

郑义, 李诗颖, 李闯, 等. 银杏肽锌螯合物的制备、体外消化及抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 420–427. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110135

ZHENG Yi, LI Shiyang, LI Chuang, et al. Preparation, *in Vitro* Gastrointestinal Digestion and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* Peptides-Zinc Chelate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 420–427. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110135

· 营养与保健 ·

银杏肽锌螯合物的制备、体外消化 及抗氧化活性分析

郑 义^{1,2}, 李诗颖¹, 李 闯¹, 周小芮¹, 陈亚楠¹, 张秀芸¹, 张银雨¹

(1. 徐州工程学院食品与生物工程学院, 江苏徐州 221018;

2. 江苏省食品资源开发与质量安全重点实验室, 江苏徐州 221018)

摘 要: 本文优化了银杏肽锌螯合物 (*Ginkgo biloba* peptides-zinc chelate, Zn-GBP) 的制备工艺, 分析了 Zn-GBP 的体外消化特性及抗氧化活性。采用单因素实验及响应面法优化了 Zn-GBP 的制备工艺; 采用体外模拟胃肠道消化测定了 Zn-GBP 中锌离子的生物利用率; 以 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力、还原能力为指标, 评价了 Zn-GBP 的体外抗氧化活性。结果表明, Zn-GBP 的最佳制备工艺条件为: 银杏肽与锌质量比 3:1、螯合 pH 8.2、螯合温度 70 ℃、螯合时间 2 h; 在此条件下, 螯合率为 49.23%±0.35%, 螯合物得率为 42.34%±0.45%。体外模拟胃肠道消化分析结果表明 Zn-GBP 中锌离子的溶解率和渗透率均显著高于无机锌盐 ($P<0.05$), 具有较好的生物利用率。Zn-GBP 具有较好的清除 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基能力, 其 EC₅₀ 值分别为 101.0 和 83.6 mg/L, 并具有较强的还原能力; 与银杏肽相比, Zn-GBP 的体外抗氧化活性有所提高。

关键词: 银杏, 肽, 锌, 螯合物, 体外消化, 抗氧化

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)17-0420-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110135



本文网刊:

Preparation, *in Vitro* Gastrointestinal Digestion and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* Peptides-Zinc Chelate

ZHENG Yi^{1,2}, LI Shiyang¹, LI Chuang¹, ZHOU Xiaorui¹, CHEN Yanan¹, ZHANG Xiuyun¹, ZHANG Yinyu¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Xuzhou University of Technology, Xuzhou 221018, China;

2. Jiangsu Key Construction Laboratory of Food Resource Development and Quality Safe, Xuzhou 221018, China)

Abstract: The aim of this study was to optimize the preparation process of *Ginkgo biloba* peptides-zinc chelate (Zn-GBP), and analyze its *in vitro* gastrointestinal digestion and antioxidant activity. The preparation process of Zn-GBP was optimized by single factor test and response surface method. The bioavailability of zinc ions in the Zn-GBP was determined by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Furthermore, the *in vitro* antioxidant activity of Zn-GBP was evaluated using DPPH free radical scavenging ability, ABTS⁺ free radical scavenging ability and reducing ability. The results showed that the optimum preparation parameters were as follows: mass ratio of *Ginkgo biloba* peptides to zinc 3:1, chelating pH 8.2, chelating temperature 70 ℃, and chelating time 2 h. Under these parameters, the chelation rate was 49.23%±0.35%, and the chelate yield was 42.34%±0.45%. The solubility and permeability of zinc ions in Zn-GBP were significantly higher than those in inorganic zinc salts ($P<0.05$), indicating that Zn-GBP had better bioavailability. Zn-GBP showed strong scavenging activities against DPPH free radical and ABTS⁺ free radical, with EC₅₀ values of 101.0 and 83.6 mg/L, respectively, and it also has strong reducing ability. Moreover, the *in vitro* antioxidant activity of Zn-GBP was higher than that of *Ginkgo biloba* peptides.

Key words: *Ginkgo biloba*; peptide; zinc; chelate; *in vitro* gastrointestinal digestion; antioxidant

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 江苏省产学研合作项目 (BY20221266); 徐州市科技项目重点研发计划 (KC19122)。

作者简介: 郑义 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能活性物质开发与食品资源精深加工, E-mail: yuzheng@163.com。

银杏(*Ginkgo biloba*)种仁(白果)为卫健委公布的药食同源物质,《本草纲目》记载其具有化痰、止咳、敛肺、平喘等功效。银杏干制品中蛋白含量 13.2%^[1],氨基酸组成合理,属于优质植物蛋白^[2]。目前我国对银杏资源开发利用还处于初级阶段,由于银杏产量大,价格低,大量资源被浪费,迫切需要开发银杏精深加工产品^[3]。银杏肽(*Ginkgo biloba* peptides, GBP)为银杏蛋白经过蛋白酶水解得到的肽类混合物,所选蛋白酶通常为风味蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等单一或复合蛋白酶;具有抗氧化^[4-6]、降血压^[7]、降血糖^[8]、降血脂^[9]和肝保护^[10]等作用,且易被吸收利用,具有广泛的应用前景。

锌是人体必需的微量元素之一,在蛋白质与核酸合成、生长发育、免疫调节、伤口愈合、维持正常味觉和食欲等方面具有重要作用^[11]。近年来,我国人群锌膳食摄入量显著改善,但各年龄段仍存在不同程度的缺锌,尤其老年人尤为严重^[12]。传统的无机锌和有机酸锌补充剂易与食物中的草酸、植酸等生成沉淀,锌的生物利用率较低,且有一定的副作用^[13]。因此亟待开发高效安全且生物利用度率高的锌补充剂。研究表明,生物活性肽可通过羧基、氨基、亚氨基等基团与锌离子配位形成稳定的可溶性肽锌螯合物,一方面通过与锌离子的协同作用提高生物活性肽的原有活性,另一方面肽锌螯合物以肽的形式被消化吸收,可提高锌的生物利用率^[14]。国内外已有不少以动植物蛋白源生物活性肽与锌金属离子反应制备肽锌螯合物的研究报道。Wang 等制备了一种用于补锌的酪蛋白源肽锌螯合物纳米颗粒,经体外模拟胃肠消化吸收后仍然有 40% 的锌离子以肽锌螯合物的形式存在^[15]。Liu 等采用菠萝蛋白酶和风味蛋白酶分步水解法制备低分子量鸡皮胶原蛋白肽,进一步将鸡皮胶原蛋白肽与硫酸锌螯合制备了新型肽锌螯合物,研究发现肽锌螯合物的生物利用度高于硫酸锌,可通过减少肿瘤细胞和微环境中的自噬而抑制肿瘤生长^[16]。郑英敏等通过 Alcalase 酶水解大豆分离蛋白制备大豆多肽,并将大豆多肽与氯化锌进行螯合反应制备肽锌螯合物,结构分析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^[17]。现有研究报道存在锌离子与肽的螯合率偏低、肽锌螯合物在人体内的生物利用率不高等问题,因此亟需制备和鉴定新型肽锌螯合物。我国银杏资源丰富,银杏肽具有广泛的生物活性,以银杏肽为原料制备银杏肽锌螯合物(*Ginkgo biloba* peptides-zinc chelate, Zn-GBP)具有重要研究意义与应用前景,目前有关 Zn-GBP 的研究未见报道。

本研究采用复合风味蛋白酶水解银杏蛋白制备银杏肽,将银杏肽与硫酸锌进行螯合反应制备 Zn-GBP,采用响应面法优化 Zn-GBP 的制备工艺,通过体外模拟胃肠道消化分析 Zn-GBP 中锌离子的生物利用率,以清除 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除能力、

还原能力为指标,评价了 Zn-GBP 的体外抗氧化活性,旨在为银杏资源的开发利用,为 Zn-GBP 的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

银杏 2021 年 10 月采收于江苏省邳州市;复合风味蛋白酶(1.5×10^4 U/g) 丹麦诺维信公司;胃蛋白酶(EC 3.4.23.1, 1.2×10^4 U/g)、胰蛋白酶(EC 3.4.21.4, 5.0×10^4 U/g) 国药集团化学试剂有限公司;还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、DPPH 和 ABTS 美国 Sigma-Aldrich 公司;其他试剂均为国产分析纯。

DCTZ-1000 多用途恒温超声提取机 北京弘祥隆生物技术开发有限公司; Labscale 小型切向流超滤系统 美国 Millipore 公司; 723C 可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司; Alpha 1-2 LD plus 冷冻干燥机 德国 Christ 公司; 3K30 冷冻离心机 德国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 GBP 的制备 采用超声辅助碱提酸沉法制备银杏蛋白^[18],考马斯亮蓝法测得纯度为 84.35%。采用复合风味蛋白酶水解银杏蛋白制备银杏肽^[9],酶解工艺流程为:银杏蛋白→酶解→灭酶→离心分离→超滤膜分离→冷冻干燥→GBP 粉。

1.2.2 Zn-GBP 的制备 取 GBP 粉,加适量去离子水溶解,接着加入适量七水硫酸锌,超声波混匀(超声功率 100 W,时间 3 min),在一定的 pH 和温度条件下螯合一定时间。冷却至室温,4500 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 5 倍体积预冷的 95% 乙醇,4 ℃ 下醇沉 12 h。4500 r/min 离心 15 min,收集沉淀,用无水乙醇洗涤沉淀 2~3 次,冻干,得到 Zn-GBP。

1.2.3 螯合率与螯合物得率的测定 采用《GB 5009.14-2017 食品安全国家标准 食品中锌的测定》中的二硫腈比色法,测定样品中锌的质量。根据锌的质量,计算螯合率和螯合物得率。

$$\text{螯合率}(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: m_1 为 Zn-GBP 中锌的质量, mg; m_2 为 GBP 中锌的质量, mg; m_3 为反应体系锌的总质量, mg。

$$\text{螯合物得率}(\%) = \frac{m_4}{m_5} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: m_4 为生成的螯合物质量, mg; m_5 为反应物的总质量, mg。

1.2.4 单因素实验 采用单因素实验考察肽锌比(银杏肽与锌质量比)、螯合 pH、螯合温度和螯合时间对螯合率及螯合物得率的影响,试验因素水平如表 1 所示。每组试验重复 3 次。

表 1 单因素实验因素水平设计
Table 1 Factors and levels of single factor experiment

自变量	水平	固定因素条件
肽锌比	1:1、2:1、3:1、4:1、5:1	螯合pH 8.0, 螯合温度70 ℃, 螯合时间2.0 h
螯合pH	6.0、7.0、8.0、9.0、10.0	肽锌比3:1, 螯合温度70 ℃, 螯合时间2.0 h
螯合温度(℃)	50、60、70、80、90	肽锌比3:1, 螯合pH8.0, 螯合时间2.0 h
螯合时间(h)	1.0、1.5、2.0、2.5、3.0	肽锌比3:1, 螯合pH8.0, 螯合温度70 ℃

1.2.5 响应面法优化试验 在单因素实验的基础上, 采用响应面法中的 Box-Behnken 试验设计, 以螯合率为响应值, 设计四因素三水平试验, 因素水平如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平设计
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experiments

水平	因素			
	A:肽锌比	B:螯合pH	C:螯合温度(℃)	D:螯合时间(h)
-1	2:1	7.0	60	1.5
0	3:1	8.0	70	2.0
1	4:1	9.0	80	2.5

1.2.6 体外模拟胃肠道消化 采用 Sun 等^[19]报道的方法, 略作修改。参照 2015 版《中国药典》二部附录中的方法配制人工胃液与人工肠液。人工胃液: 取 4 mol/L 盐酸 16.4 mL, 加双蒸水约 800 mL、胃蛋白酶 10 g, 混匀, 加双蒸水定容至 1000 mL, 4 mol/L 盐酸调 pH 至 1.2。人工肠液: 取 0.68 g 磷酸二氢钾, 加 50 mL 双蒸水、7.7 mL 0.2 mol/L 氢氧化钠, 再加入 1 g 胰蛋白酶, 双蒸水定容至 100 mL, 0.2 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.2。取 50 mg Zn-GBP, 加入 10 mL 人工胃液, 混匀后, 37 ℃ 下振荡水浴 2 h。人工胃液消化后, 调 pH 至 7.2 灭活胃蛋白酶, 加入 10 mL 人工肠液, 移入到透析袋(2000 Da)中, 37 ℃ 下振荡水浴 2 h。人工肠液消化后, 沸水浴 10 min 灭酶。将 Zn-GBP 替换为相同质量的硫酸锌作为阳性对照。

溶解率测定: 分别取人工胃液和人工肠液消化后的消化液, 10000 r/min 离心 15 min。采用《GB 5009.14-2017 食品安全国家标准 食品中锌的测定》中的二硫腈比色法分别测定上清液中锌离子和消化液中总锌质量。根据锌的质量, 计算溶解率。

$$\text{溶解率}(\%) = \frac{m_6}{m_7} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: m_6 为上清液中锌离子的质量, mg; m_7 为消化液中总锌质量, mg。

渗透率测定: 人工肠液消化后, 分别取透析袋内外的溶液, 采用二硫腈比色法分别测定内外溶液中锌离子质量。根据锌离子的质量, 计算溶解率。

$$\text{渗透率}(\%) = \frac{m_8}{m_9} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: m_8 为透析袋外液中锌离子的质量, mg; m_9 为透析袋内液中锌离子的质量, mg。

1.2.7 体外抗氧化活性测定 以 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力和还原能力为指标, 评价 Zn-GBP 的体外抗氧化活性。以 GBP 作为组间对照, GSH 作为阳性对照。

1.2.7.1 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除能力测定 参照《GB/T 39100-2020 多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法》。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A_1 为样品溶液与 DPPH 溶液混合液的吸光度; A_2 为样品溶液与乙醇溶液混合液的吸光度; A_3 为 DPPH 溶液与样品试剂溶液混合液的吸光度。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_4 - A_5}{A_4} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: A_4 为 ABTS⁺溶液与样品试剂溶液混合液的吸光度; A_5 为样品溶液与 ABTS⁺溶液混合液的吸光度。

采用 Origin 软件中的 log3p1 模型, 对数据进行非线性拟合, 得到回归方程, 计算半数有效浓度(half maximal effective concentration, EC₅₀)。

1.2.7.2 还原能力测定 采用 Oraiza 报道的铁氰化钾法^[20]。将 2 mL 样品溶液、2 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6)与 2 mL 1% (m/V)铁氰化钾溶液混合。样品溶液 50 ℃ 下孵育 20 min 后, 在上述反应体系中加入 2 mL 10% (m/V)三氯乙酸, 混匀, 3500 r/min 离心 8 min。离心后, 取 2 mL 上清液依次与 0.4 mL 0.1% (m/V)氯化铁和 2 mL 去离子水混合, 50 ℃ 孵育 10 min, 测定 700 nm 处的吸光度。将样品溶液替换为相同体积的去离子水作为空白对照。

1.3 数据处理

采用 SPSS 24.0 软件进行数据统计与分析; 试验重复三次, 结果以平均值±标准差表示。采用新复极差法进行多重比较分析, $P < 0.05$ 表示统计学差异显著, $P < 0.01$ 表示统计学差异极显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 肽锌比对螯合率及螯合物得率的影响 如图 1 所示, 当肽锌比值由 1:1 提高到 3:1 时, 螯合率及螯合物得率均随着肽锌比值的增加而升高, 当肽锌比值高于 3:1 时, 螯合率及螯合物得率均随着肽锌比值

的增加而下降。当肽锌比值较低时,大量锌离子未参加螯合反应;当肽锌比值较高时,溶液中产生聚集现象,银杏肽的利用率不高,螯合物得率下降^[21]。综合考虑螯合率及螯合物得率,选择较优肽锌比为 3:1。

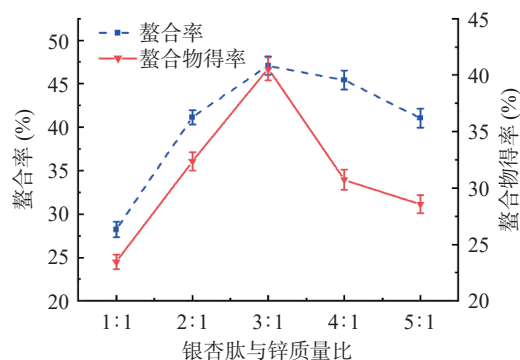


图 1 银杏肽与锌质量比对螯合率及螯合物得率的影响

Fig.1 Effect of mass ratio of *Ginkgo biloba* peptides to zinc on the chelation rate and chelate yield

2.1.2 螯合 pH 对螯合率及螯合物得率的影响 图 2 为不同螯合 pH 对螯合率及螯合物得率的影响。在螯合 pH 为 6.0~8.0 时,螯合率及螯合物得率均随螯合 pH 的升高而增加,并在螯合 pH 为 8.0 时达到最大值。在螯合 pH 为 8.0~10.0 时,螯合率及螯合物得率均随螯合 pH 的升高而降低。螯合 pH 过低时, H^+ 与锌离子争夺供电子基团,不利于螯合反应的进行;螯合 pH 过高时,大量锌离子与 OH^- 反应生成氢氧化锌沉淀,导致参与螯合反应的锌离子减少^[21-22]。综合考虑螯合率及螯合物得率,选择较优螯合 pH 为 8.0。

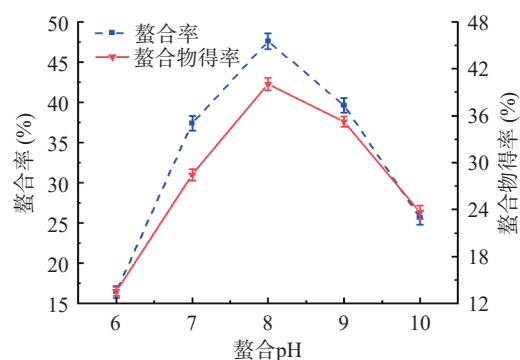


图 2 螯合 pH 对螯合率及螯合物得率的影响

Fig.2 Effect of chelating pH on the chelation rate and chelate yield

2.1.3 螯合温度对螯合率及螯合物得率的影响 图 3 为不同螯合温度对螯合率及螯合物得率的影响。螯合率及螯合物均随螯合温度的升高而先增加后降低,并在螯合温度为 70 °C 时达到最大值。螯合温度较低时,随着螯合温度的升高,反应体系的分子运动加快,增加了银杏肽与锌离子的碰撞几率,螯合率及螯合物得率上升;螯合温度较高时,随着螯合温度的升高,银杏肽结构可能被破坏,减少了螯合位点,或者生成的肽锌螯合物结构不稳定^[23]。综合考虑螯合率及

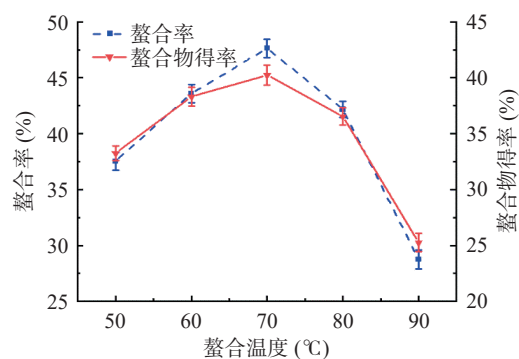


图 3 螯合温度对螯合率及螯合物得率的影响

Fig.3 Effect of chelating temperature on the chelation rate and chelate yield

螯合物得率,选择较优螯合温度为 70 °C。

2.1.4 螯合时间对螯合率及螯合物得率的影响 如图 4 所示,当螯合时间在 1.0~2.0 h 时,螯合率及螯合物得率均随着螯合时间的延长而升高,当螯合时间超过 2.0 h 后,螯合率及螯合物得率的增幅均趋于平缓。螯合时间从 2.0 h 延长至 3.0 h 时,螯合率及螯合物得率增幅趋于平缓。综合考虑螯合率及螯合物得率,选择较优螯合时间为 2.0 h。

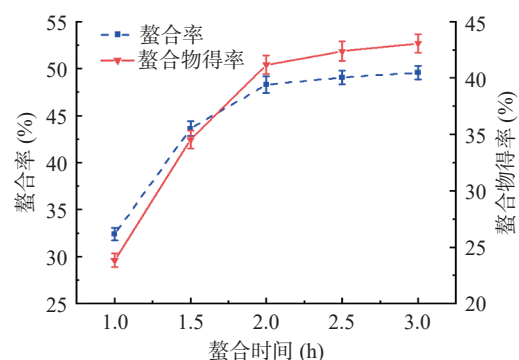


图 4 螯合时间对螯合率及螯合物得率的影响

Fig.4 Effect of chelating time on the chelation rate and chelate yield

2.2 响应面法优化结果

以螯合率为响应值,采用 Box-Behnken 试验设计,优化 Zn-GBP 的制备工艺参数。Box-Behnken 试验设计及结果如下表 3 所示。

2.2.1 回归模型的建立与检验 利用 Design Expert 软件对表 3 数据进行多元非线性回归分析,得到螯合率(Y)与肽锌比(A)、螯合 pH(B)、螯合温度(C)和螯合时间(D)的二次多项回归方程: $Y = 48.06 + 1.00A + 2.66B + 1.24C + 1.37D - 1.78AB + 4.01AC + 0.20AD - 3.80BC + 1.06BD - 0.47CD - 3.97A^2 - 5.64B^2 - 7.88C^2 - 7.03D^2$ 。对该回归方程进行方差分析,结果见表 4。

由表 4 可知,该模型达极显著水平($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.94,表明该回归方程具有较高的拟合度和可信度,误差较小,可用于分析和预测 Zn-GBP 的制备工艺。

一次项中,A 的回归系数显著($P < 0.05$),B、C、

表3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken experiment

试验号	A: 肽锌比	B: 螯合pH	C: 螯合温度	D: 螯合时间	Y: 螯合率(%)
1	0	0	0	0	47.90
2	1	0	0	1	40.17
3	0	0	-1	1	34.91
4	1	0	-1	0	31.69
5	0	0	1	-1	31.36
6	0	-1	0	1	31.88
7	-1	0	-1	0	36.29
8	1	-1	0	0	37.12
9	1	0	0	-1	37.06
10	0	-1	1	0	37.52
11	1	0	1	0	43.73
12	0	-1	-1	0	28.03
13	-1	1	0	0	42.37
14	0	0	0	0	48.63
15	0	0	0	0	46.43
16	0	1	-1	0	40.56
17	0	1	0	1	38.91
18	-1	0	1	0	32.28
19	1	1	0	0	39.65
20	-1	0	0	-1	35.74
21	-1	-1	0	0	32.71
22	0	-1	0	-1	33.56
23	-1	0	0	1	38.05
24	0	0	1	1	35.5
25	0	0	0	0	48.63
26	0	1	1	0	34.86
27	0	1	0	-1	36.37
28	0	0	0	0	48.71
29	0	0	-1	-1	28.90

表4 回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance with regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	969.88	14	69.28	33.85	<0.0001	**
A	11.96	1	11.96	5.84	0.0299	*
B	84.80	1	84.80	41.44	<0.0001	**
C	18.43	1	18.43	9.00	0.0095	**
D	22.50	1	22.50	10.99	0.0051	**
AB	12.71	1	12.71	6.21	0.0259	*
AC	64.40	1	64.40	31.47	<0.0001	**
AD	0.16	1	0.16	0.08	0.7839	
BC	57.68	1	57.68	28.19	0.0001	**
BD	4.45	1	4.45	2.18	0.1624	
CD	0.87	1	0.87	0.427	0.5240	
A ²	102.40	1	102.40	50.039	<0.0001	**
B ²	206.21	1	206.21	100.76	<0.0001	**
C ²	402.48	1	402.48	196.66	<0.0001	**
D ²	320.53	1	320.53	156.62	<0.0001	**
残差	28.65	14	2.047			
失拟	24.90	10	2.49	2.65	0.1800	
误差	3.75	4	0.94			
总和	998.53	28				

注: *表示显著, $P<0.05$; **表示极显著, $P<0.01$ 。

D 的回归系数极显著($P<0.01$); 二次项的回归系数均极显著($P<0.01$); 交互项中, AB 的回归系数显著($P<0.05$), AC、BC 的回归系数极显著($P<0.01$), 表明肽锌比与螯合温度、肽锌比与螯合 pH、螯合温度与螯合 pH 等因素间的交互效应对螯合率有显著影响。

2.2.2 交互效应分析 响应面坡度越陡峭, 表明两因素间的交互效应对螯合率的影响越大。图 5A 为肽锌比与螯合 pH 的交互效应对螯合率的影响。当肽锌比从 2:1 上升到 3:1 时, 螯合率随之增加; 肽锌比超过 3:1 后, 螯合率随之下降。螯合 pH 从 7.0 提高到 8.0 时, 螯合率随之增加; 螯合 pH 超过 8.0 后, 螯合率逐渐下降。图 5B 为肽锌比与螯合温度的交互效应对螯合率的影响。当肽锌比为 3:1 左右, 螯合温度为 70 °C 左右时, 螯合率较高。图 5C 为螯合 pH 与螯合温度的交互作用对螯合率的影响。当螯合 pH 处于较低水平时, 随着螯合温度的增大, 螯合率先急剧增加后缓慢降低; 当螯合 pH 处于较高水平时, 随着螯合温度的增大, 螯合率先缓慢增加后急剧降低。

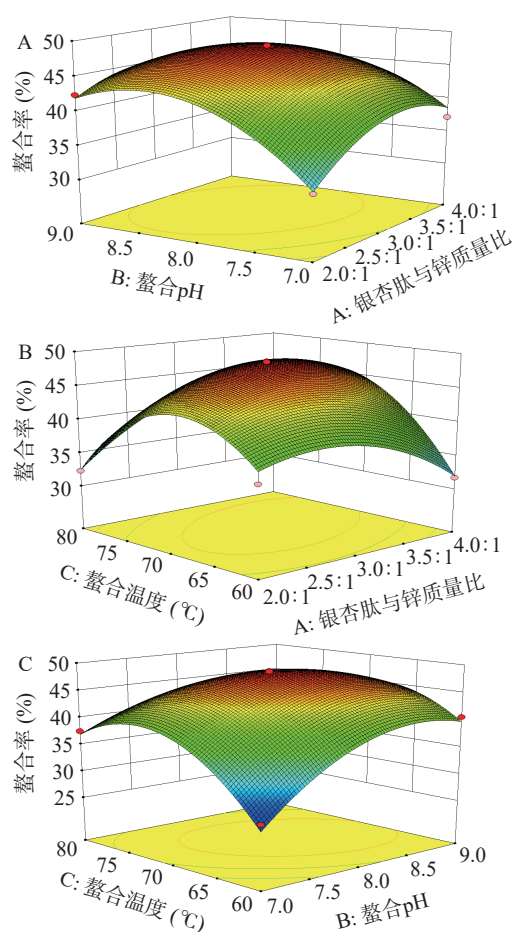


图5 交互效应对银杏肽锌螯合率的影响

Fig.5 Interactive effect on the chelation rate of *Ginkgo biloba* peptides-zinc

2.2.3 最优提取工艺优化以及验证试验 对上述回归方程求二阶偏导, 得到 Zn-GBP 的最佳制备工艺参数为: 肽锌比 3.11:1、螯合 pH 8.21、螯合温度 70.51 °C、螯合时间 2.06 h, 在此条件下螯合率的理论值为 49.50%。为便于实际操作, 将最佳工艺参数调整为肽锌比 3:1、螯合 pH 8.2、螯合温度 70 °C、螯合时间 2 h。在此修正条件下, 实测螯合率为 49.23%±0.35%(n=3), 与理论值较一致, 表明此模型可用于指导生产实践; 在此工艺条件下, 螯合物得率

为 $42.34\% \pm 0.45\%$ ($n=3$)。

2.3 体外模拟胃肠道消化分析

图 6 为 Zn-GBP 与 ZnSO_4 分别经模拟胃肠道消化后的锌离子溶解率。Zn-GBP 与 ZnSO_4 经人工胃液消化后的锌离子溶解率分别为 $99.23\% \pm 2.4\%$ 和 $90.86\% \pm 2.3\%$, 存在显著差异 ($P < 0.05$); 经人工肠液消化后的锌离子溶解率分别为 $69.47\% \pm 2.3\%$ 和 $45.83\% \pm 2.1\%$, 亦存在显著差异 ($P < 0.05$)。Zn-GBP 经人工胃液消化后表现出良好的锌离子溶解率, 原因可能是 Zn-GBP 具有良好的稳定性, 在胃蛋白酶水解过程中环状螯合结构未被破坏^[24]。Zn-GBP 经人工肠液消化后锌离子溶解率有一定的降低, 可能是因为 Zn-GBP 的螯合结构被胰蛋白酶部分水解, 游离出的锌离子在肠液环境中生成氢氧化锌沉淀^[25]。 ZnSO_4 经人工肠液消化后的锌离子溶解率大幅降低, 是因为大量的锌离子形成了沉淀。

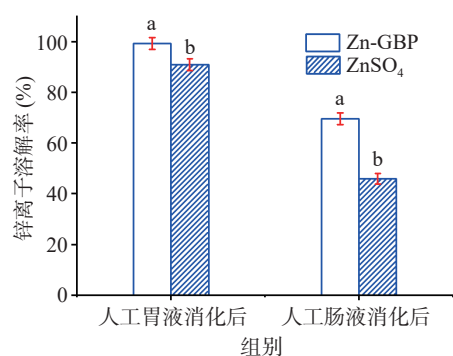


图 6 银杏肽锌螯合物与 ZnSO_4 经模拟胃肠道消化后锌离子溶解率的比较

Fig.6 Comparison of dissolution rates of zinc ions from Zn-GBP and zinc sulfate after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

注: 同组不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 7 同。

图 7 为 Zn-GBP 与 ZnSO_4 分别经人工肠道消化后的渗透率。Zn-GBP 与 ZnSO_4 经人工肠液消化后的渗透率分别为 $47.57\% \pm 1.8\%$ 和 $23.42\% \pm 1.3\%$, 二者存在显著差异 ($P < 0.05$)。Zn-GBP 的渗透率高于 ZnSO_4 的原因是 Zn-GBP 经胃肠道消化后只有部

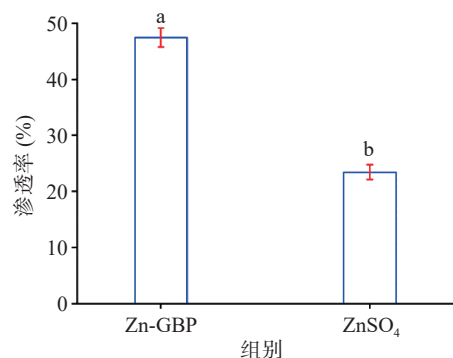


图 7 银杏肽锌螯合物与 ZnSO_4 经模拟肠道消化后渗透率的比较

Fig.7 Comparison of permeabilities of zinc ions from Zn-GBP and zinc sulfate after *in vitro* simulated intestinal digestion

分被降解, 可通过透析袋; 大多数锌离子形成了沉淀, 无法通过透析袋^[21]。综上, 锌离子溶解率和渗透率结果表明, Zn-GBP 在胃肠道消化过程中具有良好的稳定性, 避免了无机锌盐在肠道环境中因形成沉淀而导致生物利用率的问题。

2.4 体外抗氧化活性分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 受试物对 DPPH 自由基清除能力主要依赖于其供氢能力, 当 DPPH 自由基接受供体提供的氢原子时, 奇数电子的氮原子减少, 进而导致反应体系的吸光度降低^[26]。Zn-GBP 和 GBP 对 DPPH 自由基的清除能力如图 8 所示。由图可知, 在 20~1000 mg/L 的质量浓度下, Zn-GBP 和 GBP 对 DPPH 自由基的清除率均随质量浓度增加而增大; Zn-GBP 对 DPPH 自由基的清除率始终高于 GBP。在低质量浓度下, Zn-GBP 清除 DPPH 自由基能力低于 GSH; 而当质量浓度高于 800 mg/L 时, Zn-GBP 对 DPPH 自由基的清除能力与 GSH 相当。

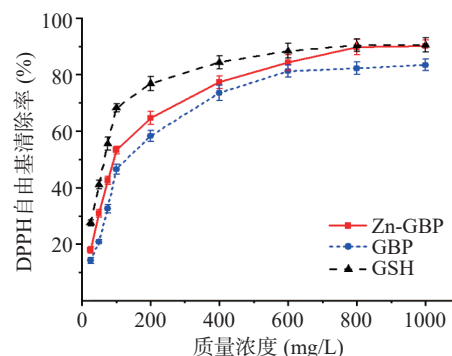


图 8 银杏肽锌螯合物和银杏肽对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.8 Scavenging effects of Zn-GBP and GBP against DPPH radicals

EC_{50} 是评价抗氧化能力的重要指标, EC_{50} 越小表明受试样品的抗氧化能力越强。Zn-GBP、GBP 和 GSH 清除 DPPH 自由基的非线性回归方程分别为 $y = -31.12 + 18.01 \ln(x - 10.65)$, $R^2 = 0.9921$; $y = -48.28 + 19.77 \ln(x - 4.24)$, $R^2 = 0.9778$; $y = 3.79 + 13.20 \ln(x - 19.38)$, $R^2 = 0.9646$ 。计算得到, Zn-GBP、GBP 和 GSH 清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 分别为 101、148 和 52.5 mg/L。由 EC_{50} 可知, Zn-GBP 清除 DPPH 自由基能力高于 GBP, 但低于 GSH。

2.4.2 ABTS⁺自由基清除能力 ABTS⁺自由基在 734 nm 处有最大吸收峰, 加入受试样品后, 如果 734 nm 的吸光度降低, 则表明受试物具有清除 ABTS⁺自由基能力。图 9 为 Zn-GBP 和 GBP 对 ABTS⁺自由基的清除能力。由图可知, 在测定的质量浓度下, Zn-GBP 和 GBP 对 ABTS⁺自由基的清除率均随质量浓度增加而增大; Zn-GBP 对 ABTS⁺自由基的清除率始终高于 GBP。质量浓度在 25~100 mg/L 范围内, Zn-GBP 清除 ABTS⁺自由基能力低于 GSH; 而当质量浓度高于 100 mg/L 时, Zn-GBP 对 ABTS⁺自由基的清除能力始终高于 GSH。

Zn-GBP、GBP 和 GSH 清除 ABTS⁺自由基的非线性回归方程分别为 $y = -27.08 + 18.16 \ln(x - 13.97)$, $R^2 = 0.9587$; $y = -31.79 + 17.99 \ln(x - 12.93)$, $R^2 = 0.9644$; $y = 10.27 + 14.26 \ln(x - 17.09)$, $R^2 = 0.9550$ 。计算得到, Zn-GBP、GBP 和 GSH 清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 分别为 83.6、107 和 85.5 mg/L。由 EC₅₀ 可知, Zn-GBP 清除 ABTS⁺自由基能力高于 GBP 和 GSH。

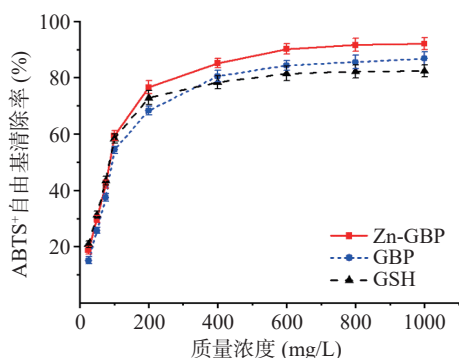


图9 银杏肽锌螯合物和银杏肽对 ABTS⁺自由基的清除能力
Fig.9 Scavenging effects of Zn-GBP and GBP against ABTS⁺ radicals

2.4.3 还原能力 采用铁氰化钾法测定受试物的还原能力时,如果受试物具有还原能力,则铁氰化钾被受试物还原为亚铁氰化钾,亚铁氰化钾进一步与三氯化铁反应生成亚铁氰化铁,后者在 700 nm 处有最大吸收峰,利用吸光度评价受试物还原能力的强弱。铁氰化钾法测定的 Zn-GBP 和 GBP 的还原能力如图 10 所示。在测定的质量浓度下, Zn-GBP、GBP 和 GSH 的还原能力均随着质量浓度的增加而提高。当质量浓度为 1 g/L 时, Zn-GBP、GBP 和 GSH 的还原能力分别为 0.386、0.353、0.426; 质量浓度为 3 g/L 时, Zn-GBP、GBP 和 GSH 的还原能力分别为 0.971、0.892、1.037。由此可知, Zn-GBP、GBP 和 GSH 的还原能力强弱顺序为 GSH>Zn-GBP>GBP。对分光光度法而言,当吸光度大于 1.0 时,测量误差较大,故不再进一步提高待测样液的质量浓度。

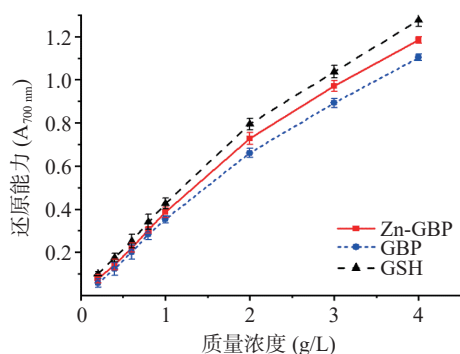


图10 铁氰化钾法测定的银杏肽锌螯合物和银杏肽的还原能力

Fig.10 Reduction power of Zn-GBP and GBP determined by potassium ferricyanide method

3 结论

通过单因素试验及 Box-Behnken 试验设计, 获

得了 Zn-GBP 的最佳制备工艺参数为银杏肽与锌质量比 3:1、螯合 pH 8.2、螯合温度 70 ℃、螯合时间 2 h; 在此条件下, 螯合率为 49.23%±0.35%(n=3), 螯合物得率为 42.34%±0.45%(n=3)。与无机锌盐相比, Zn-GBP 经人工胃液消化后表现出良好的锌离子溶解率和渗透率, 具有较好的生物利用率。Zn-GBP 具有较好的清除 DPPH 自由基、清除 ABTS⁺自由基能力和还原能力, 且较 GBP 有所提高, TOP-2 清除 DPPH 和 ABTS⁺自由基的 EC₅₀ 值分别为 101 和 83.6 mg/L。本研究得到了一种具有良好抗氧化活性且生物利用率较高的 Zn-GBP, 获得了该肽锌螯合物的最佳制备工艺参数, 后续将进一步筛选并表征高抗氧化活性的肽段、分析抗氧化作用机制及构效关系。

参考文献

- [1] 杨月欣. 中国食物成分表: 第一册[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2018: 116-117. [YANG Y X. Table of Chinese Food ingredients: Volume one[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2018: 116-117.]
- [2] 黄文. 白果活性蛋白的分离、纯化、结构及其生物活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2002: 51-64. [HUANG W. Studies on the separation, purification, structure of ginkgo seed protein and its biological activities[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2002: 51-64.]
- [3] 赵珮妮, 和法涛, 宋辉, 等. 白果的特异生物活性和药理作用研究进展[J]. 化工进展, 2017, 36(S1): 366-371. [ZHAO P N, HE FT, SONG Y, et al. Research progress of specific bioactivity and pharmacological action of ginkgo seeds[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017, 36(S1): 366-371.]
- [4] 张焕新, 臧大存, 刘靖, 等. 银杏肽的抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 27-29. [ZHANG H X, ZANG D C, LIU J, et al. Antioxidant activity of ginkgo peptides[J]. Food Research and Development, 2008, 29(12): 27-29.]
- [5] 贾韶千, 吴彩娥, 范龔健, 等. 双酶法制备银杏抗氧化肽工艺研究[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 201-206. [JIA S Q, WU C E, FAN G J, et al. Preparation of antioxidant peptides derived from *Ginkgo biloba* Kernel by dual-enzymatic method[J]. Food Science, 2011, 32(21): 201-206.]
- [6] 贾韶千, 吴彩娥, 范龔健, 等. 银杏抗氧化肽的分离纯化及活性鉴定[J]. 农业机械学报, 2011, 42(6): 152-155. [JIA S Q, WU C E, FAN G J, et al. Purification and activity identification of ginkgo antioxidant peptide[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(6): 152-155.]
- [7] MA F F, WANG H, WEI C K, et al. Three novel ACE inhibitory peptides isolated from *Ginkgo biloba* seeds: Purification, inhibitory kinetic and mechanism[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019(9): 1579.
- [8] SUN W, WU C, FAN G, et al. Preparation of a functional beverage with α -glucosidase inhibitory peptides obtained from ginkgo seeds[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 58(12): 4495-4503.
- [9] 郑义, 李诗颖, 李闯, 等. 银杏肽对高脂膳食诱导的高脂血症小鼠的降脂作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 417-423. [ZHENG Y, LI S Y, LI C, et al. Lipid-lowering effect of *Ginkgo biloba* peptides on high-fat diet induced hyperlipidemia in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 417-423.]

- [10] 郑义,李诗颖,糜心怡,等.银杏肽对急性酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J].食品与发酵工业,2021,47(21):109-114. [ZHENG Y, LI S Y, MI X Y, et al. Protective effect of *Ginkgo biloba* peptides on acute alcoholic liver injury in mice[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 109-114.]
- [11] 杨月欣,葛可佑.中国营养科学全书[M].北京:人民卫生出版社,2019:141-145. [YANG Y X, GE K Y. An overview of Nutrition Sciences[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019: 141-145.]
- [12] 秦立强,李德明,杨晓光.锌的膳食参考摄入量研究进展[J].卫生研究,2022,51(4):523-525. [QIN L Q, LI D M, YANG X G. Research progress of dietary reference intake of zinc[J]. Journal of Hygiene Research, 2022, 51(4): 523-525.]
- [13] 王子怀,胡晓,李来好,等.肽-金属离子螯合物的研究进展[J].食品工业科技,2014,35(8):359-363. [WANG Z H, HU X, LI L H, et al. Research progress in peptide-mineral ion complexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(8): 359-363.]
- [14] 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.
- [15] WANG B, XIAO S, CHEN X, et al. Structural characterisation, gastrointestinal digestion stability and transepithelial transport study of casein peptide-zinc chelate[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(5): 2770-2778.
- [16] LIU T, JI X, ZOU L, et al. Chicken skin-derived collagen peptides chelated zinc promotes zinc absorption and represses tumor growth and invasion *in vivo* by suppressing autophagy[J]. Frontiers in Nutrition, 2022: 1743.
- [17] 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. [ZHENG Y M, YUAN Y, SU D X. Preparation process optimization of soy peptides-zinc chelate and its structural characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(14): 160-165.]
- [18] 李诗颖,陈琳,糜心怡,等.提取方法对银杏蛋白功能特性及抗氧化活性的影响[J].食品工业科技,2021,42(20):37-43. [LI S Y, CHEN L, MI X Y, et al. Effects of extraction methods on functional properties and antioxidant activity of *Ginkgo biloba* proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 37-43.]
- [19] SUN R, LIU X, 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.
- [20] ORAIZA M. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [21] 富天昕,张舒,盛亚男,等.绿豆多肽锌螯合物的制备及其结构与体外消化的分析[J].食品科学,2020,41(4):59-66. [FU T X, ZHANG S, SHENG Y N, et al. Preparation, structure and *in vitro* digestibility of zinc-chelating mung bean peptide[J]. Food Science, 2020, 41(4): 59-66.]
- [22] 王小林,孔祥珍,华欲飞,等.大豆分离蛋白肽钙螯合物的制备及表征[J].中国油脂,2017,42(7):50-54. [WANG X L, KONG X Z, HUA Y F, et al. Preparation and characterization of soybean protein isolate peptide-calcium chelate[J]. China Oils and Fats, 2017, 42(7): 50-54.]
- [23] 吴明泽,王垒,王笑,等.鸡胚肽锌螯合物的制备工艺及免疫调节功能研究[J].食品工业科技,2020,41(12):126-132. [WU M Z, WANG L, WANG X, et al. Preparation of chicken embryo peptide zinc chelate and its immunoregulatory function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 126-132.]
- [24] 柯泉,胡晓,杨贤庆,等.罗非鱼皮胶原蛋白肽-锌螯合物的制备及结构表征与体外消化分析[J].食品与发酵工业,2021,47(14):38-44. [KE X, HU X, YANG X Q, et al. Preparation, structure characterization and *in vitro* gastrointestinal digestion of tilapia skin collagen peptide-zinc chelate[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14): 38-44.]
- [25] CHEN D, LIU Z Y, HUANG W Q, et al. Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate[J]. Journal of Functional Food, 2013, 5(2): 689-697.
- [26] 包怡红,王芳,王文琼.大豆多肽硒螯合物的制备及抗氧化活性分析[J].食品科学,2013,34(16):27-32. [BAO Y H, WANG F, WANG W Q. Preparation and antioxidant activity of selenium-chelating soybean peptides[J]. Food Science, 2013, 34(16): 27-32.]