

γ -聚谷氨酸钙的制备及其性质研究

张绪瑛, 杨 燕, 黄 静, 冯 震, 马骁骏, 汪 洋, 吴自荣*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘 要: 用 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)作为载体, 整合金属离子钙, 得到一种新型的钙制剂, 并对其制备工艺、结构表征及生物学活性进行了初步研究。结果表明, 当 $-\text{COOH}$ 与 Ca^{2+} 摩尔比为 1:2 时, 结合率可达 54%。经检测 γ -聚谷氨酸钙具有缓释能力, 并且其缓释能力不依赖于胃酸, 在酸性及中性条件下均能缓慢释放 Ca^{2+} 。小鼠实验表明 γ -聚谷氨酸钙能被小鼠吸收利用, 骨钙及骨磷都有所增加。通过本研究得到一种不依赖胃酸, 可持续释放 Ca^{2+} 并能被生物体吸收从而增加其骨钙的新钙制剂。

关键词: γ -聚谷氨酸(γ -PGA); 钙; 缓释

Study on Preparation and Properties of γ -Polyglutamic Acid Calcium Salt

ZHANG Xu-ying, YANG Yan, HUANG Jing, FENG Zhen, MA Xiao-jun, WANG Yang, WU Zi-rong*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: To develop a new calcium supplement, the low molecular γ -polyglutamic acid (γ -PGA) was used as a carrier to bind calcium ion. The preparation technology, structure characterization and biologic activity were primarily studied. The results showed that the best binding rate is 54% when carboxyl and calcium ion are bound at the molar ratio of 1:2. The γ -PGA-Ca displays slow-release activity, which does not depend on gastric acid and can release calcium ion in both acid and neutral solutions. The mice experiment indicated that this new calcium supplement can be absorbed by mice and increase both of calcium and phosphonium contents in mice bone. In conclusion, the present study lays a new way to obtain a new calcium supplement, which can sustainedly release Ca^{2+} without depending on gastric acid and may be absorbed by organism to increase the calcium and phosphonium contents in bone.

Key words: poly- γ -glutamic acid (γ -PGA); calcium; slow-release

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0076-04

近年来, 人类钙营养不足的问题受到了广泛重视, 无论是老人还是儿童, 缺钙是全球性的营养问题^[1]。一般, 食物是最好的钙源。但对那些仅靠食物不能满足钙需求的人们来说, 食用补钙剂是必需的。

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是自然界中微生物发酵产生的水溶性多聚氨基酸, 具有超强的吸附性和生物可降解性, 降解产物为人体必需的氨基酸, 是一种优良的高分子材料, 可作为重金属离子吸附剂、缓释剂以及药物载体等, 在食品、医药、等产业均有很大的商业价值和社会价值^[2]。

本实验用 γ -聚谷氨酸作为载体, 整合钙离子, 得到一种新型补钙剂 γ -聚谷氨酸钙(γ -PGA-Ca), 并对其制备工艺、结构表征及生物学活性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

枯草芽孢杆菌(*Bacillus. sp*)由本实验室保存; 出生 20d 的昆明雄性小鼠(体重 $8 \pm 1\text{g}$)由复旦大学实验动物中心提供。

γ -聚谷氨酸标准品 Sigma 公司; VA、VD 滴剂浙江海力生制药有限公司; 钙和磷测定试剂盒 上海名典生物工程有限公司; 其他试剂均为进口分装分析纯。

752 型紫外可见分光光度计 上海欣贸仪器有限公司; Nexus 670 傅立叶红外光谱仪 Thermo Electron 公司。

1.2 方法

1.2.1 小分子 γ -聚谷氨酸的制备及检测

将 1ml 冻存菌种接入 LB 培养基, 37°C 、220 r/min, 振荡培养 11h。按 5% 接种量接入发酵培养基(5% 麦芽糖、5% 酵母浸出液、3% 谷氨酸钠、1% 氯化钠、

收稿日期: 2008-06-03

作者简介: 张绪瑛(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: zhangxy@ecnu.cn

* 通讯作者: 吴自荣(1938-), 男, 教授, 研究方向为基因工程药物。E-mail: zrwu@bio.ecnu.edu.cn

0.5% 磷酸二氢钾、0.05% 硫酸镁), 37℃、220r/min, 振荡培养 48h 后取发酵液调 pH 值至 1.0~3.0, 8000r/min、30min 离心去菌体, 调上清液 pH7.0, 加入 3 倍体积预冷的无水乙醇, 搅拌得沉淀, 干燥得 γ -聚谷氨酸粗品, 称重。用蒸馏水溶解粗品, 对蒸馏水反复透析, 透析液冷冻干燥得纯品^[3]。

配制 1% 纯化的大分子 γ -聚谷氨酸溶液, 将 pH 值调至 2.0 左右, 于 121℃、0.1MPa 反应 15min, 随即置于冰上迅速冷却。当溶液温度降至室温时, 将 pH 值调回 7.0。将降解前后的两种 γ -聚谷氨酸溶液和已知分子量的 γ -聚谷氨酸标准品在 80V 电压下进行 0.8% 的琼脂糖电泳约 30min, 然后用亚甲基蓝染色 40min 后蒸馏水脱色, 拍照, 并通过凝胶渗透色谱检测降解后 γ -聚谷氨酸分子量。

1.2.2 γ -聚谷氨酸钙的制备及钙含量测定

配制 1% 小分子 γ -聚谷氨酸与 0.5mol/L CaCl_2 溶液, 将其按 $-\text{COOH}$ 与 Ca^{2+} 的不同摩尔浓度(4:1、2:1、1:1、1:2)于不同温度(70、50、37℃)下反应 2h。将反应混合液用 4 倍体积的无水乙醇沉淀结合产物, 8000r/min 离心 10min 后收集沉淀和上清液。沉淀再用无水乙醇洗涤, 离心收集上清液和沉淀, 重复以上过程 4 次。最后将沉淀高温干燥得 γ -聚谷氨酸钙, 用钙测定试剂盒测定上清液中未结合的 Ca^{2+} 含量。

1.2.3 γ -聚谷氨酸钙的产物结构表征分析

取少许 γ -聚谷氨酸以及 γ -聚谷氨酸钙样品, 与少量 KBr 研磨压片, 高温干燥, 用红外光谱仪室温测定其结构。

1.2.4 缓释能力测定

用不同 pH 值的生理盐水(1.2、3.0、5.0、7.0)分别配制含 Ca^{2+} 8mg/ml 的 γ -聚谷氨酸钙与碳酸钙溶液 10ml 置于透析袋内, 外液为相同 pH 值的等渗生理盐水 35ml。37℃ 透析 24h, 于 0、0.5、1、2、6、10、24h 时分别取样, 测外液 Ca^{2+} 含量。

1.2.5 动物实验

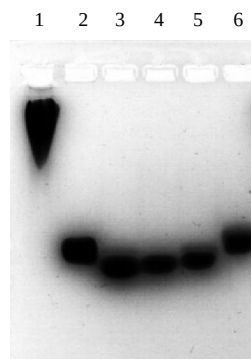
低钙饲料的制备: 每 100g 低钙饲料含玉米 89g, 黄豆 10g, 盐 1g, VA700IU, VD40IU^[4]。

实验动物及分组: 昆明雄性小鼠, 体重 $8 \pm 1\text{g}$, 随机分为 3 组, 每组 8 只, 每组均给予低钙饲料。A 对照组: 给予生理盐水; B 碳酸钙组: 给予碳酸钙; C 聚谷氨酸钙组: 给予 γ -聚谷氨酸钙。灌胃给药, 给药量均为 $160\text{mg Ca}^{2+}/\text{kg} \cdot \text{d}$ 。实验期间, 自由进食和饮去离子水。实验结束, 21d 后断头处死小鼠, 取右侧股骨测股骨矿物质含量。实验数据用 Excel 软件处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 小分子 γ -聚谷氨酸的制备及检测

通过微生物发酵, 经透析纯化后, 得到大分子 γ -聚谷氨酸纯品产量约为 17g/L。经高温高压酸降解得到小分子 γ -聚谷氨酸, 其电泳结果见图 1。降解后 γ -聚谷氨酸分子量变小, 通过与已知分子量的 γ -聚谷氨酸标准品相比, 可知降解后的小分子 γ -聚谷氨酸分子量在 20~60kD 之间。将降解后的小分子 γ -聚谷氨酸样品进行凝胶渗透电泳^[5], 分子量分布见表 1。根据凝胶渗透电泳的结果, γ -聚谷氨酸被降解为小分子, 分子量为 6~30kD, 其中分子量在 29783 以上的占 10%, 29783~18535D 的占 20%, 18535~13114D 的占 20%, 13114~9267.4D 的占 20%, 9267.4~5744.2D 的占 20%, 5744.2D 以下的占 10%。



1. 降解前 γ -聚谷氨酸; 2. 降解后 γ -聚谷氨酸; 3~6. γ -聚谷氨酸标准品, 分子量分别为 5000、14500、20500、64000。

图 1 大、小分子 γ -聚谷氨酸凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of large and small molecular γ -PGA

表 1 γ -聚谷氨酸分子量分布

Table 1 Molecular weight distribution of γ -PGA

M_n 数均 分子量(D)	M_w 重均 分子量(D)	M_p 峰位 分子量(D)	M_z Z 均 分子量(D)	M_v 黏均 分子量(D)
10875	15853	14208	22471	0

2.2 γ -聚谷氨酸钙制备

配制 1% 小分子 γ -聚谷氨酸水溶液, 按其 $-\text{COOH}$ 与 Ca^{2+} 的不同离子浓度反应, 经钙测定试剂盒测定结合产物中 Ca^{2+} 含量, 其结合率见表 2。不同温度下结合反应的结果见表 3。由表 2 可知, γ -聚谷氨酸与 Ca^{2+} 反应的结合率随 Ca^{2+} 浓度的增高而增高, 当二者摩尔比为 1:2 时, 结合率接近 1:0.54, 而温度对其结合反应影响较小。

表2 小分子 γ -聚谷氨酸钙制备反应的结合率及结合摩尔比Table 2 Binding rate and binding mole ratio between small molecular γ -PGA and Ca^{2+} at different mixture ratios

$-\text{COOH}:\text{Ca}^{2+}$ 反应摩尔比	结合率(%)	$-\text{COOH}:\text{Ca}^{2+}$ 结合摩尔比
4:1	96.36	1:0.241
2:1	82.88	1:0.414
1:1	51.37	1:0.514
1:2	55.96	1:0.54

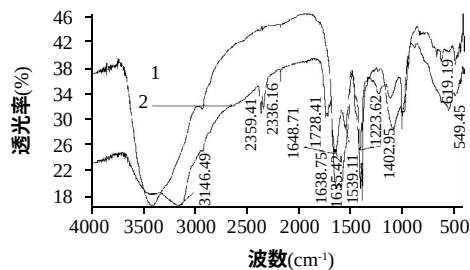
表3 不同温度对小分子 γ -聚谷氨酸钙制备的影响Table 3 Effects of different temperatures on preparation of small molecular γ -PGA-Ca

反应温度($^{\circ}\text{C}$)	结合率(%)	$-\text{COOH}:\text{Ca}^{2+}$ 结合摩尔比
37	28.16	1:0.54
50	29.42	1:0.56
70	29.24	1:0.54

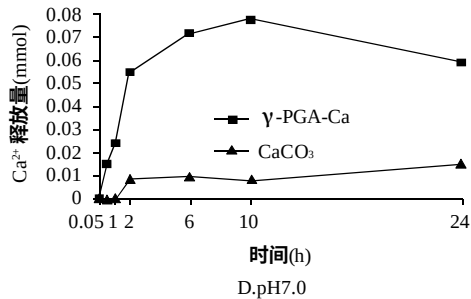
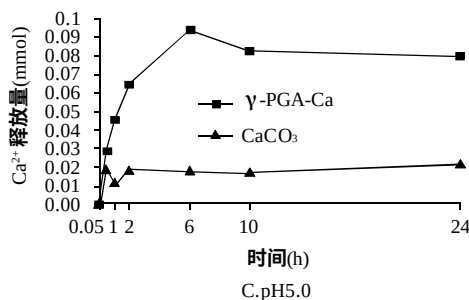
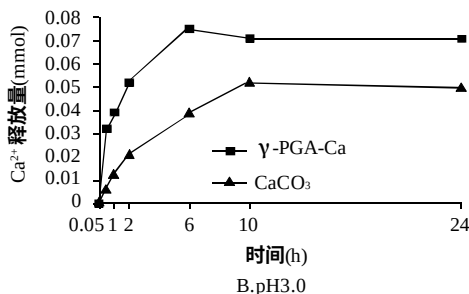
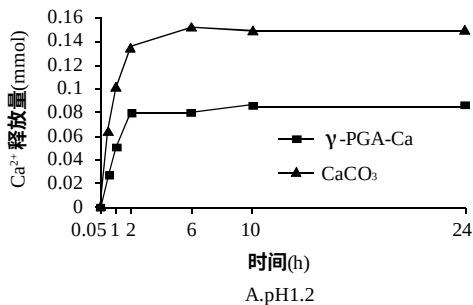
注： $-\text{COOH}:\text{Ca}^{2+}$ 反应摩尔比为 1:2。2.3 γ -聚谷氨酸钙的结构分析

由图2可知,与 γ -聚谷氨酸比较, γ -聚谷氨酸钙的氨基伸缩振动吸收峰($\text{N}-\text{H}$)^[6]由 3146.49cm^{-1} 移动到 3408.86cm^{-1} ,向高波位方向移动了262.37个波数,酰胺I带 1728.41cm^{-1} 消失,且吸收峰 1648.71cm^{-1} 和 1635.42cm^{-1} 分别移动到 1638.75cm^{-1} 和 1588.93cm^{-1} ;2359.41、2336.16、1530.11、1223.63 cm^{-1} 处吸收峰几乎完全被掩盖。在低波数由 619.19cm^{-1} 向 546.13cm^{-1} 移动。

通过对比发现酰胺A向高波数方向移动,以及酰胺I带向低波数方向移动,说明了 γ -聚谷氨酸的氨基和羧基都参与了与 Ca^{2+} 的配位,形成了新的化合物^[7-8]。

1. γ -聚谷氨酸钙; 2. γ -聚谷氨酸。图2 γ -聚谷氨酸与 γ -聚谷氨酸钙红外光谱分析图Fig.2 Infrared spectra of γ -PGA and γ -PGA-Ca2.4 γ -聚谷氨酸钙缓释活性的测定

胃肠道的pH值明显影响口服药物剂型的释药行为。胃pH值在空腹和饱腹时分别为1.5~2和2~6,这会影响到对pH值敏感药物的稳定性。碳酸钙属于胃酸依赖型药物,胃酸分泌不足将影响其释放。比较碳酸钙与 γ -聚谷氨酸钙在不同pH值(1.2、3.0、5.0、7.0)条件下的释放情况,如图3。

图3 碳酸钙与 γ -聚谷氨酸钙在不同pH值生理盐水溶液中的释放
Fig.3 Release of CaCO_3 and γ -PGA-Ca in sodium chloride at different pH values

由图3可知,碳酸钙的释放依赖于胃酸的释放,只有在pH值较低时才能完全释放,而 γ -聚谷氨酸钙的释放受胃液pH值的影响较小。且在pH值1.2,即正常胃酸条件下, γ -聚谷氨酸钙释放钙离子比碳酸钙缓慢。胃液在2h内即出现胃排空,钙离子的吸收主要在小肠,而小肠的pH值近中性,因而 γ -聚谷氨酸钙进入小肠后仍然能够持续释放。

2.5 聚谷氨酸钙与碳酸钙对小鼠骨矿物质含量的影响
给予出生20d的小鼠低钙饲料,同时分别给予两种

不同的补钙剂,聚谷氨酸钙和碳酸钙,两者钙浓度均为8mg/ml。21d后取股骨测定骨矿物质含量^[9],结果见表4。

表4 γ -聚谷氨酸钙与碳酸钙对小鼠骨矿物质含量的影响
Table 4 Effect of γ -PGA-Ca and CaCO_3 on bone mineral contents of mice

	骨重/体重(mg/g)	骨钙总量/骨重(mg/g)	骨磷总量/骨重(mg/g)
A组	2.33 ± 0.60	89.73 ± 19.70	22.78 ± 7.99
B组	2.35 ± 0.69	117.88 ± 43.54	30.75 ± 11.06
		(p=0.0589)	(p=0.0605)
变化率(%)	0.86	31.37	34.99
C组	2.08 ± 0.64	101.53 ± 9.75	24.96 ± 5.45
		(p=0.0755)	(p=0.268)
变化率(%)	-10.7	13.15	2.18

注:与对照组比较,变化率(%)=(待比较组/对照组-1)×100。

由表4可知, γ -聚谷氨酸钙与碳酸钙均可使小鼠骨钙及骨磷总量/骨重比值增大,虽然两组与对照组之间无统计学上的差异($p>0.05$),但是 γ -聚谷氨酸钙组小鼠中骨钙总量/骨重增加了31.37%,骨磷总量/骨重增加了34.99%,两者均大于碳酸钙组。说明 γ -聚谷氨酸钙增加动物骨矿物质的效果要更好。

3 讨论

钙是人体中含量最丰富的矿物质之一,被人们称作生命金属,是生命中必不可少的元素。缺乏这种重要的无机元素必然会引起一系列疾病,如儿童佝偻病、成年人软骨病、中老年人骨质疏松等。据不完全统计,现在全国医药市场上的钙补充剂有100种以上,可概括为六大类:碳酸钙,含钙量高,但其分解依赖于胃酸,不适合老年胃酸缺乏者;乳酸钙及葡萄糖酸钙,含钙量低;磷酸氢钙,崩解和吸收困难;枸橼酸钙,其吸收不依赖于胃酸;活性钙(生物钙),钙含量高,但对胃肠刺激性大;有机钙(氨基酸钙及蛋白螯合钙)。

由此可以看出,对钙补充剂而言,其作用取决于两点,即钙含量和溶解度。大多数钙片的钙含量普遍偏低,如500mg的葡萄糖酸钙仅含元素钙36mg。钙含

量低则必然导致服用者每天的服药量大大增加,既不方便,又可能会引起肠胃不适。本研究用 γ -聚谷氨酸作为载体,利用其分子链上具有数量极多、活性较高的羧基与钙离子结合,获得聚谷氨酸钙,结合率可达54%,显示出较高的载药量,因而可以制成一种钙含量较高的钙补充剂。此外,大多数钙制剂为固体,药片在肠胃道的崩解及溶解度对药物吸收有重要影响,多数钙制剂需要胃酸作用,如碳酸钙、磷酸氢钙,因而这类钙制剂不适合缺乏胃酸或胃酸分泌不足的人群。本研究获得的 γ -聚谷氨酸钙在酸性至中性pH值范围内均能缓慢释放钙离子,因此,理论上即使服用后2h经胃排入小肠, γ -聚谷氨酸钙仍然能够在小肠环境中释放出钙离子,供机体吸收,从而可以最大程度吸收钙制剂中的所有钙元素。

综上所述,本研究获得的聚谷氨酸钙具有较高的钙含量,能在酸性至中性pH值范围内均缓慢释放钙离子,表现出优良的缓释能力,并且能被机体吸收利用,增加其骨钙含量,因此具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 杨燊,邓尚贵,秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 202-206.
- [2] SAARTO T, BLOMQUIST C, VALIMAKI M, et al. Chemical castration induced by adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy cause rapid bone loss that is reduced by clodronate: a randomized study in premenopausal breast cancer patients[J]. J Clin Oncol 1997, 15(4): 1341-1347.
- [3] 胡荣章,叶海峰,金丽. γ -聚谷氨酸高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 5(12): 62-65.
- [4] 郭成浩,张辉,金毅. 不同血钙水平大鼠动物模型的建立[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 14-16.
- [5] 李金. 聚天冬氨酸钙的合成与表征[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(6): 667-669.
- [6] 周元臻,魏永锋,张维平. 壳聚糖-Ca(II)配位聚合物的合成及其性能表征[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 36-39.
- [7] 范小娜,李蕾,余磊. 稀土-蛋白质配合物合成及其傅立叶红外光谱分析[J]. 赣南医学院学报, 2001, 21(2): 107-110.
- [8] 陈广德,徐贞梅. 固相法合成甘氨酸钙配合物[J]. 精细化工, 2002, 19(12): 701-702.
- [9] 吴铁,刘瑜钰,崔燎. 红参对环磷酰胺致小鼠骨质疏松作用的研究[J]. 现代康复, 2000, 4(11): 1682-1683.