

酪蛋白肽锌螯合物的制备及体外消化分析

周桂成, 肖珊, 王波, 王际辉

Preparation and *in Vitro* Digestive Analysis of Casein-Derived Peptide-Zinc Chelates

ZHOU Guicheng, XIAO Shan, WANG Bo, and WANG Jihui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020002>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

鸡胚肽锌螯合物的制备工艺及免疫调节功能研究

Preparation of Chicken Embryo Peptide Zinc Chelate and Its Immunoregulatory Function

食品工业科技. 2020, 41(12): 126-132 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.020>

柑橘黄烷酮对 β -胡萝卜素胶束化的影响

Effect of Citrus Flavanones on β -Carotene Micellization

食品工业科技. 2018, 39(23): 31-36 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.006>

真空微波干燥中微波强度对胡萝卜和南瓜中类胡萝卜素生物利用率的影响

Effects of Microwave Intensity on Carotenoid Bioavailability in Carrot and Pumpkin during Microwave Vacuum Drying

食品工业科技. 2021, 42(13): 74-79 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090305>

牡蛎肽-锌纳米粒的形成及稳定作用力

Formation and stabilized force of oyster peptide-zinc nanoparticles

食品工业科技. 2017(23): 74-78 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.016>

脱盐咸鸭蛋清肽-亚铁螯合物的制备及表征

Preparation and characterization of desalted duck egg white peptide-ferrous chelate

食品工业科技. 2017(16): 172-177 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.032>

大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征

Preparation Process Optimization of Soy Peptides-Zinc Chelate and Its Structural Characterization

食品工业科技. 2020, 41(14): 160-165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.026>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周桂成, 肖珊, 王波, 等. 酪蛋白肽锌螯合物的制备及体外消化分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 270-279. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020002

ZHOU Guicheng, XIAO Shan, WANG Bo, et al. Preparation and *in Vitro* Digestive Analysis of Casein-Derived Peptide-Zinc Chelates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 270-279. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020002

· 分析检测 ·

酪蛋白肽锌螯合物的制备及体外消化分析

周桂成^{1,2}, 肖珊², 王波^{2,*}, 王际辉^{2,*}

(1.大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034;

2.东莞理工学院生命健康技术学院, 广东东莞 523808)

摘要:为开发安全高效且易吸收的补锌剂, 利用碱性蛋白酶酶解和乳酸菌发酵相结合的方法制备生物活性肽, 并以此多肽制备了酪蛋白肽锌螯合物。采用光谱法对螯合物结构进行表征, 利用体外消化模型和 Caco-2 细胞实验对其胃肠消化特性及生物安全性进行评价。结果表明, 制备酪蛋白肽的最优条件为酶解 pH 为 9、碱性蛋白酶添加量为 0.3% (w/v), 乳酸菌发酵时间为 12 h, 此时反应体系中多肽含量为 142.39±0.95 mg/g, 对锌的螯合率为 31.41%±0.97%。与锌螯合后, 酪蛋白肽表面的致密结构遭到破坏, 形成疏松的状态; 光谱学分析表明, Zn²⁺能与酪蛋白肽上的活性基团进行结合, 螯合位点为羧基氧、羟基氧和氨基。体外模拟消化结果显示, 酪蛋白肽锌螯合物在消化过程中锌溶解性优于硫酸锌; 在胃肠消化后酪蛋白肽锌螯合物 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除能力分别提升了 26.19%±3.30% 和 71.96%±7.06%, 而铁还原力下降了 36.26%±2.80%; 同时, 在消化过程中肽锌螯合物的 β -转角与无规则卷曲含量减少, β -折叠结构增加, Zn²⁺起到了维持多肽结构的作用。细胞实验表明, 当浓度大于 0.4 mg/mL 时, 肽锌螯合物胃肠道消化物对 Caco-2 细胞表现出一定的细胞毒性。最后, 利用质谱技术分别从酪蛋白水解物和肽锌螯合物中鉴定出 15 条和 13 条乳源多肽。研究结果可以为高效安全的酪蛋白肽锌补充剂的制备和应用提供科学依据。

关键词:酪蛋白肽, 肽锌螯合物, 发酵优化, 体外消化, 生物利用率

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0270-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020002



本文网刊:

Preparation and *in Vitro* Digestive Analysis of Casein-Derived Peptide-Zinc Chelates

ZHOU Guicheng^{1,2}, XIAO Shan², WANG Bo^{2,*}, WANG Jihui^{2,*}

(1.School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2.School of Life and Health Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

Abstract: In this study, casein peptides were obtained by alcalase hydrolyzation and *Lactobacillus* fermentation to prepare the casein peptide-zinc chelates, which are a kind of efficient and well-absorbed zinc supplement. The structure of casein peptide-zinc chelates was characterized by spectroscopic instruments. The digestive stability and safety were also assayed using *in vitro* digestive model and Caco-2 cell experiment. The results indicated that the optimal conditions for preparing casein peptides were as follows: Volume of alcalase was 0.3% (w/v), pH of reaction system was 9.0, *Lactobacillus* fermentation time was 12 h. Under this condition, the peptide content was 142.39±0.95 mg/g, and the zinc chelation rate was 31.41%±0.97%. The chelation with zinc destroyed the structure of casein peptides leading to a loose surface structure. Spectroscopic analysis showed that Zn²⁺ can bind to the reactive groups on casein peptides, with the chelating sites being

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2020A1515110211); 广东省普通高校特色创新项目 (2021KTSCX132); 东莞理工学院高层次人才 (创新团队) 科研启动项目 (KCYCXPT2017007); 广东省创新强校创新团队项目 (2021KCXTD035)。

作者简介: 周桂成 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 755136932@qq.com。

* 通信作者: 王波 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物活性肽的消化、吸收、代谢以及构效关系, E-mail: bwang@dgut.edu.cn。

王际辉 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性产物与微生态制剂研发及应用, E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn。

carboxyl oxygen, hydroxyl oxygen and amino groups. The results of *in vitro* digestion showed that casein peptide-zinc chelates possessed better solubility than that of zinc sulfate. After gastrointestinal digestion, the DPPH and ABTS⁺ scavenging ability of casein peptide-zinc chelates increased by 26.19%±3.30% and 71.96%±7.06%, respectively. However, the ferric ion reducing power of the casein peptide-zinc chelates decreased by 36.26%±2.80%. At the same time, the β -turn and random coil content of the casein peptide-zinc chelate decreases during digestion, the β -sheet structure increases and Zn²⁺ play a role in maintaining the peptide structure. Furthermore, the cytotoxicity test indicated that casein peptide-zinc chelates gastrointestinal digest were toxic to Caco-2 cells when the concentration exceeded 0.4 mg/mL. Finally, 15 and 13 dairy-derived peptides were identified from casein hydrolysate and casein peptide-zinc chelates, respectively, using mass spectrometry. These results will provide scientific evidence for the development and application of efficient casein peptide-zinc chelates.

Key words: casein peptide; peptide-zinc chelate; fermentation optimization; *in vitro* digestion; bioavailability

锌在人体内起着维持机体免疫功能和正常生长发育的作用,同时也是 1000 多种蛋白质结构和功能调节的辅因子^[1]。由于人体内没有有效且可靠的锌存储位点,摄入足够的锌是维持体内锌平衡的关键^[2]。机体获取锌的途径主要包括日常饮食摄入和口服锌补充剂两种形式。然而,膳食锌在人体的吸收效率较低,食物基质中的成分,例如植酸、多酚、皂苷和纤维素等在胃肠中与锌发生结合会形成难溶的复合物^[3],阻碍锌的吸收和利用。同时,食物中的矿物质,如铁、钙、铜离子会竞争部分非特定金属离子转运体和载体蛋白,抑制机体对锌的吸收。因此,开发高效补锌剂对改善人体锌营养状况具有现实意义。目前,补锌剂主要分为无机锌盐、有机弱酸锌、氨基酸锌和以肽作为配体的补锌剂等四类。然而在实际应用中,无机盐补锌剂会改变食物的理化和感官性质,引起人体胃肠道不适^[4];有机弱酸锌制备工艺复杂、且易与其他营养素发生拮抗,不宜长期摄入^[5];氨基酸锌具有良好的稳定性,但其锌含量较低,较难满足机体日常需要。目前,以肽作为配体的补锌剂因其安全可靠、锌利用率高等优点,具有成为高效可靠补锌剂的潜力^[6]。

酪蛋白是乳中含量最高的蛋白质,同时也是生物活性多肽的重要来源^[7-8]。酪蛋白肽能够与矿物质结合,促进微量元素在人体中的高效吸收。近年来,许多学者利用不同的食源性生物活性肽,如蛋清肽^[9]、牡蛎肽^[10]、南瓜种子肽^[11]等,制备出稳定可溶的肽锌螯合物。然而,肽锌螯合物在人体内的消化和吸收是一个复杂的过程,不同的肽锌螯合物之间由于分子量^[12]、电荷性质^[13]、疏水性^[11]、氨基酸组成等差异,其稳定性和生物利用率也不同。需要对更多来源的多肽进行开发,寻找更安全、高效和稳定的锌配体,满足人们日常对锌的需要。

实验室前期研究发现,利用碱性蛋白酶水解酪蛋白得到的多肽具备一定的锌螯合能力,但是其肽锌螯合物的胃肠消化稳定性较低。在此基础上,利用乳酸菌发酵对酶解法进行进一步补充^[14],制备了更多潜在的、具备优异锌螯合特性和消化稳定性的多肽。本研究利用酪蛋白为原料,通过碱性蛋白酶酶解与乳酸菌发酵结合的方式获得具有高效锌螯合能力的多

肽,与七水合硫酸锌反应制备肽锌螯合物,并对其结构进行表征;通过模拟体外消化,探讨酪蛋白肽锌螯合物在消化过程中的锌溶解性和抗氧化性的变化,对胃肠消化产物进行圆二色谱测定,分析肽锌螯合物在消化过程中的二级结构变化。为推动酪蛋白肽的利用与酪蛋白肽锌螯合物的开发提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

MRS 肉汤培养基 广东环凯微生物科技有限公司;酪蛋白 生物试剂级、七水合硫酸锌 分析纯,上海源叶生物科技有限公司;碱性蛋白酶(1:200000) 北京索莱宝生物科技有限公司;4-(2-pyridylazo) resorcinol(PAR)、HEPES-KOH 缓冲液(pH7.9)、硼酸钠、十二烷基硫酸钠、邻苯二甲醛、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH)、谷胱甘肽(GSH)、4,4'-二(1H-1,2,4-三唑-1-基)-1,1'-联苯(TPTZ) 均为分析纯,上海阿拉丁公司;胃蛋白酶 P7000、胰液素 P1750 美国 Sigma 公司;血锌浓度试剂盒 南京建成科技有限公司;邻苯二甲醛、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 分析纯,上海麦克林生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯;所有实验用水均为去离子水;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LPA 和 LPB 是实验室先前从西兰花中筛选得到的两株具有高发酵能力的乳酸菌;Caco-2 细胞 中国科学院。

Chiracan V100 圆二色光谱仪 英国 Applied Photophysics 公司; Nicolet IS50 显微红外光谱系统、Easy-nano 1200 色谱仪器、Q Exactive Plus 质谱仪器、EVOLUTION 220 紫外可见光谱仪 美国 Thermo 公司; F7100 荧光光谱仪 日本日立公司; Spark 多功能微孔板检测仪 瑞士 Tecan 公司; EM-30 Plus 超高分辨率扫描电镜 韩国 Coxem 公司; ZS90 马尔文纳米激光粒度仪 英国马尔文帕纳科公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养及锌螯合肽的制备 植物乳酸菌 LPA 和 LPB 在 MRS 培养基上 37 °C 连续培养(3代×24 h)。6000×g 下离心 5 min,使菌种悬浮在无菌盐水(0.9%)中。在 20 mL 酪蛋白培养基(5%, w/v)中

加入 0.15% 的碱性蛋白酶, 酶解 2 h, 调节 pH 至 6.5, 按 3% 的接种量(v/v)加入植物乳酸菌, 在 37 °C 条件下发酵 12 h。然后, 对不同的发酵条件进行优化, 固定发酵条件为酶解 pH7、碱性蛋白酶添加量 0.15%, 以不同发酵时间(6、8、10、12、14、16 h)分别进行酶解与发酵; 固定发酵条件为酶解 pH 为 7、发酵时间为 12 h 以不同碱性蛋白酶添加量(0、0.15%、0.30%、0.45%、0.60%、0.75%)分别进行酶解与发酵; 固定发酵条件为发酵时间为 12 h、0.30% 碱性蛋白酶添加量, 以不同初始的酶解 pH(5、6、7、8、9、10)分别进行酶解与发酵。发酵产物用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.6, 在 6000×g, 4 °C 条件下离心 10 min, 取上清液, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 离心收集上清液冷冻干燥并储存在 -80 °C 中备用。

1.2.2 锌螯合能力测定 根据 Zhu 等^[15]的方法, 将 1.2.1 中得到的发酵产物在 40 mmol/L HEPES-KOH 缓冲液(pH7.5)中重新溶解, 与 ZnSO₄·7H₂O (250 μmol/L)以 49:1 的比例充分混合, 在 37 °C 水浴中反应 10 min。然后加入 200 μL 2 mmol/L 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR), 以 HEPES-KOH 缓冲液为空白, 在波长 500 nm 下测定吸光值。锌螯合率计算公式为:

$$\text{锌螯合率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品吸光值}}{\text{空白组吸光值}}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 多肽含量的测定 多肽含量的测定参考 Spellman 等^[16]的方法, 将 100 mL 硼酸钠(0.1 mol/L)和 10 mL 20%(w/v)十二烷基硫酸钠混合均匀, 搅拌至沉淀消失。取 160 mg 邻苯二甲醛溶于 4 mL 乙醇, 转移到上述溶液中。加入 400 μL 巯基乙醇, 用去离子水定容至 200 mL。取 200 μL 1.2.1 中得到的发酵产物与 3 mL 邻苯二甲醛工作液充分混匀, 室温下避光孵育 2 min, 测量 340 nm 处的吸光值。取不同浓度的 DL-丝氨酸绘制标准曲线, 样品结果以每克样品的丝氨酸毫克当量表示。

1.2.4 肽锌螯合物的制备 10 mL 酪蛋白肽(10 mg/mL)与硫酸锌(锌螯合肽:硫酸锌质量比为 1:1)混合, 将反应混合物的 pH 调节至 6.0, 50 °C 条件下反应 1 h, 随后将混合物转移到冰水浴中迅速冷却, 加入无水乙醇(1:4, v/v)并静置, 在 8000 r/min 条件下离心 10 min, 收集沉淀冷冻干燥得到肽锌螯合物。

1.2.5 扫描电镜 取一定量的酪蛋白肽及肽锌螯合物粉末于感电胶上, 进行喷金处理后, 利用 COXEM 扫描电镜进行观察, 其中, 加速电压为 3 kV, 放大倍数为: ×1.0 k。

1.2.6 红外光谱 使用 Nicolet IS50 显微红外光谱系统, 在 4000~675 cm⁻¹ 范围内对酪蛋白肽及肽锌螯合物冻干粉进行扫描, 选择模式为透射模式, 采用冷却后检测器进行检测。

1.2.7 Zeta 电位测定 将酪蛋白肽和肽锌螯合物溶

于去离子水, 配制成 1 mg/mL 溶液, 平衡 120 s, 采用马尔文激光粒度仪测定 Zeta 电位。

1.2.8 荧光光谱 使用日立公司的 F-7100 荧光分光光度计, 对酪蛋白肽螯合锌离子后的荧光特性进行分析。在酪蛋白肽溶液(5 mg/mL)中加入不同浓度(1、2、4、6、8 和 10 mmol/L)的硫酸锌溶液反应 30 min。采用扫描模式, 在激发波长为 280 nm 和发射波长为 300~500 nm 的条件下进行扫描。

1.2.9 抗氧化性测定

1.2.9.1 DPPH 自由基清除率 根据文献 [17] 报道的方法, 取一定量酪蛋白肽及肽锌螯合物溶于去离子水, 配制成不同浓度溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL), 取 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液与样品溶液充分混合, 于 517 nm 处测吸光值。以还原型谷胱甘肽作为阳性对照。取 2 mL 95% 乙醇和 2 mL 样品混合反应作为对照组, 取 2 mL 95% 乙醇样品和 2 mL DPPH 溶液混合反应作为空白组, 对 DPPH 自由基的清除率用以下公式计算:

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除率}(\%) \\ = \left(1 - \frac{\text{样品组吸光值} - \text{对照组吸光值}}{\text{空白组吸光值}}\right) \times 100 \end{aligned} \quad \text{式(2)}$$

1.2.9.2 ABTS⁺自由基清除率 根据文献 [18] 报道的方法, 将 ABTS 溶液(7 mmol/L)和过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)混合, 在室温避光放置 16 h, 得到 ABTS 母液。随后对 ABTS 母液稀释, 使其在 734 nm 处的吸光值为 0.70±0.02。将 0.5 mL 不同浓度(0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mg/mL)的样品溶液和 3 mL 的 ABTS 稀释液混合, 在室温避光反应 5 min。然后测量 734 nm 处的吸光值。以还原型谷胱甘肽作为阳性对照, 空白组用去离子水代替样品。ABTS⁺自由基清除率计算如下:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品组吸光值}}{\text{空白组吸光值}}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.9.3 铁还原力的测定 根据文献 [19] 报道的方法, 将 30 mL TPTZ 溶液(10 mmol/L)与 30 mL FeCl₃ 溶液(20 mmol/L)充分混合, 加入 300 mL 醋酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH3.6)进行稀释得到 TPTZ 工作液。将 100 μL 不同浓度样品溶液(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)与 3 mL TPTZ 工作液在 37 °C 下混合 30 min, 在 593 nm 处测量吸光值。以不同浓度 Trolox 标准品制作标准曲线, 以还原型谷胱甘肽作为阳性对照, 结果表示为 Trolox 当量(mmol Trolox/L)。

1.2.10 模拟胃肠道消化 将肽锌螯合物、硫酸锌分别溶解于去离子水(1 mg/mL)中, 调节 pH 至 2.0, 37 °C 孵育 5 min 后, 按 1:35(w/w)的酶底物比加入胃蛋白酶(≥250 units/mg solid)消化 2 h。胃消化完成后, 用饱和 NaHCO₃ 调 pH 至 6.8, 1:25(w/w)加入

胰酶(4×USP), 继续用 1 mol/L NaOH 调节至 pH7.5 后消化 2 h。分别在体外消化 0、15、30、60、120、135、150、180 和 240 min 时取一定量样品, 沸水浴 10 min 灭酶后进行测试。抗氧化活性的测定按照 1.2.9 的方法进行。根据 Xie 等^[20]的方法计算抗氧化活性残留率, 抗氧化活性残留率表示为:

$$\text{抗氧化活性残留率(\%)} = \frac{\text{消化样品抗氧化能力}}{\text{样品初始抗氧化能力}} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

1.2.11 锌溶解度测定 取等量不同消化时间的胃肠道消化液在 8000×g 下离心 10 min。收集上清液, 根据血锌浓度试剂盒的方法测定锌含量。肽锌螯合物总锌含量测定, 取 50 mg 肽锌螯合物溶解在 6 mol/L 盐酸中, 120 °C 消化 4 h, 真空干燥除去其中的盐酸, 用去离子水定容到 5 mL, 利用血锌浓度试剂盒的方法测定锌含量。锌的溶解度计算如下:

$$\text{锌溶解率(\%)} = \left(\frac{\text{样品组锌含量}}{\text{总锌含量}} \right) \times 100 \quad \text{式(5)}$$

1.2.12 圆二色光谱 酪蛋白肽及肽锌螯合物溶于去离子水(0.25 mg/mL)中, 然后用圆二色谱仪(CD)在 190~260 nm 之间进行扫描, 使用以下仪器参数: 带宽 1.0 nm, 扫描速度 100 nm/min。每个获取的光谱代表平均三次连续扫描。采用 CDNN 软件进行二级结构分析。

1.2.13 细胞毒性实验 根据文献^[21]报道的方法, 取 1.2.10 中的消化样品溶于含 10% 血清的 DMEM 培养基中。待 Caco-2 细胞融合度达到约 80% 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 Caco-2 细胞两次后利用胰酶进行消化得到细胞悬液。将细胞以 2.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 在 37 °C 二氧化碳培养箱中孵育 24 h 后弃去培养基, 每孔分别加入 200 μL 不同浓度酪蛋白肽和肽锌螯合物胃肠消化产物(0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 和 0.50 mg/mL), 每个样品设置 6 个平行孔。继续孵育 24 h 后弃去样品, 每孔加入 100 μL 5 mg/mL MTT。孵育 4 h 后弃去 MTT, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜, 细胞培养板低速摇动 10 min。用酶标仪在 570 nm 处测定吸光值。以含培养基而不含细胞组作为空白组, 以等量含 10% 血清的 DMEM 培养基代替样品组作为对照组, 细胞存活率计算如下:

$$\begin{aligned} \text{细胞存活率(\%)} \\ = \left(1 - \frac{\text{样品组吸光值} - \text{空白组吸光值}}{\text{对照组吸光值} - \text{空白组吸光值}} \right) \times 100 \end{aligned} \quad \text{式(6)}$$

1.2.14 液相色谱串联质谱分析

1.2.14.1 样品准备 将 1.2.4 中得到的酪蛋白肽与肽锌螯合物以 1 mg/mL 浓度在去离子水中溶解并进行质谱检测。

1.2.14.2 液相色谱条件 分离柱: 75 μm×200 mm (C₁₈, 1.9 μm 粒径, 120 Å 孔径); 色谱分离时间: 60 min, A: 0.1% 甲酸水溶液, B: 80% 乙腈; 流速: 200 nL/min,

梯度洗脱梯度: 在 0~45 min 内, B: 3%~32%; 在 45~55 min 内, B: 32%~100%; 在 55~60 min 内, B: 100%~100%。

1.2.14.3 质谱条件 扫描范围 200~2000 Da; 分辨率 70000; 最大离子注入时间 100 ms; MS/MS 离子注入时间 75 ms。

1.2.14.4 数据分析 使用 ProteinDiscovery 2.4.0(美国 Thermo Scientific 公司)进行数据分析。基于 Uni-Prot 数据库, 得到准确的多肽分子量和氨基酸序列。

1.3 数据处理

每组实验数据至少测定三次, 计算平均值和误差值, 并采用 SPSS 26.0 软件进行显著性分析, 用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 发酵条件的优化

利用实验室筛选的两株具有高发酵能力的植物乳杆菌对酪蛋白进行发酵, 结果如图 1 所示, 通过碱性蛋白酶预处理与植物乳杆菌发酵相结合的方式获取的酪蛋白肽对锌离子的螯合率分别为 17.63%±0.83% 和 15.17%±0.81%, 均高于其单菌发酵组(12.07%±0.53% 和 13.63%±0.13%) 或单酶处理组(8.69%±0.53%)。碱性蛋白酶与植物乳杆菌 LPA 共同作用制备的酪蛋白肽具有更优的锌螯合能力。在植物乳杆菌的作用下, 酪蛋白更容易被水解释放出大量的生物活性肽^[22]; 利用碱性蛋白酶预酶解, 有利于缩短发酵的过程^[23], 减少发酵过程中被污染的可能性。因此, 选择碱性蛋白酶与植物乳杆菌 LPA 的发酵组合对后续发酵条件进行优化。

如图 1B 所示, 随着发酵时间的增加, 酪蛋白肽对锌的螯合率下降。发酵初始阶段, 酪蛋白肽水解程度较低, 较长的肽段可能更有利于锌离子的结合。在 8~12 h 阶段酪蛋白肽的多肽含量和锌螯合能力逐渐增加, 在 12 h 时酪蛋白肽的锌螯合能力达到最高, 为 18.36%±0.55%。在这一阶段, 多肽在微生物作用下释放出更多能结合 Zn²⁺ 的活性基团。随着水解程度的增加, 部分锌螯合位点被破坏, 水解产物的锌螯合率逐渐降低^[24]。对不同酶添加量下酪蛋白发酵产物进行分析, 酶处理组多肽含量与锌螯合率均高于无酶组, 酶的加入促进了锌螯合多肽的形成。在碱性蛋白酶的作用下, 酪蛋白肽部分关键位点被暴露出来, 无酶组中难以利用的部分变得可以利用^[25]。在酶加入量为 0.3% 时, 酪蛋白肽锌螯合率达到最高(25.16%±1.74%)。对不同酶解初始 pH 下酪蛋白发酵产物进行分析, 在酶解初始 pH 为 9 时, 酪蛋白肽具有最高的锌螯合能力 31.41%±0.97%。碱性条件有利于酪蛋

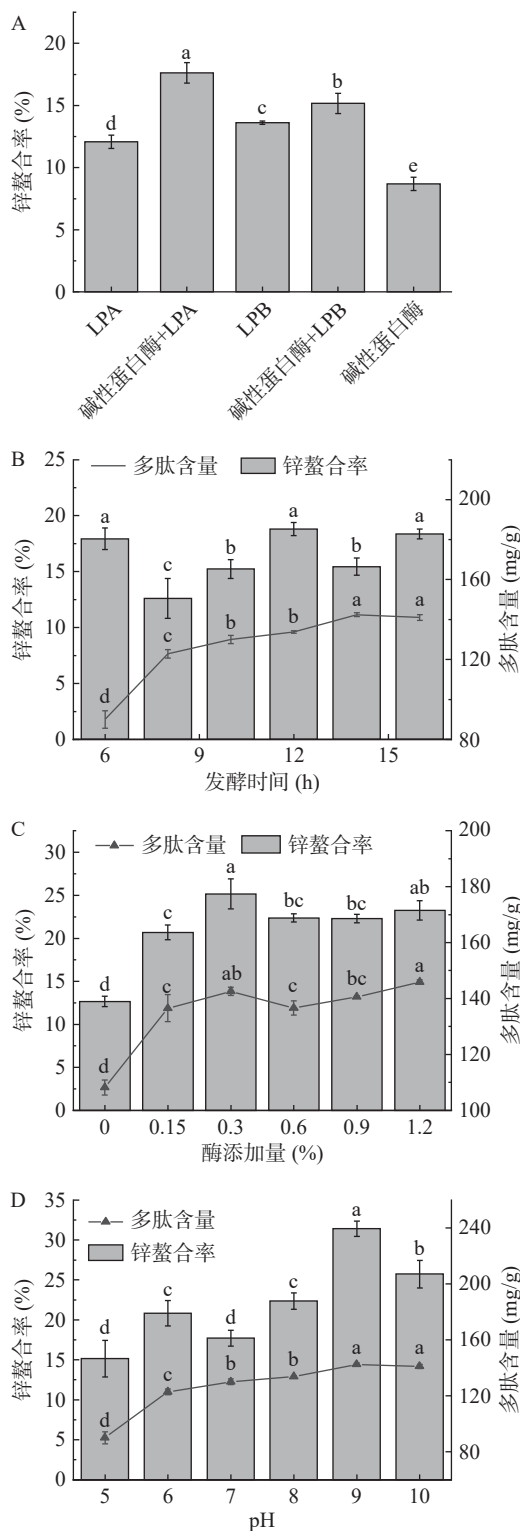


图 1 不同制备条件对酪蛋白肽锌螯合率及多肽含量的影响

Fig.1 Effect of different preparation conditions on zinc chelation rate and peptide content of casein peptides

注: A: 不同发酵组合酪蛋白肽的锌螯合率; B: 不同发酵时间酪蛋白肽的锌螯合率和多肽含量; C: 不同酶添加量酪蛋白肽的锌螯合率和多肽含量; D: 不同初始 pH 酪蛋白肽的锌螯合率和多肽含量; 图中不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$, 图 6、图 9 同。

白的酶解并为后续发酵阶段提供更多的水解产物^[26], 提高乳酸菌对酪蛋白的利用率。根据上述实验, 确定最优的发酵组合为乳酸杆菌 A 与碱性蛋白酶共同发

酵, 最佳的发酵条件为酶解 pH9、碱性蛋白酶添加量为 0.3% (w/v)、乳酸菌发酵时间为 12 h 并以此作为后续制备酪蛋白肽的发酵条件。

2.2 肽锌螯合物结构表征

2.2.1 扫描电子显微镜 扫描电子显微镜 (SEM) 是观察多肽形貌特征的有效工具。图 2A 和图 2B 分别显示了酪蛋白肽和酪蛋白肽锌螯合物的表面形态。酪蛋白肽显示出表面光滑的片状, 与锌螯合后呈粗糙疏松颗粒状结构, 与 Zhang 等^[27] 观察到的现象相似。肽锌螯合物在形成过程中, 微观结构发生了变化, 锌的存在破坏了多肽表面原本致密的结构, 酪蛋白肽的空间构象发生改变并重新排列^[11], 形成更疏松的结构。同时, 多肽氨基酸残基上部分亲水基团被 Zn^{2+} 屏蔽^[28], 使多肽趋向于聚集状态。因此, 锌离子的螯合显著改变了酪蛋白肽的微观结构。

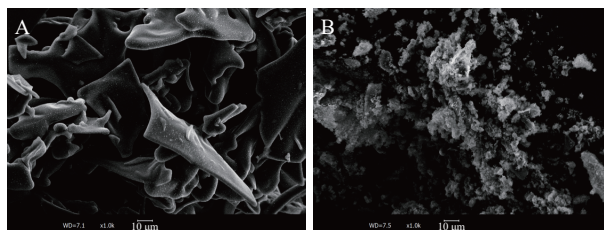


图 2 酪蛋白肽和肽锌螯合物 SEM 图 ($\times 1.0 k$)

Fig.2 SEM images of casein peptide and peptide-zinc chelate ($\times 1.0 k$)

注: A: 酪蛋白肽; B: 肽锌螯合物。

2.2.2 傅里叶变换红外光谱 酪蛋白肽在 1400.66、1556.00、1648.41、2954.03 和 3284.54 cm^{-1} 的红外范围内出现了红外峰, 分别对应于蛋白质结构中的酰胺 III、II、I 和酰胺 B 和 A 带。如图 3 所示, Zn^{2+} 加入后, 多肽的红外光谱发生了显著变化。肽锌螯合物的 NH 带出现在 3254.50 cm^{-1} 处, 可能是 Zn^{2+} 的加入引起-NH 伸缩振动和氢键的取代^[28]。在 2939.29 cm^{-1} 处有一个肽锌螯合物- CH_2 基团的伸缩振动。在添加 Zn^{2+} 之后, 酪蛋白肽 1648.41 和 1556.00 cm^{-1} 处的峰移至较低的频率 (1641.04 和 1535.59 cm^{-1}), 表明 Zn^{2+} 与 NH 发生了结合^[29]。在 1400.66 cm^{-1} 处观察到酰胺 III 带的变化, 这是由 C-N 伸缩振动、N-

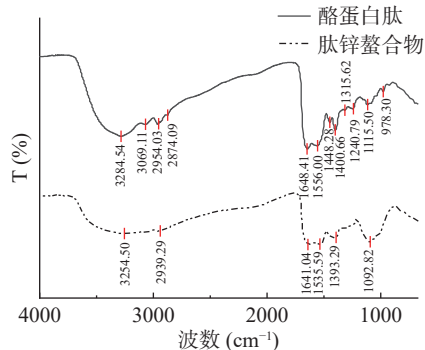


图 3 酪蛋白肽和肽锌螯合物 FTIR 图

Fig.3 FIRT diagram of casein peptide and peptide-zinc chelate

H 变形和-CH₂ 基团的振动形成的^[27,30]。肽锌螯合物在 978.30 cm⁻¹ 处的峰消失, Zn²⁺的作用可能会导致一些较弱的吸收带被屏蔽^[15]。推测酪蛋白肽主要通过多肽键上的羧基氧、羟基氧、氨基参与 Zn²⁺的配位形成多肽锌螯合物。Zn²⁺与酪蛋白肽螯合并引起多肽结构的改变。

2.2.3 Zeta 电位分析 酪蛋白肽和肽锌螯合物的 Zeta 电位如图 4 所示。Zeta 电位是反映分散体系中粒子的表面电荷状态的重要指标。酪蛋白肽的 Zeta 电位为-12.76±0.46 mV, 在与锌离子螯合后, 肽锌螯合物的 Zeta 电位为-6.84±0.67 mV, 发生了极显著变化(*P*<0.001), Zn²⁺的加入导致了酪蛋白肽 Zeta 电位值上升。

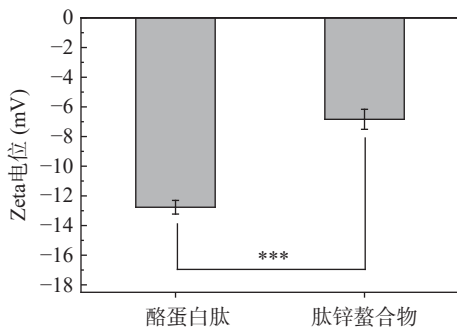


图 4 酪蛋白肽和肽锌螯合物 zeta 电位图
Fig.4 Zeta potential diagram of casein peptide and peptide-zinc chelate
注: ***表示 *P*<0.001。

2.2.4 荧光光谱分析 如图 5 所示, 当荧光激发波长为 280 nm 时, 观察到酪蛋白肽在 356 nm 处出现吸收峰, 随着 Zn²⁺浓度的增加(1、2、4、6、8、10 mmol/L), 酪蛋白肽荧光吸收峰强度逐渐降低且当 Zn²⁺浓度超过 4 mmol/L 时, 荧光猝灭幅度减弱。在引入 Zn²⁺后, 多肽的空间结构发生折叠^[31], 导致荧光强度下降。同时, 随着 Zn²⁺浓度增加, 酪蛋白肽的荧光猝灭幅度逐渐减弱。这可能是在螯合过程中, 酪蛋白肽对 Zn²⁺的螯合逐渐达到饱和^[32], 酪蛋白肽的结构变化减缓。因此, Zn²⁺能与酪蛋白肽上的活性基团进行结合并形成可溶性肽锌螯合物。同时, 酪蛋白肽的 Zn²⁺结合位点是有限的。

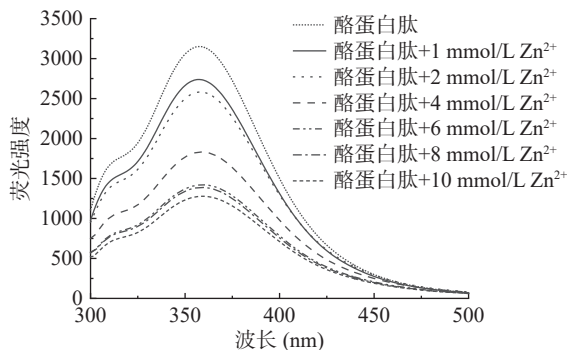


图 5 不同浓度的 Zn²⁺肽锌螯合物的荧光光谱图

Fig.5 Fluorescence spectra of peptide-zinc chelate at different concentrations of Zn²⁺

2.2.5 肽锌螯合物体外抗氧化性 多肽的金属结合活性与抗氧化能力相关^[33], 与金属离子结合后, 多肽的抗氧化活性降低。本研究通过测定 DPPH 的自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力和铁离子还原能力, 全面系统地对比肽锌螯合物的抗氧化活性进行评价。如图 6A 所示, 酪蛋白肽对 DPPH 自由基的清除能力表现出明显的剂量效应, 在浓度为 2.5 mg/mL 时增加到 69.51%±0.82%。同一浓度下肽锌螯合物的 DPPH 自由基的清除能力为 45.55%±0.66%。在与锌螯合后, 酪蛋白肽仍然保留着一定的抗氧化能力。

同时, 酪蛋白肽和肽锌螯合物都显示出 ABTS⁺自由基清除能力。如图 6B 所示, 在 0.02~0.10 mg/mL 浓度范围内随着浓度的增加, 酪蛋白肽和肽锌螯合物的 ABTS⁺自由基清除能力逐渐提高, 且在 0.10 mg/mL 时酪蛋白肽对 ABTS⁺自由基清除能力达到 57.90%±0.78%, 肽锌螯合物对 ABTS⁺自由基清除能力则为

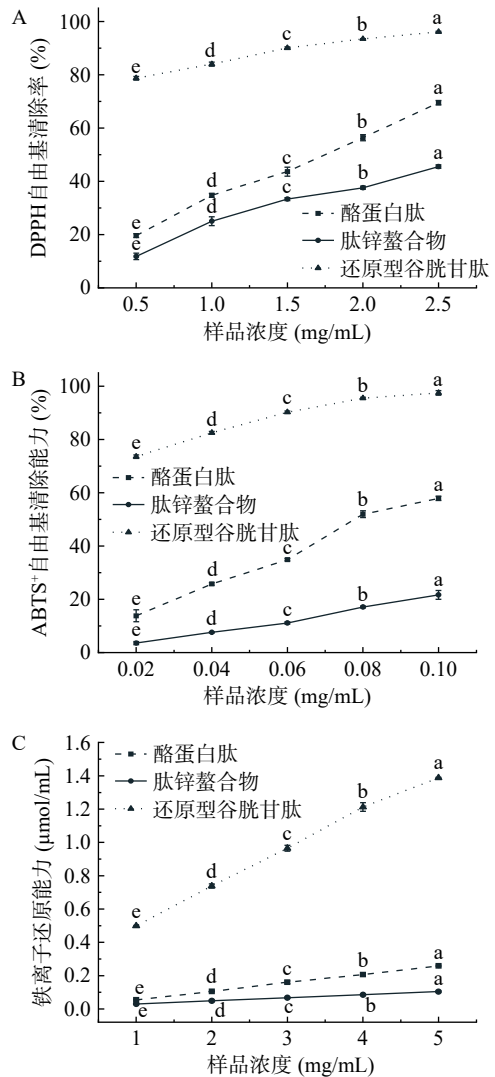


图 6 酪蛋白肽和肽锌螯合物抗氧化性测定

Fig.6 Determination of antioxidant properties of casein peptide and peptide-zinc chelate

注: A: 酪蛋白肽和肽锌螯合物 DPPH 自由基清除率的测定; B: 酪蛋白肽和肽锌螯合物 ABTS⁺自由基清除率的测定; C: 酪蛋白肽和肽锌螯合物铁还原力的测定。

21.68%±1.64%。对其铁离子还原能力进行对比,在浓度为 5 mg/mL 时,酪蛋白肽和肽锌螯合物的铁离子还原能力分别为 0.256±0.003 μmol Trolox/mL 和 0.10±0.005 μmol Trolox/mL。相同浓度条件下,酪蛋白肽具有更好的抗氧化活性,锌的加入导致多肽发生聚集,在一定程度上阻碍了多肽的活性部位,肽锌螯合物的抗氧化活性降低。

2.3 肽锌螯合物体外模拟消化

对体外模拟消化过程中肽锌螯合物锌的溶解度及其抗氧化活性残留率进行研究。结果如图 7 所示。在胃消化阶段,肽锌螯合物与硫酸锌的溶解度都在 85% 以上。进入肠道消化阶段后,两者溶解度出现了极显著($P<0.001$)差异,硫酸锌的溶解度下降至 2.67%±1.50%,这可能是肠消化阶段偏弱碱性的 pH 环境导致 Zn^{2+} 解离并形成沉淀^[34]。而肽锌螯合物锌溶解度在 120 min 时仍然在 54.25%±1.20%,并随着消化的进行最终稳定在 43.06%±2.15%。对于肠吸收而言,大多数矿物质的生物利用率主要取决于它的溶解度。以肽作为配体的锌补充剂,有利于维持锌在胃肠道消化中的溶解度^[35]。在本研究中,利用碱性蛋

白酶与植物乳杆菌 LPA 共同作用制备酪蛋白肽,其肽锌螯合物在胃肠道消化阶段具有很好的溶解性,这对于人体肠道对锌的吸收是有利的。

如图 7B 所示,在消化过程中,酪蛋白肽和肽锌螯合物的抗氧化活性逐渐增强。酪蛋白肽的 ABTS⁺ 自由基清除能力在胃消化阶段增加了 26.19%±1.68%,在肠消化阶段增加了 69.05%±6.23%; DPPH 自由基清除能力在胃消化阶段时增加 5.35%±3.58%,肠消化阶段时增加 21.34%±4.53%,而肽锌螯合物的 DPPH 自由基清除能力和 ABTS⁺ 自由基清除能力在胃消化阶段时分别增加了 11.72%±2.95% 和 39.25%±3.24%,在肠消化阶段则增加了 26.19%±3.30% 和 71.96%±7.06%。在胃蛋白酶和胰酶作用下,酪蛋白肽会进一步被水解为更小的片段,抗氧化活性也随之改变^[36]。消化过程中肽锌螯合物的抗氧化能力极显著提高($P<0.001$),这可能与肽锌螯合物结构的变化相关,胃肠消化环境有利于其抗氧化能力的重新释放。

然而,酪蛋白肽和肽锌螯合物的铁还原力在消化过程中有所下降,在胃消化阶段酪蛋白肽铁还原力抗氧化活性残留率为 82.76%±1.49%,低于肽锌螯合物的铁还原力抗氧化活性残留率(89.70%±2.69%)。在肠消化阶段,两者的铁还原力抗氧化活性残留率分别下降了 43.95%±0.59% 和 36.26%±2.80%。这可能是胃肠消化过程中部分疏水性氨基酸失去活性,导致酪蛋白肽和肽锌螯合物的铁还原力下降^[27]。

2.4 肽锌螯合物二级结构分析

对 Zn^{2+} 螯合前后多肽的圆二特性变化进行分析,研究酪蛋白肽与锌螯合过程中二级结构的变化^[37]。结果如图 8 所示,酪蛋白肽和肽锌螯合物在 198 nm 处均出现最小值。与锌螯合后,肽锌螯合物的圆二光谱峰减弱。通过 CDNN 软件对肽锌螯合物二级结构进行分析,计算出酪蛋白肽的 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规则卷曲含量分别为 5.6%、19.5%、39.9% 和 34.2%,在螯合后分别变为 5.9%、18.1%、46.3% 和 31.5%。结果表明,在 Zn^{2+} 作用下部分 β -转角与无规则卷曲转化为 β -折叠。 Zn^{2+} 的加入有利于诱导肽锌螯合物折叠结构的形成。在消化过程中,酪蛋白肽和肽锌螯合物的二级结构发生了变化。简单来说,酪蛋白肽和肽锌螯合物的 β -转角与无规则卷曲结构减少, β -转角结构在消化结束后分别降低了 2.1% 和 0.9%,这可能与 β -转角在消化过程中的降解有关^[36]。在胃消化阶段,肽锌螯合物的无规则卷曲结构减少,无规则卷曲的变化幅度(1.1%)小于酪蛋白肽无规则卷曲的幅度(2.7%),酪蛋白肽和肽锌螯合物的 β -折叠的含量分别增加到 46.4% 和 49.2%。受胃消化环境的影响, H^+ 与 Zn^{2+} 会竞争给电子基,导致肽锌螯合物中的锌发生部分解离^[37],然而本研究中多肽有序的结构却被保留了下来。在肠道消化阶段, β -折叠结构含量增加,说明消化过程中肽锌螯合物结构变得更加致密有序。与酪蛋白肽相比,肽锌螯合物在胃肠道消

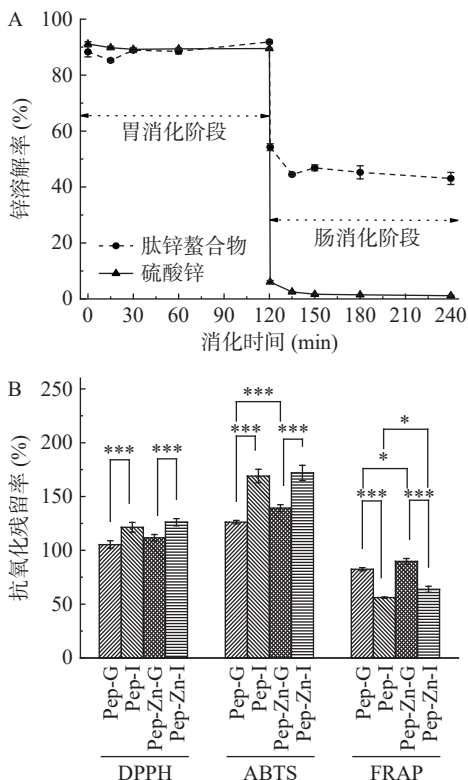


图 7 消化过程中肽锌螯合物和硫酸锌中锌离子溶解率(A)和酪蛋白肽锌螯合物抗氧化活性残留率(B)

Fig.7 Rate of zinc dissolution of peptide-zinc chelate and zinc sulfate during digestion (A) and remaining ratios of antioxidant activity of casein peptide-zinc chelate (B)

注: Pep、Pep-G、Pep-I 分别表示酪蛋白肽、胃消化后的酪蛋白肽、胃肠消化后的酪蛋白肽; Pep-Zn、Pep-Zn-G、Pep-Zn-I 分别表示肽锌螯合物、胃消化后的肽锌螯合物、胃肠消化后的肽锌螯合物; *表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$; ***表示 $P<0.001$ 。

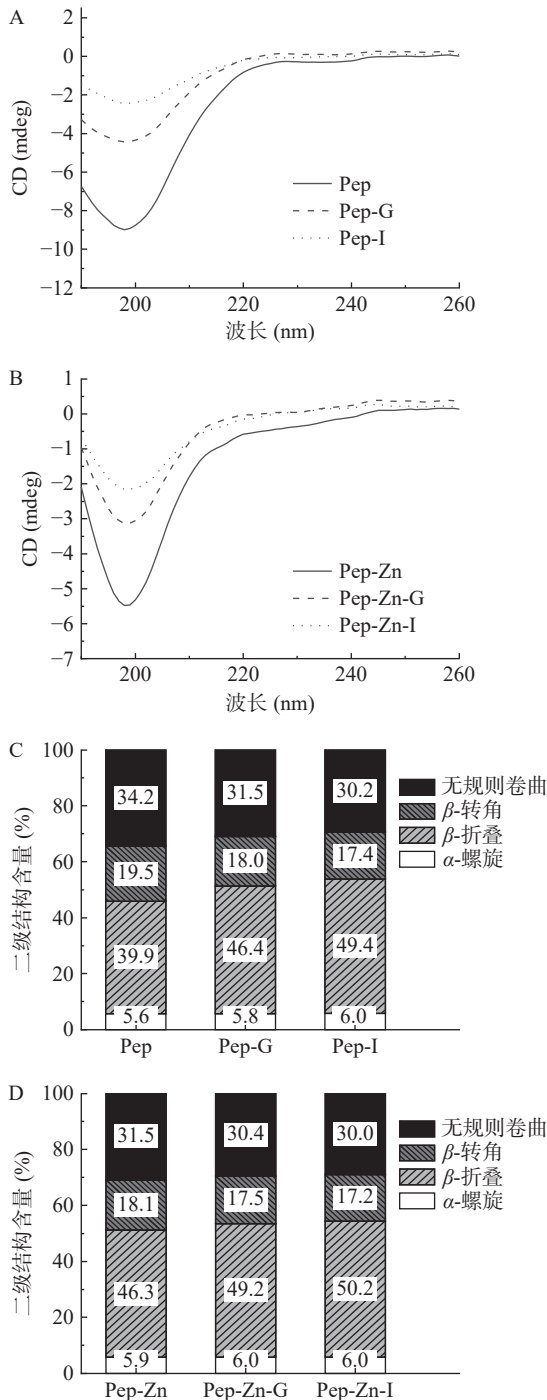


图 8 酪蛋白肽和肽锌整合物圆二色谱

Fig.8 Circular dichroism of casein peptide and peptide zinc chelate

注: Pep、Pep-G、Pep-I 分别表示酪蛋白肽、胃消化后的酪蛋白肽、胃肠消化后的酪蛋白肽; Pep-Zn、Pep-Zn-G、Pep-Zn-I 分别表示肽锌整合物、胃消化后的肽锌整合物、胃肠消化后的肽锌整合物; A: 酪蛋白肽圆二色谱图; B: 肽锌整合物圆二色谱图; C: 酪蛋白肽二级结构含量; D: 酪蛋白肽圆二色谱图二级结构含量。

化过程中的二级结构变化幅度较小, Zn²⁺ 的加入在一定程度上维持了在消化过程中多肽的二级结构。

2.5 酪蛋白肽及肽锌整合物消化产物细胞毒性实验

如图 9 所示, 在 0.05~0.50 mg/mL 范围内, 酪蛋白肽胃肠消化产物对 Caco-2 细胞的生长具有促进

作用。肽锌整合物胃肠消化产物在低浓度时对细胞有增殖活性, 在浓度为 0.05 mg/mL 时, 细胞存活率为 130.02%±3.42%; 当浓度超过 0.4 mg/mL 后, Caco-2 细胞活力降低, 在 0.5 mg/mL 时仅为 40.91%±1.05%。倒置显微镜下对 Caco-2 细胞进行观察(图 10), 当肽锌整合物胃肠消化产物达到一定浓度后, 细胞形态发生改变, 细胞数目减少。许多研究表明, 锌与细胞的凋亡相关^[38], 当外源锌环境发生改变时, 细胞氧化应激也会发生改变、生长受到抑制^[39]。

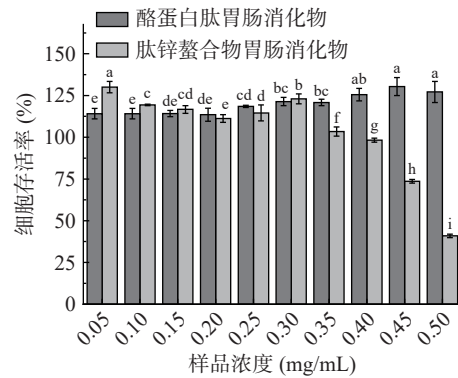


图 9 不同浓度的酪蛋白肽和肽锌整合物胃肠消化产物对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig.9 Effects of casein peptides gastrointestinal digestion and zinc-peptide chelates gastrointestinal digestion products at different concentrations on the viability of Caco-2 cells

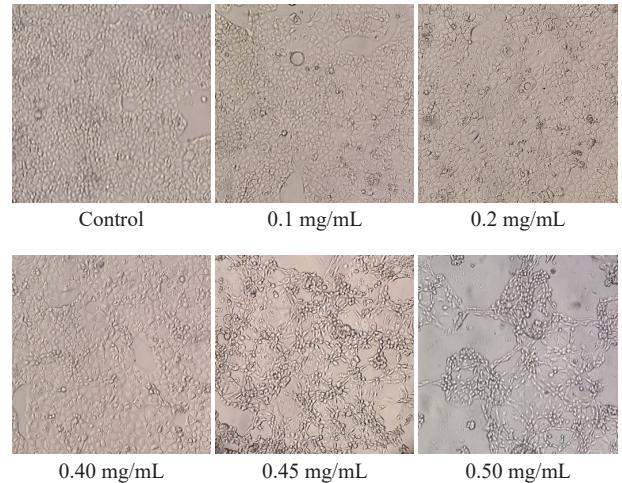


图 10 不同浓度肽锌整合物胃肠消化产物对 Caco-2 细胞的影响

Fig.10 Effects of zinc-peptide chelates gastrointestinal digestion products with different concentration on Caco-2 cells

2.6 锌整合物的鉴定

利用质谱对酪蛋白水解物和肽锌整合物进行鉴定, 鉴定出来自牛源的多肽分别为 15 种和 13 种, 氨基酸序列如表 1 所示, 鉴定得到的肽分子量均小于 3000 Da。有研究报道^[40], 低分子量肽(<3000 Da)和高分子量肽(>10000 Da)的金属螯合能力相对较高。此外, 也有研究表明, Zn²⁺ 与食源性多肽 C 端羧基、N 端氨基、羰基、酰胺键以及氨基酸 Asp、Glu、Cys 和 His 等通过共价键或静电作用进行螯合物^[41], Gln 和 Lys 是促进金属螯合的重要部位。Ser 的侧

表1 酪蛋白水解物和肽锌螯合物的多肽序列

Table 1 Sequences of peptides identified by casein hydrolysate and peptide-zinc chelates

	酪蛋白水解物	GRAVY	分子量(Da)	肽锌螯合物	GRAVY	分子量(Da)
1	DELQDKIHPF	-1.160	1241.616	DELQDKIHPF	-1.160	1241.616
2	DTDYKKYL	-1.788	1045.520	EKVNELSK	-1.387	946.5204
3	DVIGPPEPIL	0.480	1049.588	KKISQRYQKF	-1.800	1325.769
4	KKISQRYQKF	-1.800	1325.769	LQDMGSDVIPEDDEERGEL	-1.105	2146.944
5	KKYKVPQL	-1.262	1003.630	MHQPHQLPPTVMF	-0.421	1691.803
6	KMPDDSSCKLPKKSVEL	-1.168	2173.063	SDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.663	1957.954
7	LIVTQTMKGL	0.900	1103.649	SDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.663	1973.948
8	SDIPNPIGSENSEKTTMPLW	-0.830	2216.054	SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	-0.675	2144.033
9	SDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.663	1957.954	SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	-0.675	2160.028
10	SDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.663	1973.948	SEYIIKSDENVRKENKKERHGSA	-1.800	2717.397
11	SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	-0.675	2144.033	SMANRGKDTNGSQFF	-1.080	1675.749
12	SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	-0.675	2160.028	TDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.708	2576.218
13	TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPL	-0.708	2648.240	TEEEKNRLNFL	-1.473	1392.712
14	TDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPL	-0.584	2576.218			
15	TEEEKNRLNFL	-1.473	1392.712			

注: Grand average of hydropathicity (GRAVY)通过<https://web.expasy.org/protparam/>网站在线预测, 负值越大表示亲水性越强, 正值越大表示疏水性越强。

链羟基被认为在多肽锌的螯合中起着重要的作用^[42], Cys的巯基, Lys的羧基、多肽亚氨基(NH)和羰基(C=O)可以参与锌的配位^[43]。Glu残基的侧链羧基也是锌结合的重要位点^[11]。本研究鉴定的多肽序列中包含许多能对锌螯合起重要贡献的氨基酸。

另一方面, 部分氨基酸对锌的螯合能力较弱, 但是在肽锌螯合物的稳定性、溶解性和空间构象等方面具有重要作用, 需要进一步确定其对肽锌螯合物在胃肠道内的消化稳定性及经肠道吸收后肽锌螯合物生物利用率的贡献。后续工作将对鉴定出来的多肽序列进行筛选, 探究肽锌螯合物在消化过程中的稳定性和跨小肠吸收机制。

3 结论

本研究利用碱性蛋白酶对酪蛋白进行预处理, 通过乳酸菌发酵获得锌螯合多肽并与硫酸锌反应制备肽锌螯合物, 获得多肽的锌螯合率为 $31.41\% \pm 0.97\%$ 。酪蛋白肽中的羧基氧、羟基氧、氨基参与了 Zn^{2+} 的配位。在模拟胃肠消化过程中, 肽锌螯合物的抗氧化能力随消化时间延长逐渐升高, 其中锌离子溶解性优于硫酸锌。随着消化过程进行, 肽锌螯合物变得更为有序, Zn^{2+} 在一定程度上维持了酪蛋白肽的二级结构。然而, 当浓度达到 0.4 mg/mL 以上时, 肽锌螯合物会改变细胞形态, 影响细胞增殖并表现出一定的细胞毒性。研究结果为高效安全的酪蛋白肽锌补充剂的制备和应用提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] MARET W, KREL A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease[J]. *Molecular Medicine*, 2007, 13(7): 371-375.
- [2] MILLER L V, HAMBIDGE M, NAAKE V L, et al. Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: Alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake[J]. *Journal of Nutrition*, 1994, 124(2): 268-276.
- [3] FREDLUND K, ISAKSSON M, LENA R, et al. Absorption of zinc and retention of calcium; Dose-dependent inhibition by phy-

tate[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, 2006, 20(1): 49-57.

- [4] AKBAR B, NILOUFAR N, ABOLFAZL M, et al. Evaluation and comparison of zinc absorption level from 2-alkyle 3-hydroxy pyranon-zinc complexes and zinc sulfate in rat *in vivo*[J]. *Advanced Biomedical Research*, 2013, 2(1): 77.
- [5] LEE S Y, NAM S, CHOI Y, et al. Fabrication and characterizations of hot-melt extruded nanocomposites based on zinc sulfate monohydrate and soluplus[J]. *Applied Sciences*, 2017, 7(9): 902.
- [6] MIQUEL E, FARRÉ R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18: 139-143.
- [7] ADAMS C, SAWH F, GREEN-JOHNSON J M, et al. Characterization of casein-derived peptide bioactivity: Differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition, cytokine, and nitric oxide production[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 5805-5815.
- [8] YANG Y J, WANG B, LI B. Structural requirement of casein peptides for transcytosis through the caco-2 cell monolayer: Hydrophobicity and charge property affect the transport pathway and efficiency[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(42): 11778-11787.
- [9] WANG D, LIU K X, CUI P B, et al. Egg-white-derived antioxidant peptide as an efficient nanocarrier for zinc delivery through the gastrointestinal system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(7): 2232-2239.
- [10] 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 Functional Foods*, 2013, 5(2): 689-697.
- [11] LU D, PENG M Y, YU M, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the zinc binding capacity and *in vitro* gastrointestinal stability of peptides derived from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 647782.
- [12] WANG B, LI B. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 1-8.
- [13] 王波, 杨继国, 任杰, 等. 酪蛋白肽电荷性质对其肽锌螯合物的胃肠稳定性及吸收的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(3): 59-66. [WANG B, YANG J G, REN J, et al. Effect of charge properties of casein-derived peptides on *in vitro* gastrointestinal stability and absorption of zinc-peptide complexes[J]. *China Food Additives*, 2019, 30(3): 59-66.]
- [14] GARCÍA A V, DEMAND V, KERN K, et al. Enzymatic hy-

- drololysis and fermentation of pea protein isolate and its effects on antigenic proteins, functional properties, and sensory profile[J]. *Foods*, 2022, 11(1): 118.
- [15] 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.
- [16] SPELLMAN D, MCEVOY E, CUINN G O, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis[J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6): 447–453.
- [17] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 317–322. [WEI X Y, YIN L Q, ZHONG C, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 317–322.]
- [18] WHANG C, WANG B, LI B, et al. Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc-peptide complexes during *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 733–740.
- [19] ELKHTAB E, EL-ALFY M, SHENANA M, et al. New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 17(12): 459.
- [20] XIE N N, WANG B, JIANG L P, et al. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption[J]. *Food Research International*, 2015, 76(OCT.PT.3): 518–526.
- [21] 郑淋, 游丽君, 赵谋明, 等. 不同杀菌工艺对泥鳅多肽抗氧化活性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(3): 109–112. [ZHENG L, YOU L J, ZHAO M M, et al. Effect of sterilization on the antioxidant activity of loach peptide[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(3): 109–112.]
- [22] LI J P, GONG C, WANG Z Y, et al. Oyster-derived zinc-binding peptide modified by plastein reaction via zinc chelation promotes the intestinal absorption of zinc[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(6): 341.
- [23] SHU G W, HUANG J, BAO C J, et al. Effect of different proteases on the degree of hydrolysis and angiotensin i-converting enzyme-inhibitory activity in goat and cow milk[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 101.
- [24] ZHU K X, WANG X P, GUO X N. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12: 23–32.
- [25] CHEN G W, LIN H T V, HUANG L W, et al. Purification and identification of cholesterol micelle formation inhibitory peptides of hydrolysate from high hydrostatic pressure-assisted protease hydrolysis of fermented seabass byproduct[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5295.
- [26] 万春艳, 赵谋明, 赵海锋, 等. 大豆蛋白水解物对酿酒酵母生长和发酵性能的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 50–53. [WAN C Y, ZHAO M M, ZHAO H F, et al. Effects of soy protein hydrolysates on the growth and fermentation characteristics of brewer's yeast[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(9): 50–53.]
- [27] ZHANG Z R, ZHOU F B, LIU X L, et al. Particulate nanocomposite from oyster (*Crassostrea rivularis*) hydrolysates via zinc chelation improves zinc solubility and peptide activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 269–277.
- [28] YIANNIKOURIS A, CONNOLLY C, POWER R, et al. Characterization of metal-peptide complexes in feed supplements of essential trace elements[J]. *Metallomics*, 2009, 1(3): 235–248.
- [29] REDDI A R, GUZMAN T R, BREECE R M, et al. Deducing the energetic cost of protein folding in zinc finger proteins using designed metallopeptides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(42): 12815–12827.
- [30] ECKERT E, BAMDAD F, CHEN L Y. Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein[J]. *Food Chemistry*, 2014, 159: 498–506.
- [31] SUN R N, LIU X F, YU Y, et al. Preparation process optimization, structural characterization and *in vitro* digestion stability analysis of Antarctic krill (*Euphausia superba*) peptides-zinc chelate[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 128056.
- [32] WANG C, LI B, WANG B, et al. Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc-peptide complexes during *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 733–740.
- [33] LIU X Y, WANG Z X, YIN F W, et al. Zinc-chelating mechanism of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)-derived synthetic peptides[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(8): 438.
- [34] PHAM T L, KOVERMANN M, THOMAS F. Switchable zinc (II)-responsive globular β -sheet peptide[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 11(1): 254–264.
- [35] 阮国瑞. 核桃楸多肽—钙螯合物的制备及性质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019. [RUAN G R. Preparation and properties of *Juglans mandshurica* Maxim. calcium-chelating peptide[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.]
- [36] WANG Y, BAI H S, WANG S J, et al. Casein phosphopeptide-calcium chelate: Preparation, calcium holding capacity and simulated digestion *in vitro*[J]. *Food Chemistry*, 2023, 401: 134218.
- [37] KRISHNA S S, MAJUMDAR I, GRISHIN N V. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(2): 532–550.
- [38] PARVEEN N, ANSARI M O, AHMAD M F, et al. Zinc: An element of extensive medical importance[J]. *Current Medicine Research and Practice*, 2017, 7(3): 90–98.
- [39] KOCDOR H, ATEŞ H, AYDIN S, et al. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 9: 3899.
- [40] TAMAMURA H, OTAKA A, MURAKAMI T, et al. An anti-HIV peptide, T22, forms a highly active complex with Zn(II)[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1996, 229(2): 648.
- [41] KATIMBA H A, WANG R, CHENG C. Current findings support the potential use of bioactive peptides in enhancing zinc absorption in humans[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 258: 269–277.
- [42] GERBINO E, MOBILI P, TYMCZYSZYŃ E, et al. FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2011, 987: 186–192.
- [43] WANG C, LI B, AO J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 1231–1238.