

大豆多肽-锌螯合物的 制备工艺优化及其结构表征

郑英敏,袁 杨,苏东晓,何 山,许庆陵,曾庆祝*

(广州大学化学化工学院,广东广州 510006)

摘 要:本文通过 Alcalase 酶水解大豆分离蛋白制备大豆多肽,并将大豆多肽与 ZnCl_2 进行螯合反应制备多肽-锌螯合物。以锌螯合能力为指标,通过单因素实验及正交试验,确定大豆多肽锌螯合物的最佳工艺条件为:反应温度 $75\text{ }^\circ\text{C}$, pH5.5 以及 ZnCl_2 溶液浓度为 $450\text{ }\mu\text{mol/L}$,此条件下大豆多肽的锌螯合能力为 $(26.96 \pm 1.22)\text{ mg/g}$ 。紫外光谱和傅利叶红外光谱表明,锌离子可以与多肽中的羧基、氨基和肽键结合,从而形成大豆多肽锌螯合物。荧光光谱、扫描电子显微镜和 Zeta 电位的结果表明,与锌离子的螯合使得多肽发生分子内和分子间的折叠与聚集。大豆多肽-锌螯合物为开发新型补锌制剂提供了新的研究思路 and 理论依据。

关键词:大豆多肽,锌,螯合,结构表征

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

ZHENG Ying-min, YUAN Yang, SU Dong-xiao, HE Shan, XU Qing-ling, ZENG Qing-zhu*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this paper, soy protein isolate was hydrolyzed by alcalase to prepare soy peptides, and the peptides were chelated with ZnCl_2 to prepare peptides-zinc chelate. Using zinc-chelating capacity as an indicator, the combination of single factor experiments and orthogonal experiments was used to optimize the chelation process. The optimal condition was determined as zinc concentration of $450\text{ }\mu\text{mol/L}$ at $75\text{ }^\circ\text{C}$ and pH5.5. The zinc-chelating capacity of soy peptides was $(26.96 \pm 1.22)\text{ mg/g}$ in the optimal condition. The results of ultra-violet spectroscopy and Fourier transform infrared spectra synthetically indicated that zinc could be binding by carboxyl and amino group in peptides, thus forming soy peptides-zinc chelate. The results of fluorescence spectroscopy, scanning electron microscope and zeta potential showed that intramolecular and intermolecular folding and aggregation occurred during the formation of the chelation. The soy peptides-zinc chelate would provide a new idea and theoretical basis for the development of new zinc supplements.

Key words: soy peptides; zinc; chelation; structure characterization

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2020)14-0160-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.026

引文格式:郑英敏,袁杨,苏东晓,等.大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征[J].食品工业科技,2020,41(14):160-165.

大豆分离蛋白是从大豆油脂工业副产物——豆粕中提取出的一种蛋白质^[1]。作为富含人体所需的8种必需氨基酸,其含量满足人体需求的植物蛋白^[2],大豆分离蛋白因其高营养价值、出色的加工性能和低成本而广泛应用于食品行业中^[3]。据报道,通过 Alcalase 酶酶解得到的大豆多肽已被证实具有抗氧化性和 ACE 抑制活性^[4-5],而通过 Flavourzyme 酶酶解的大豆蛋白水解物则具有促进脂肪代谢的生理功能^[6]。

锌是人体中仅次于铁的第二大过渡金属元素,以二价阳离子形式存在,并在细胞代谢和凋亡过程包括中起着关键作用。锌是铜锌超氧化物歧化酶、碳酸酐酶、抗氧化酶和其他基质金属蛋白酶的酶促辅因子,参与碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢调节^[7]。据报道,缺乏锌会导致多种疾病,包括生长受损、免疫系统缺陷、皮炎、腹泻、性和骨骼成熟延迟,味觉受损,妊娠结局不良以及神经行为改变等^[8]。

收稿日期:2019-11-29

作者简介:郑英敏(1993-),女,硕士研究生,研究方向:生物活性肽及其功能性,E-mail:zym1alala@163.com。

* 通讯作者:曾庆祝(1965-),男,博士,教授,研究方向:生物活性肽及其功能性,E-mail:gzdxxqz@163.com。

基金项目:广州市科技计划项目(201903010108)。

从饮食中补充的锌元素容易与植酸形成不溶性络合物从而降低锌的生物利用度^[9]。多肽在一定配比、温度、pH 等条件下与微量金属离子通过螯合反应制得多肽金属离子螯合物^[10]。大量研究表明,金属离子氨基酸螯合物比无机盐具有更好的稳定性,更强的抗干扰性和更高的生物利用度。乳清多肽-亚铁螯合物^[11]和牡蛎-锌螯合物^[12]在模拟胃肠液消化实验中比相应的无机盐显示更好的离子溶解度。在 Caco-2 细胞的实验中,乳清多肽的锌及钙螯合物的离子吸收明显高于无机盐^[13-14]。胶原蛋白肽的钙螯合物能显著增加大鼠股骨矿物质密度和股骨钙含量^[15]。Chaud 等^[16]通过动物实验证明,酪蛋白肽-亚铁螯合螯合物在大鼠血红蛋白转化率上与硫酸亚铁效果一致。因此,蛋白肽的金属离子螯合物形式被认为是新的营养补充剂。除此之外,多肽金属离子螯合物还显出抑菌性^[17]、抗疲劳功能^[18]和抗氧化性^[19-20]。

已有作者如马利华^[21]和赵薇等^[22]研究过豆粕多肽锌螯合物的体外抗氧化性能和制备方法,但缺少对其结构的研究,因此本文通过酶解大豆分离蛋白制备大豆多肽,进而制取多肽-锌螯合物,并采用紫外光谱、傅立叶红外光谱、荧光光谱、电子扫描显微镜和 Zeta 电位等手段方法对大豆多肽-锌螯合物的初级结构进行表征,以期对多肽-锌螯合物的进一步深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白、氯化锌(分析纯)、溴化钾(光谱纯) 上海麦克林生化科技有限公司; Alcalase 酶 2.4 L FG, 诺维信生物技术有限公司; 其余试剂 均为国产分析纯。

PHS-3C 酸度计 上海精密科学仪器有限公司; PL403 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; HH4C 水浴振荡器 金坛市鸿科仪器厂; GL-2050MS 冷冻离心机 卢湘仪仪器有限公司; SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; Vivaflow200 超滤膜 德国赛多利斯; NexION 电感耦合等离子体质谱仪 美国 PerkinElmer 公司; 300UV-2600 紫外-可见分光光度计 日本岛津仪器有限公司; TENSOR II + Hyperion2000 傅立叶变换红外光谱仪 布鲁克公司; F-4500 荧光分光光度计 日本日立公司; JSM-7001F 扫描电子显微镜 日本 JEOL 公司; Nano-2s ZEN3600 纳米粒度电位仪 英国马尔文仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆多肽制备 将大豆分离蛋白溶解在蒸馏水中,浓度为 10%。用 1 mol/L NaOH 将大豆分离蛋白悬液的 pH 调节至 8.0,并在 55 ℃ 水浴中加热 10 min,然后加入 Alcalase 酶,酶与底物比例为 1:50 (W/W)。然后在 55 ℃ 和 pH8.0 的条件下酶解 3 h。酶解结束后,将酶解液置于沸水浴中加热 5 min 灭酶。冷却至室温,调节 pH 至 7.0 随后 8000 r/min

离心 15 min。取上清液经截留分子量 5 kDa 超滤膜分离,经冷冻干燥后即为大豆多肽^[23]。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 ZnCl₂ 浓度对大豆多肽锌螯合能力的影响 称取一定质量的大豆多肽分别溶解于 125、250、375、500 和 625 μmol/L 的 ZnCl₂ 溶液中,使大豆多肽浓度为 1 mg/mL,将混合液 pH 调节至 4.0。将混合液置于 60 ℃ 水浴中反应 3 h。得到大豆多肽-锌螯合物溶液,经无水乙醇沉淀、冷冻干燥制得多肽-锌螯合物固体备用,并测定其锌螯合能力。

1.2.2.2 螯合温度对大豆多肽锌螯合能力的影响 称取一定质量的大豆多肽溶解于 375 μmol/L 的 ZnCl₂ 溶液中,使大豆多肽浓度为 1 mg/mL,调节 pH 至 4.0。将混合液置于不同温度(40、50、60、70、和 80 ℃)中水浴反应 3 h。得到大豆多肽-锌螯合物溶液,经无水乙醇沉淀、冷冻干燥制得多肽-锌螯合物固体备用,并测定其锌螯合能力。

1.2.2.3 pH 对大豆多肽锌螯合能力的影响 称取一定质量的大豆多肽溶解于 375 μmol/L 的 ZnCl₂ 溶液中,使大豆多肽浓度为 1 mg/mL,用 1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液调节混合液 pH(2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0)。将混合液置于 60 ℃ 水浴中反应 3 h。得到大豆多肽-锌螯合物溶液,经无水乙醇沉淀、冷冻干燥制得多肽-锌螯合物固体备用,并测定其锌螯合能力。

1.2.2.4 螯合时间对大豆多肽锌螯合能力的影响 称取一定质量的大豆多肽溶解于 375 μmol/L 的 ZnCl₂ 溶液中,使大豆多肽浓度为 1 mg/mL,调节 pH 至 4.0。将混合液置于 60 ℃ 水浴中分别反应 1、2、3、4 和 5 h。得到大豆多肽-锌螯合物溶液,经无水乙醇沉淀、冷冻干燥制得多肽-锌螯合物固体备用,并测定其锌螯合能力。

1.2.3 正交试验 以锌螯合能力为评价指标,在单因素试验基础上选取 ZnCl₂ 浓度、温度、pH、时间为试验因素,选用 L₉(3⁴) 正交表进行 3 因素 3 水平正交实验优化(表 1),确定大豆多肽螯合锌的最佳条件。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A ZnCl ₂ 浓度(μmol/L)	B 温度(℃)	C pH
1	300	65	4.5
2	375	70	5.0
3	450	75	5.5

1.2.4 锌螯合能力的测定 根据 GB 5009.14-2017 食品中锌的测定中的电感耦合等离子体质谱法,测定单因素实验及正交试验中大豆多肽-锌螯合物固体的锌含量,结果用每克多肽上螯合的锌质量表示,即 mg/g 多肽。

1.2.5 大豆多肽-锌螯合物结构表征

1.2.5.1 紫外吸收光谱 取一定质量的大豆多肽及大豆多肽-锌螯合物固体溶解于去离子水中,使其浓

度为 1 mg/mL。在测量之前,用去离子水对紫外可见分光光度计进行基线调零,测定样品溶液 190~600 nm 的吸光值。

1.2.5.2 红外光谱 分别取 2 mg 的大豆多肽及大豆多肽-锌螯合物与 200 mg 光谱纯 KBr 于玛瑙研钵中研磨均匀。制成薄片后测定红外吸收光谱。以 4 cm^{-1} 的分辨率记录样品在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 的光谱,平均扫描 16 次。

1.2.5.3 荧光光谱 取一定质量的大豆多肽分别溶解于 0、2、4、6、8 和 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 溶液中,使其浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$,调节溶液 pH 至 5.5,于 $75\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中反应 1 h。样品在激发波长 280 nm 下测定荧光光谱^[24]。

1.2.5.4 扫描电子显微镜 取一定量大豆多肽、大豆多肽-锌螯合物粉末于导电胶上,经喷金镀膜处理后放入扫描电镜抽真空,观察样品形貌。

1.2.5.5 Zeta 电位 分别称取一定质量的大豆多肽和大豆多肽-锌螯合物溶解于去离子水中,使其浓度为 1 mg/mL,用 HCl 或 NaOH 将溶液 pH 调节至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,测定其 Zeta 电位。

1.3 数据处理

使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据表示为三次重复测定的 $\bar{X} \pm S$ 。采用 ANOVA 评估统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 ZnCl_2 浓度对大豆多肽锌螯合能力的影响 由图 1 可知, ZnCl_2 浓度在 $125\sim 375\text{ }\mu\text{mol/L}$ 范围,大豆多肽锌螯合能力随 ZnCl_2 浓度的上升而增大。当 ZnCl_2 浓度为 $375\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,大豆多肽螯合能力为 $(16.76 \pm 0.35)\text{ mg/g}$ 。由此可知,当 ZnCl_2 浓度为 $375\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,大豆多肽中的锌螯合位点已达到饱和状态。所以在后续的正交实验中,选择 ZnCl_2 浓度为 $375\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

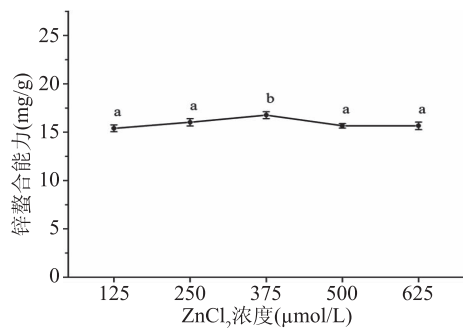


图 1 ZnCl_2 浓度对大豆多肽锌螯合能力的影响

Fig.1 Effect of ZnCl_2 concentration

on zinc-chelating capacity of soy peptides

注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$);图 2~图 4 同。

2.1.2 螯合温度对大豆多肽锌螯合能力的影响 由图 2 可知,温度对大豆多肽锌螯合能力的影响较大。随着温度的增加,大豆多肽的锌螯合能力也随之增加,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 时达到最大($24.65 \pm 0.48\text{ mg/g}$),随后下降。在 $40\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$ 内,反应温度越高,螯合反应的反应

速率和平衡系数越大,然而,过高温度会导致多肽变性,从而导致大豆多肽锌螯合能力下降^[25]。因此,选择 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 进行后续实验。

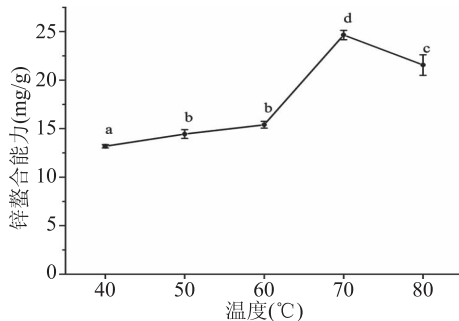


图 2 温度对大豆多肽锌螯合能力的影响

Fig.2 Effect of temperature on

zinc-chelating capacity of soy peptides

2.1.3 pH 对大豆多肽锌螯合能力的影响 图 3 展现了不同 pH 下的多肽锌螯合能力。在 pH 5.0 时多肽的锌螯合能力达到最大,为 $(18.05 \pm 0.59\text{ mg/g})$ 。当 pH 小于 5.0 时,多肽的锌螯合能力随着 pH 的减小而下降,这是因为 H^+ 会与金属离子竞争给电子基团,使多肽的锌螯合能力降低^[26]。当 pH 大于 5.0 时,多肽的锌螯合能力也减小,因为反应体系中的 Zn^{2+} 与 OH^- 生成不溶性 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 沉淀,使得体系中的 Zn^{2+} 不能充分与大豆多肽进行螯合反应^[12]。因此选择 pH 5.0 进行后续实验。

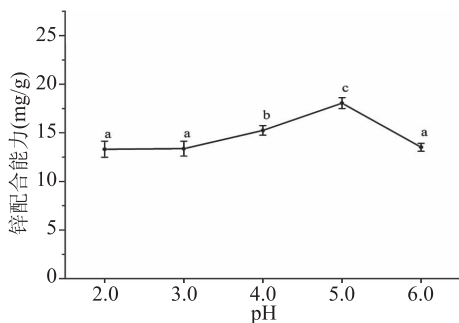


图 3 pH 对大豆多肽锌螯合能力的影响

Fig.3 Effect of pH on zinc-chelating

capacity of soy peptides

2.1.4 螯合时间对大豆多肽锌螯合能力的影响 从图 4 得知,大豆多肽与锌的螯合能力随着螯合时间的上升而上升,在反应为 3 h 时达到最大值($16.04 \pm 0.63\text{ mg/g}$),随后下降。然而反应时间的改变对大豆多肽的锌螯合能力影响并不显著。因此在后续的正交实验中将选择 1 h 作为螯合时间,并不再作为后续正交实验的实验因素。

2.2 正交实验结果

由表 2 中 R 值可知,试验中温度对大豆多肽锌螯合能力影响最大,其次是 pH,最后是 ZnCl_2 浓度。由正交实验结果可知,最佳的反应条件为第 7 组 $\text{A}_3\text{B}_1\text{C}_3$,即 ZnCl_2 浓度 $450\text{ }\mu\text{mol/L}$,温度 $65\text{ }^\circ\text{C}$,pH 5.5。但通过极差分析得到的优方案为 $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_3$,即 ZnCl_2 浓度 $450\text{ }\mu\text{mol/L}$,温度 $75\text{ }^\circ\text{C}$,pH 5.5。再就这两组方案进行对比实验,最终确定出最优反应条件

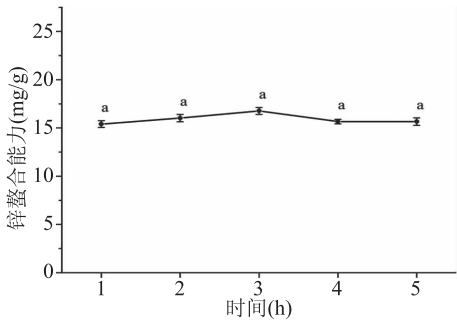


图4 时间对大豆多肽锌螯合能力的影响

Fig.4 Effect of time on zinc-chelating capacity of soy peptides

为 $A_3B_3C_3$,在此条件下大豆多肽螯合能力为 (26.96 ± 1.22) mg/g。

表2 大豆多肽锌螯合能力正交优化试验结果
Table 2 Results of zinc-chelating capacity of soy peptides by orthogonal optimization test

实验号	A	B	C	螯合能力 (mg/g)
1	1	1	1	15.26
2	1	2	2	18.55
3	1	3	3	24.36
4	2	1	2	18.74
5	2	2	3	18.66
6	2	3	1	23.45
7	3	1	3	25.40
8	3	2	1	18.27
9	3	3	2	24.65
k_1	19.39	19.80	18.99	
k_2	20.28	18.49	20.65	
k_3	22.77	24.15	22.81	
R	3.38	5.66	3.82	
最优组合	A_3	B_3	C_3	
排列顺序	$B > C > A$			

2.3 大豆多肽-锌螯合物结构表征

2.3.1 紫外吸收光谱 图5为大豆多肽和 大豆多肽-锌螯合物的紫外吸收光谱。大豆多肽在 205 nm 处出现强的吸收峰,在 273 nm 处出现一个弱吸收峰。这两个吸收峰分别是由肽键的发色基团($C=O$)发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和酪氨酸中的苯环引起的^[27-28]。而大豆多肽-锌螯合物的紫外吸收峰发生明显的移动和强度变化。大豆多肽-锌螯合的最大吸收峰移动至 224 nm,吸收强度降低,而较弱的吸收峰发生蓝移且吸收强度增大。结果表明,当大豆多肽-锌螯合物生成,发色基团($-C=O$, $-COOH$)和助色基团($-OH$, $-NH_2$)发生偏振变化^[29]。黄瓜种子肽-钙螯合物^[28]和猪骨胶原肽-钙螯合物^[30]也呈现出相似的紫外光谱。紫外光谱的变化证明大豆多肽和锌离子之间发生了螯合反应。

2.3.2 傅立叶红外光谱 图6为大豆多肽及大豆多肽-锌螯合物的红外光谱。在大豆多肽的红外光谱中,出现了由 N-H 键的拉伸振动引起的吸收峰^[12,31]

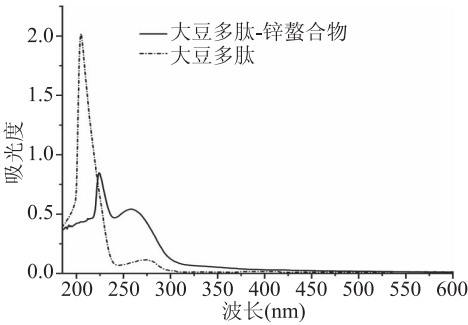


图5 大豆多肽-锌螯合物及大豆多肽紫外吸收光谱

Fig.5 UV spectra of soy peptides-Zn chelate and soy peptides

(3471.62 cm^{-1}),而在大豆多肽-锌螯合物中该吸收峰移动至 3417.27 cm^{-1} 。这表明感应效应或偶极场效应改变了 $-NH_2$ 的电子云密度^[27],说明 $-NH$ 参与了多肽与锌离子的螯合反应。在大豆多肽的红外光谱中,波长为 1657.81 cm^{-1} 的吸收峰对应 $-C=O$ ^[27,32]。在大豆多肽-锌螯合物中,该吸收峰移动至 1650.65 cm^{-1} ;出现了一个由 $-COO-Zn$ 引起的新吸收峰^[33](1242.64 cm^{-1}),以上表明多肽中的羧基为螯合位点之一。与锌离子螯合后,大豆多肽中的吸收峰(864.70 和 529.70 cm^{-1})分别移动至 857.54 和 536.86 cm^{-1} ,这说明多肽与锌离子的螯合反应使 $-N-H$ 电子云密度降低^[29]而 $-O=C-NH_2$ 电子云密度增加^[33]。总结红外光谱结果,可以推断出大豆多肽与锌离子的螯合位点为羧基、氨基以及肽键^[14,34]。

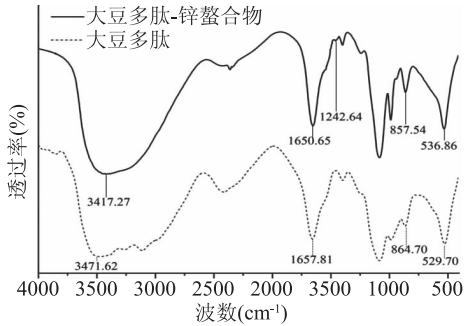


图6 大豆多肽-锌螯合物及大豆多肽红外光谱

Fig.6 FTIR spectra of soy peptides-Zn chelate and soy peptides

2.3.3 荧光光谱 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等芳香族氨基酸可以产生内源性荧光,因此可以用荧光光谱来探究蛋白质或多肽和其他物质间的相互作用^[14]。在 280 nm 激发波长下,发射峰 305 和 348 nm 分别对应酪氨酸和色氨酸^[29]。从图7中可得知,随着 Zn^{2+} 浓度的增加,大豆多肽-锌螯合物在 305 和 348 nm 出的荧光强度逐渐下降,这是由锌离子导致多肽的折叠造成的^[24]。根据 Beyer 等^[35]的报道,金属离子能促进多肽的折叠。因此多肽和锌离子的螯合反应使多肽发生折叠,从而使荧光强度略微下降。

2.3.4 扫描电子显微镜 图8分别为大豆多肽粉末及大豆多肽-锌螯合物粉末的形态图。可以看出,二者均为不规则的颗粒体,大豆多肽粉末为比较平滑

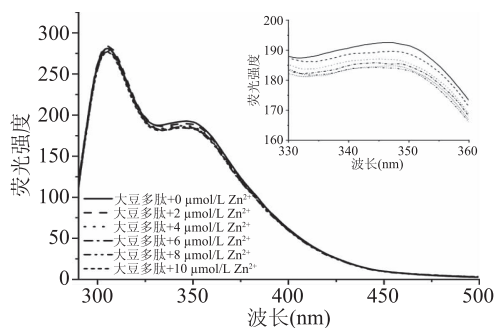


图7 大豆多肽-锌螯合物及大豆多肽红外荧光光谱

Fig.7 Fluorescence spectra of soy peptides-Zn chelate and soy peptides

的块状外观,而大豆多肽-锌螯合物粉末则呈现出颗粒凹凸状态。有文献报道,金属离子能使 $A\beta$ 肽迅速聚集,形成寡聚物^[36]。Dionisio等^[37]指出锌离子可能在两个多肽的结合位点上充当桥接配体。因此,可以推测,大豆多肽粉末和 大豆多肽-锌螯合物粉末的形貌区别可能是由于多肽与锌离子发生了螯合反应,形成了多肽-锌螯合物微颗粒。

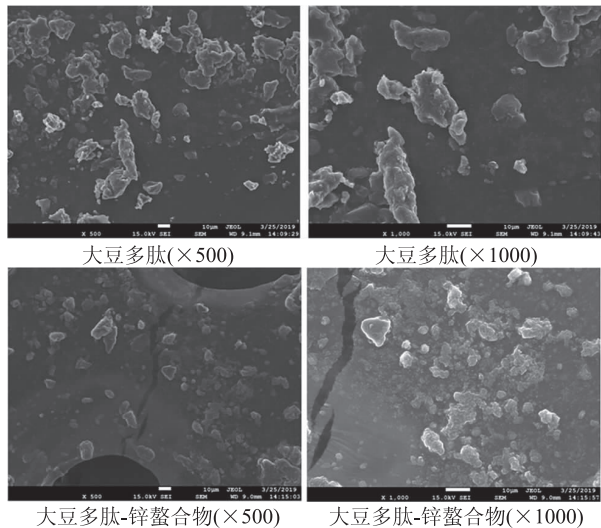


图8 大豆多肽及大豆多肽-锌螯合物扫描电子显微镜图谱

Fig.8 SEM of soy peptides and soy peptides-Zn chelate

2.3.5 Zeta 电位 图9 为大豆多肽和 大豆多肽-锌螯合物在不同 pH 下的 Zeta 电位。可以看出,大豆多肽和 大豆多肽-锌螯合物的 Zeta 电位变化程度不同,当 pH 超过 2.7,大豆多肽-锌螯合物的 Zeta 电位开始低于大豆多肽的 Zeta 电位。在本实验的 pH 范围内,随着 pH 的增加,多肽-锌螯合物的稳定性比大豆多肽差,说明锌离子和多肽的部分基团结合形成螯合物以后促进了聚集作用的发生,更加有利于形成微颗粒^[38]。

3 结论

本研究通过单因素及正交试验确定大豆多肽-锌螯合物的制备条件为:多肽与锌的反应温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶液 pH5.5 以及氯化锌浓度为 $450\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。在此条件下的锌螯合能力为 $(26.96\pm 1.22)\text{ mg/g}$ 。通过紫外吸收光谱和红外光谱确定生成了大豆多肽-锌螯

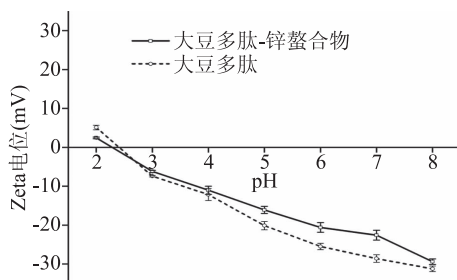


图9 大豆多肽及大豆多肽-锌螯合物在不同 pH 下的 Zeta 电位曲线

Fig.9 Zeta potential curve of soy peptides and soy peptides-Zn complex at different pH values

合物,其螯合位点为多肽的羧基、氨基和肽键。荧光光谱、电子扫描显微镜和 Zeta 电位的结果表明,在 Zn^{2+} 与大豆多肽的螯合过程中,受到 Zn^{2+} 的影响,加强了多肽分子内和分子间的相互作用,从而促进折叠和聚集形成多肽-锌螯合物的微颗粒。基于大豆多肽的锌螯合物为开发新的锌补充剂提供了研究思路 and 理论基础。

参考文献

- [1] 叶晶,吕瑞鹤,苏春霞,等.大豆分离蛋白溶液/乳液酸化过程的微观流变学研究[J].中国食品学报,2019,19(3):23-34.
- [2] Nishinari K, Fang Y, Guo S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301-318.
- [3] Huang L R, Ding X N, Li Y L, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 114-119.
- [4] Zhang Q Z, Tong X H, Li Y, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from Alcalase-hydrolyzed soybean (*Glycine max* L.) hydrolysate and their cytoprotective effects in human intestinal Caco-2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(20): 5772-5781.
- [5] Chiang W D, Tsou M J, Tsai Z Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor [J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 725-732.
- [6] Tsou M J, Kao F J, Tseng C K, et al. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with flavourzyme and ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 243-248.
- [7] Thoen R U, Barther N N, Schemitt E, et al. Zinc supplementation reduces diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in rats [J]. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2018, 44(6): 580-586.
- [8] Gibson R S. Zinc deficiency and human health: Etiology, health consequences, and future solutions [J]. Plant and Soil, 2012, 361(1-2): 291-299.
- [9] Panda S L, Jaiswal A. Compositional and processing effects in promoting the bioaccessibility of iron and zinc of ready to cook

high protein kheer mix[J].LWT,2019,109:186-193.

[10] 曾庆瑞.宽体金钱蛭中胰蛋白酶抑制剂的纯化及多肽锌的制备与性质研究[D].徐州:中国矿业大学,2016.

[11] O' Loughlin I B, Kelly P M, Murray B A, et al. Molecular characterization of whey protein hydrolysate fractions with ferrous chelating and enhanced iron solubility capabilities[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2015,63(10):2708-2714.

[12] Zhang Z, Zhou F, Liu X, 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.

[13] 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.

[14] Cai X X, Zhao L N, Wang S Y, et al. Fabrication and characterization of the nano-composite of whey protein hydrolysate chelated with calcium[J].Food & Function,2015,6(3):816-823.

[15] Guo H H, Hong Z, Yi R Z. Core-shell collagen peptide chelated calcium/calcium alginate nanoparticles from fish scales for calcium supplementation[J].Journal of Food Science,2015,80(7):N1595-N1601.

[16] Chaud M V, Izumi C, Nahaal Z, et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002,50(4):871-877.

[17] Jiang L, Wang B, Li B, et al. Preparation and identification of peptides and their zinc complexes with antimicrobial activities from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates[J].Food Research International,2014,64:91-98.

[18] Huang S, Lin H, Deng S. Study of anti-fatigue effect in rats of ferrous chelates including hairtail protein hydrolysates[J].Nutrients,2015,7(12):9860-9871.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 马利华.豆粕多肽锌整合物的抗氧化性研究[J].中国调味品,2019,44(4):84-88.

[22] 赵薇,李涛,王明,等.豆粕水解多肽与锌整合物的制备方法研究[J].食品研究与开发,2013,34(19):133-136.

[23] Meinschmidt P, Sussmann D, Schweiggert-Weisz U, et al. Enzymatic treatment of soy protein isolates: Effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties[J].Food Science & Nutrition,2016,4(1):11-23.

[24] Fang Z, Xu L Z, Lin Y L, et al. The preservative potential of *Octopus scraps* peptides - Zinc chelate against *Staphylococcus aureus*: Its fabrication, antibacterial activity and action mode[J].Food Control,2019,98:24-33.

[25] Hou H, Wang S, Zhu X, et al. A novel calcium-binding

peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex[J].Food Chemistry,2018,243:389-395.

[26] Lin J, Cai X, Tang M, et al. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2015,63(44):9704-9714.

[27] Wang L, Ding Y Y, Zhang X X, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination[J].Food Chemistry,2018,239:416-426.

[28] 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.

[29] Cai X X, Lin J P, Wang S Y. Novel peptide with specific calcium-binding capacity from *Schizochytrium* sp. protein hydrolysates and calcium bioavailability in Caco-2 cells[J].Marine Drugs,2017,15(1):3.

[30] 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.

[31] Wu W F, Li B F, Hou H, et al. Isolation and identification of calcium-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and their binding properties with calcium[J].Food & Function,2017,8(12):4441-4448.

[32] Wang C, Li B, Li H X. Zn(II) chelating with peptides found in sesame protein hydrolysates: Identification of the binding sites of complexes[J].Food Chemistry,2014,165:594-602.

[33] Udechukwu M C, Downey B, Udenigwe C C. Influence of structural and surface properties of whey-derived peptides on zinc-chelating capacity, and *in vitro* gastric stability and bioaccessibility of the zinc-peptide complexes[J].Food Chemistry,2018,240:1227-1232.

[34] Zhao L N, Huang S L, Cai X X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate[J].Journal of Functional Foods,2014,10:46-53.

[35] Beyer R L, Hoang H N, Appleton T G, et al. Metal clips induce folding of a short unstructured peptide into an α -helix via turn conformations in water. Kinetic versus thermodynamic products[J].Journal of the American Chemical Society,2004,126(46):15096-15105.

[36] Mannini B, Habchi J, Chia S, et al. Stabilization and characterization of cytotoxic A β 40 oligomers isolated from an aggregation reaction in the presence of zinc ions[J].ACS Chemical Neuroscience,2018,9(12):2959-2971.

[37] Dionisio G, Uddin M, Vincze E. Enrichment and identification of the most abundant zinc binding proteins in developing barley grains by Zinc-IMAC capture and nano LC-MS/MS[J].Proteomes,2018,6(1):3-21.

[38] Wu J H, Cai X X, Tang M R, et al. Novel calcium-chelating peptides from octopus scraps and their corresponding calcium bioavailability[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2019,99(2):536-545.