):164-171.
- [10] 迺光慧,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.
- [11] WANG T T, LIN S Y, CUI P B, et al. Antarctic krill derived peptide as a nano carrier of iron through the gastrointestinal tract [J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100657.
- [12] NASSAR A Y, MELIGY F Y, ABD-ALLAH G M, et al. Oral acetylated whey peptides (AWP) as a potent antioxidant, anti-inflammatory, and chelating agent in iron-overloaded rats' spleen [J]. Journal of Functional Foods, 2023, 102: 105444.
- [13] 张新雪,卢知浩,刘家生.玉米低聚肽螯合铁(II)的制备和结构表征[J].食品工业科技,2023,44(4):243-251.
- [14] 刘文颖,张江涛,王憬,等.加工条件及体外消化对大米低聚肽结构和抗氧化活性的影响[J].中国食品学报,2022,22(7):173-182.
- [15] ICHIKAWA S, MORIFUJI M, OHARA H, et al. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate [J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2010, 61(1): 52-60.
- [16] WITT K A, DAVIS T P. CNS drug delivery: Opioid peptides and the blood-brain barrier [J]. Aaps Journal, 2006, 8(1): E76-E88.
- [17] TAN J, CHEONG H, PARK Y S, et al. Cell-penetrating peptide-mediated topical delivery of biomacromolecular drugs [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2014, 15(3): 231-239.
- [18] 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.
- [19] ZHANG H R, ZHAO L Y, SHEN Q S, et al. Preparation of cattle bone collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability [J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 144: 111264.
- [20] 胡乔迁.酶解芝麻蛋白肽及其亚铁螯合物的制备与特性[D].扬州:扬州大学,2019.
- [21] XU B F, WANG X, ZHENG Y J, et al. Millet bran glo

- bulin hydrolysate derived tetrapeptide-ferrous chelate: Preparation, structural characterization, security prediction in silico, and stability against different food processing conditions [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 165: 113673.
- [22] 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.
- [23] HOU T, LIU Y, GUO D, et al. Collagen peptides from crucian skin improve calcium bioavailability and structure characterization by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 34(13): 74-83.
- [24] 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.
- [25] 汪卓.蛋黄蛋白亚铁螯合肽的制备及螯合特性研究[D].广州:华南理工大学,2021.
- [26] 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.
- [27] 石景,邹焯,马晶晶,等.鸡血球肽螯合铁的结构表征及其稳定性研究[J].*食品工业科技*,2023,44(19):1-6.
- [28] SHU G, ZHANG B, ZHANG Q, et al. Effect of temperature, pH, enzyme to substrate ratio, substrate concentration and time on the antioxidative activity of hydrolysates from goat milk casein by alcalase [J]. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, 2016, 20(2): 29-38.
- [29] GÓMEZ L J, GÓMEZ N A, ZAPATA J E, et al. Optimization of the red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysis for obtaining iron-binding peptides and evaluation of *in vitro* iron bioavailability [J]. *Foods*, 2020, 9(7): 883.
- [30] 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.
- [31] 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(3): 111796.
- [32] TAM D L V, KHOA T P, VIET M V L, et al. Evaluation of iron-binding capacity, amino acid composition, functional properties of *Acetes japonicus* proteolysate and identification of iron-binding peptides [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 91: 374-386.
- [33] HU G H, WANG D B, SU L N, et al. Calcium-binding capacity of peptides obtained from sheep bone and structural characterization and stability of the peptide-calcium chelate [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022, 16: 4934-4946.
- [34] 王雪琦.羊骨胶原肽-钙螯合物的酶解-发酵法制备及其结构表征和相关性质分析[D].兰州:甘肃农业大学,2020.
- [35] WANG Y H, CAI M, ZENG H, et al. Preparation, characterization and iron absorption by Caco-2 cells of the casein peptides-iron chelate [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2009, 57(11): 5014-5019.
- [36] MANN A S B, POTHURAJU R S R, BAJAJ R K, et al. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification [J]. *Food Research International*, 2021, 141: 110-133.