

多肽-矿质元素螯合物的研究进展

陈紫红¹, 花朋朋¹, 周文斌¹, 李再源¹, 赵立娜², 刘斌^{1,2,*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002;

2. 国家菌草工程技术研究中心, 福建福州 350002)

摘要: 多肽-矿质元素螯合物是多肽和矿质元素经由螯合反应而生成的一种新型化合物,除了可以提高矿质元素在人体内的吸收能力,螯合物还具有抗氧化、增强免疫力、降血糖等生物活性。该文主要概述了多肽-矿质元素螯合物的研究进展,阐述了多肽-矿质元素螯合物的螯合机理、制备工艺、生物活性及安全性评估,并对多肽-矿质元素螯合物的发展前景进行了展望。

关键词: 多肽; 矿质元素; 螯合物; 螯合机理

Research progress on peptide-mineral chelates

CHEN Zi-hong¹, HUA Peng-peng¹, ZHOU Wen-bin¹, LI Zai-yuan¹, ZHAO Li-na², LIU Bin^{1,2,*}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The peptide-mineral chelate, which is a new kind of compound obtained from the chelation reaction between peptides and mineral ion. It can not only enhance the absorption of minerals, but also possess some biological activities, such as antioxidant, immune enhancement and hypoglycemic capabilities. This review outlined the research status of chelate compounds, and its chelation mechanism, preparation procedure, safety assessment and bioactivity. The development prospect of peptide-mineral chelate was analysed in the last.

Key words: peptide; mineral; chelate; chelate mechanism

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)08-0350-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.060

矿质元素是在人体中除了碳、氢、氧三种以外的元素的统称,在人体中含量只有4%左右,却起着构成人体组织和维持正常生理功能的重要作用,许多人体疾病就是由于矿质元素的缺乏而引起的^[1]。随着国民经济的高速发展和人们饮食习惯的改变,许多食物经过加工如高温烹饪之后导致了矿物质的流失,而某些矿质元素在小肠内的吸收模式也在一定程度上降低了生物利用率^[2]。Hara等^[3]研究蛋白质的吸收机理发现,蛋白质主要是以小肽的形式在消化道中被吸收,当多肽和矿质元素形成螯合物之后,其能够借助肽在小肠内的吸收、转运特点以配合物的整体形式被主动吸收。多肽-矿质元素螯合物作为一种新型的矿物元素补充剂越来越受到众多学者的青睐。此外,除了能够提高矿物质元素在人体内的吸收,螯合物仍具有抗氧化、增强免疫力、降血糖等生物活性^[4],具有重要的研究意义和价值。本文主要概述多肽-矿质元素螯合物的研究进展,阐述了多肽-矿质元素螯合物的螯合机理、制备工艺及生物活

性,并对多肽-矿质元素螯合物的发展前景进行展望,以为多肽-矿质元素螯合物的进一步研究和未来应用提供参考。

1 肽与矿物质元素的螯合机理

目前,已经有许多研究利用红外光谱、质谱分析和核磁共振等方法对螯合物的生成过程进行了初步探讨,发现螯合活性主要与多肽的分子量大小、氨基酸组成及其序列和肽构象相关。

1.1 多肽的分子量大小与螯合活性的关系

多肽的螯合活性受到其分子量的影响,大多数情况下,分子量较小的多肽具有较高的活性,其原因是分子量过大会导致多肽内部的活性基团无法暴露,从而导致螯合率的降低。Torres^[5]等从鹰嘴豆中分离出的小肽(<500 Da)相对于其他更大的肽来说表现出更好的螯合活性,类似的结论也出现在Yichen^[6]和Guo^[7]等的研究中。Wang^[8]等从芝麻蛋白中得到6种与锌离子螯合能力较强的多肽,研究

收稿日期:2016-10-11

作者简介:陈紫红(1992-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术,E-mail: weilianglotus@163.com。

* 通讯作者:刘斌(1969-),男,教授,研究方向:食品生物技术研究,E-mail: liubin618@hotmail.com。

基金项目:中国自然科学基金青年基金项目(31501432);福建省科技重大专项(2014NZ2002-1);国家科技支撑计划子课题(2014BAD15B01);

“海藻营养与功能性食品研究与开发”闽海洋高新[2014]17号;福建农林大学杰出青年项目(xjq201608);福建省科学技术厅高校产学研合作项目(2017NS003)。

表明这些多肽的分子质量均小于 500 Da。但大分子的肽段有时候也会表现出较强的螯合活性。Jiang^[9]等探究分子量对钙螯合能力的影响,发现分子量低于 1 kDa 的卵黄高磷蛋白磷酸肽相对于乳清蛋白来说螯合率并没有增强,而是 1~3 kDa 的肽段的螯合率明显上升。Seth^[10]的研究结果表明与铁螯合能力最强的多肽分子量多在 10 kDa 以上。这种结论的矛盾可能是由于不同研究中的分离纯化和评估肽段大小的方法不一致导致的^[11]。

1.2 多肽的氨基酸组成及其序列与螯合活性的关系

His、Cys、Asp、Ser 和 Glu 是具有较高螯合活性的氨基酸,特别是对金属离子的螯合具有重要的作用。Hoz L 等^[11]将甘蔗酵母用三种不同的蛋白酶进行水解,将酶解液经过铁离子螯合层析等手段分离纯化出的多肽进行氨基酸的图谱分析,得出与 Fe^{2+} 螯合的相关氨基酸组成可能为 His、Lys 和 Arg,类似的结果也出现在 Sang^[12] 和 Swain^[13] 的研究中。Chen 等^[14]采用与上述同样的方法从罗非鱼鱼鳞的酶解液中分离出一种可以和钙离子高效螯合的多肽,并采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定出该肽的氨基酸序列为 Asp-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-Lys-Ile-Gly,研究发现,Asp、Gly 和 Glu 这三种氨基酸残基在该多肽的含量最高,值得提出的是, Kim^[15]、Lee^[16] 和 Jung^[17] 等分别从芝士乳清蛋白、猪血浆和鳕鱼中提取的与钙螯合的多肽氨基酸序列中同样也含有 Asp 和 Glu 残基。Palika 等^[18]从鸡蛋清中分离出一种可以和 Fe^{3+} 螯合的多肽,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱得出与 Fe^{3+} 进行配位的主要有关氨基酸为 Ser 和 Asp, Wang 等^[11]也发现了两个具有锌螯合能力较强的两个多肽片段,Asn-Cys-Ser 和 Ser-Met,分析得出 Ser 和 Cys 含有的羟基和巯基在与锌离子的螯合作用上起着重要的作用。当多肽或蛋白大量存在这几种氨基酸时,其含有的羧基、氨基以及侧链上的巯基等基团上存在的氧、氮、硫原子的孤电子对可能使局部电荷密集,在一定的条件下和金属阳离子以配位键结合形成螯合物,制造一个良好的二价金属螯合环境。

1.3 螯合过程中多肽的构象变化

除了氨基酸的序列和组成之外,在螯合过程中多肽的构象组成和变化也影响着多肽的螯合能力和螯合物的稳定性。Zhao^[19]等人分离出一种与钙离子螯合的序列为 Gly-Tyr 的二肽,通过荧光光谱、傅里叶变换红外光谱学、核磁共振等方法对螯合物进行初步结构表征,分析得出在螯合过程中该二肽的羧基和氨基发生了变化,通过提供羧基上氧原子和氨基上氮原子的孤电子对与钙离子配位形成新的化合物,这些带负电的氨基酸残基集中分布在 EF-loop 区域里,钙离子结合到 EF-loop 的 N 端部分,同时氨基酸的侧链也通过螺旋旋转改变其空间位置,重新排列成几乎相互垂直的构象,便于内部的疏水基团暴露出来,获得更多的识别位点。Wang 等^[20]将先前鉴定出的氨基酸序列为 Asn-Cys-Ser 和 Ser-Met 两种多肽进行化学合成,后与 Zn^{2+} 进行螯合探究肽和

Zn^{2+} 的螯合机理,通过 pH 电势法和电喷雾电离质谱确定在两分子水的协同作用下锌离子和配位体的比例为 1:1 进行配位,将螯合物和多肽进行红外光谱鉴定,发现在多肽羧基和水的协调作用下,多肽的羧基、羟基和巯基与锌离子形成稳固的配位键,并根据上述结论采用分子模型推测螯合物的具体结构,发现由于多肽的立体位阻关系,螯合物的结构组成都离不开水分子的参与。Li^[21]等人也发现, L-L 和 D-D 构型的二肽与铜离子形成的螯合物稳定性相近,但是却与 L-D 和 D-L 构型的存在很大差异。同时在一个多肽分子中也会含有多个配位原子,这些配位原子和矿物质元素之间以多个配位键相结合,所以所生成的螯合物也会以环状的形式出现,形成一种新的构象。靳利娥^[22]等人对蛋氨酸-硒螯合物进行了初步的结构表征,通过红外光谱发现螯合物的硫醚基伸缩振动减弱,羧基的特征吸收峰已经完全消失还带有明显的氨基吸收峰出现,说明蛋氨酸的氨基和羧基都参与到了和硒离子的配位中,可能伴有硫醚基的硫原子的协同作用;¹H 核磁共振谱和 X 衍射图谱特征得出蛋氨酸和硒离子发生配位五元环结构,形成较稳定的六元环蛋氨酸-硒螯合物。Armas^[23]等的研究表明,当锌离子含量丰富时, humanin 肽的第 8 个氨基酸侧链上的硫醇基与锌离子通过配位键形成了八面体的螯合物。在螯合过程中,无论是多肽自身的构象变化还是多肽与矿物质元素形成新的构象,都是为了更好的与矿物质元素结合形成螯合物,关于这方面的研究还比较少,阐明多肽和矿物质元素螯合物的螯合机制还需要进一步的探索。

2 多肽-矿物质元素螯合物的制备工艺

现在多肽-矿物质元素螯合物的制备工艺已经趋近成熟,主要包括蛋白提取、蛋白酶解以及多肽和矿物质元素螯合三个步骤。随着食品综合利用研究的深入,研究人员也倾向于采用各种不同来源的原料,尤其是食品加工过程中产生的下脚料作为多肽的来源,既充分利用了废弃资源,还可以提高原料的附加价值。目前已有不少相关研究报道了不同来源的下脚料被用于螯合物的制备^[24-25]。例如, Ren^[26]等以虾加工副产品为原料,以 FeSO_4 为铁源研究多肽-铁螯合物的酶解工艺,采用不同酶酶解的最优工艺条件酶解虾蛋白,以与铁的螯合能力作为参考指标,筛选出胰蛋白酶为最适酶,并采用响应面法优化得到 pH8.18,酶解时间 2 h,酶浓度为 500 U/mL 的最佳酶解条件。董亚飞^[27]等以带鱼下脚料为原料、硫酸锌为锌源,研究带鱼下脚料螯合锌离子的制备工艺。因此多肽-矿物质元素螯合物的制备工艺研究对于废弃资源的再利用和环境保护具有深远意义。

影响螯合反应的因素有很多,如 pH、物料的质量比、反应温度和时间等。为了获得更高的螯合率,目前多肽和矿物质元素螯合工艺的研究主要集中在螯合条件的优化上。崔潇等^[28]以罗非鱼鱼皮为原料,以螯合率为评价指标,研究其酶解产物与镁离子的螯合工艺条件,其中质量比对于螯合率的影响最大,

这与许先猛^[29]等的结论一致,且在单因素实验的基础上,响应面实验得到质量比为1:5, pH为7.0,温度为70℃,螯合时间为30 min的最佳螯合条件,螯合率高达84.58%。唐军虎等^[30]采用碱性蛋白酶酶解玉米蛋白粉得到玉米肽,以硫酸锌为锌源,应用响应面法得到二者螯合的最佳工艺条件为反应时间90 min, pH为5.0,温度为63℃,蛋白肽和锌的摩尔比为2:1,在此条件下,螯合率为57.9%,结果表明在玉米肽和锌离子的螯合过程中温度对螯合率的影响最大。原料的种类不同,因此所选择的最佳反应条件也不相同,因此确定最佳的螯合作用条件仍需要大量的研究。

3 多肽-矿质元素螯合物的生物活性

3.1 多肽-铁螯合物的生物活性

铁元素是人体所必需的微量元素之一,是人体血红蛋白的重要组成部分,缺铁将会导致贫血以及免疫力下降等众多疾病。 FeSO_4 作为无机铁的主要来源之一,却有着糟糕的口感和较低的吸收利用率。多肽-铁螯合物作为一种新型的补铁剂能直接被肠粘膜细胞所吸收,并且没有肠道副作用,吸收利用率高,是无机铁的3倍^[11]以上,是一种优良的补铁营养剂。

Palika等^[18]利用Caco-2细胞模型研究铁元素在小肠内的吸收机理,发现该螯合物可以诱导细胞中铁蛋白的合成从而促进铁的吸收,在小鼠的模型中也发现了这一特征^[31]。多肽-铁螯合物也具有一定的抗氧化活性,其抗氧化活性与铁结合能力有关,铁结合能力越强,抗氧化活性越高^[32]。汪学荣^[33]研究了猪血多肽亚铁螯合盐对超氧阴离子自由基和过氧化氢的清除作用,发现相对于猪血多肽来说,螯合物具有更强的抗氧化作用。在Murray^[34]和邓尚贵^[35]的研究中也发现多肽-铁螯合物也具有一定的抗菌效果,为日后抗菌剂的开发提供了一个新的思路。

3.2 多肽-钙螯合物的生物活性

钙是人体内含量最多的矿物质元素之一,缺钙可导致人体易发高血压、骨质疏松和肠癌^[36]。随着世界人口老龄化的发展,补钙剂成为国内外研究的热点。

Zhao等^[19]对乳清蛋白的酶解液运用羟基磷灰石亲和层析、离子交换色谱和反相高效液相色谱等方法将乳清蛋白中的多肽分离出来,并用液相色谱-串联质谱联用鉴定出与钙离子螯合能力最强的一种氨基酸序列为Phe-Asp的二肽,并且以 CaCl_2 为钙源制备肽-钙螯合物,发现该多肽-钙螯合物与无机钙相比表现出更好的稳定性和促钙吸收性。通过小鼠实验发现与对照组相比,实验组小鼠的骨密度、血清钙和骨钙含量有了明显的提高,多肽-钙螯合物有明显促进钙吸收的效果,可作为一种优良的补钙剂^[17]。同时,在多肽-钙螯合物中也发现了明显的抗氧化活性,其作用相当于生育酚的94.43%,并且具有显著的抗枯草芽孢杆菌和抗金黄色葡萄球菌活性^[37]。

3.3 多肽-锌螯合物的生物活性

锌在生物体的生长、神经发育和物质代谢中起

着重要的作用。缺锌会导致生长迟缓、免疫力下降和皮肤损害等多方面的疾病。锌和多肽形成的螯合物能借助小肽的吸收特点和机制,以螯合物的形式被小肠主动吸收,从而避免无机锌过量和在体内形成不溶物的危害,从而促进锌的吸收。

Feng等^[38]采用商业肉鸡模型探究甘氨酸-锌螯合物对生物体生长、血液和免疫能力的影响,研究发现甘氨酸-锌螯合物和无机锌都可以对肉鸡的生长起促进作用,但是只有添加螯合物的实验组肉鸡的总蛋白、免疫球蛋白和血清中的钙含量增加,说明甘氨酸-多肽锌螯合物不仅可以促进机体中锌的吸收,还有提高机体免疫能力的作用。类似的结论也在Tamamura^[39]中出现,与对照组叠氮胸苷(AZT)相比,抗艾滋病多肽T22-锌螯合物表现出明显的抗HIV活性。多肽-锌螯合物还具有抑菌的生物活性,龚毅^[40]等采用4种不同的氨基酸与锌离子螯合,发现其抑菌活性与锌离子的浓度有关,锌离子含量在同一水平时,抑菌效果基本相同。

3.4 多肽-铜螯合物的生物活性

铜对于中枢神经系统的发育和骨骼的生成具有重要的作用,缺铜会影响人体的造血功能,并且铜还是体内多种功能酶的成分。多肽-铜螯合物不仅可以有效改善铜源的生物利用活性低的问题,还可以协同增强多肽的功能活性。

Megías^[41]等用胃蛋白酶和胰酶处理向日葵蛋白得到其酶解液,研究发现该螯合物的抗氧化活性接近于 β -胡萝卜素,具有很高的抗氧化能力。Yang^[42]等人工合成了几种已知氨基酸序列的溶血栓肽,将其与铜离子进行螯合,利用电喷雾质谱分析其组成结构,并通过体内实验发现这些螯合物相比于合成多肽其溶解血栓的能力大大提高,该研究提供了一种如何提高多肽抗血栓活性的方法,为今后的溶血栓的药物或保健品研究提供了理论依据。王卫国等^[43]用不同铜源喂养小白鼠,发现喂养纳米小肽螯合铜的小鼠粪铜排泄量最少,说明该螯合物可以促进铜在生物体内的吸收,后采用专门试剂盒测定小鼠血清中生长因子(IGF-1)、小鼠白介素(IL-2)及血清免疫蛋白IgG、IgM和IgA的含量,得到纳米小肽-铜螯合物可以提高机体的免疫能力的结论。

3.5 多肽-其他元素螯合物的生物活性

除了以上几种元素之外,国内外也不乏对其他多肽-矿质元素螯合物的研究。铬是重要的血糖调节剂,它参与糖类的代谢作用,降低胆固醇水平,保护人体的心血管。Deendayal^[44]等人参考Wada^[45]和Yamamoto^[46]的文章通过对比non-redundant蛋白数据库合成可以和铬离子进行配位作用的多肽,通过胰岛素信号通路映射实验表明该螯合物与胰岛素受体 α -亚基相匹配,为后面的研究者提供了新的一种多肽。刘安军^[47]等人研究了多肽-铬螯合物对糖尿病小鼠的作用,采用HE染色光镜观察小鼠的肝脏组织病理变化和聚丙烯酰胺凝胶电泳法观察小鼠肝脏蛋白表达的差异,研究发现,对照组中有一种分子量为25~35 kDa的蛋白的表达被螯合物所抑制,通过

这种方式多肽-铬螯合物可以有效减轻肝脏中四氧嘧啶诱导的相关蛋白表达带来的肝损伤,起到一定的保肝作用,为众多糖尿病患者带来福音。硒是谷胱甘肽氧化酶的重要组成部分,适量的补硒可提高人体免疫力,具有一定的抗肿瘤、抗氧化活性^[48]。杨文英等^[49]建立了运动大鼠模型来评价蛋氨酸-硒螯合物的抗氧化性,研究发现,蛋氨酸-硒螯合物可有效降低血清中胆固醇、甘油三酯等物质的含量,并且提高超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性,表明了该螯合物可降低因为运动而引起的脂质过氧化作用,清除体内的自由基,是一种有效的运动补剂。

4 多肽-矿质元素螯合物的安全性评估

多肽与矿物质元素螯合形成的化合物属于新型矿质元素补充剂的一种,有必要进行毒理学安全性的科学评估。2011年,诺伟司国际公司的MINTREX螯合微量元素作为一类新的饲料成分被美国饲料控制官方协会(the Association of American Feed Control Officials, AAFCO)接受,随后也被美国食品与医药管理局兽医分会认可,将其准确定义为螯合矿物质。MINTREX Cu、Zn和Mn可在前肠道的酸性条件下稳定,保护微量元素在小肠内的有效运输和吸收,提供铜、锌和锰这些必需微量元素^[50]。2012年,欧洲食品安全局(EFSA)的有关专家对氨基酸锌类螯合物进行了系统的安全性评估,认为该螯合物是一种对所有畜禽都安全的锌源饲料,不会对环境和水质造成负面影响,可作为一种新型的饲料添加剂来满足动物对于微量元素锌的需求^[51]。刘青^[42]等对自制的新型氨基酸螯合钙制剂的急性毒性和致突变性进行了研究,发现L-亮氨酸钙属于实际无毒物质,在染色体畸变实验、小鼠精子畸形实验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验均呈阴性反应,表明了该螯合物的无致突变性。为了研究猪血多肽亚铁螯合盐的安全性,汪学荣^[53]等由小鼠经口急性毒性(LD₅₀)实验证明猪血多肽亚铁螯合物是实际无毒物质,并且器官组织病理学检查也未发现异常。多肽-矿质元素螯合物的安全性评估的相关研究并不多,这也限制了其开发与利用,所以应进一步加强多肽-矿质元素螯合物的安全性评估研究,以期为后续的实际应用打下基础。

5 结论与展望

多肽-矿质螯合物不仅可以解决矿质元素在人体内吸收差和生物活性低的问题,同时也具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和降血脂等生理作用,可用作医药产品开发和保健食品应用等,具有很高的应用价值和开发前景。但是目前的研究尚存在一些问题,比如关于螯合率的测定方法没有统一,一方面是因为不同螯合物螯合不同矿质元素和螯合工艺不同,致使分离和测定方法很难统一,另一方面是由于游离态的矿质元素和螯合态的矿质元素很难准确分离,因此在今后的研究中应当建立一种行之有效的测定方法和标准。而对多肽-矿质螯合物的系统安全性评估也尚未建立,很多实验只是停留在体外模拟系统研究或是小鼠实验,是否对人体有同样的生

物活性还有待进一步的研究,并且其活性机制也尚未明确,需要从分子方面等进一步探讨其构效关系和活性机制;多肽-矿质元素螯合物的研究只处于实验室阶段,存在成本高、产量低、纯度不高等缺点,对于是否能够真的实现工业化生产还需要做更深入的研究。相信随着今后研究的不断深入和完善,多肽-矿质螯合物所具备的特殊生物活性和在医药领域的价值必将会使其获得更长远的发展。

参考文献

- [1] Carneiro G, Laferrère B, Zanella M T. Vitamin and mineral deficiency and glucose metabolism - A review [J]. e-SPEN the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism 2013 8 (2): e73-e79.
- [2] 汪婧瑜, 张业辉, 刘学铭, 等. 动物性短肽螯合物研究进展 [J]. 食品科技 2015(10): 236-240.
- [3] Hara. Protal absorption of small peptides in rat sunderun restrained condition [J]. Journal of Nutrition, 1984: 1114-1122.
- [4] Guo L, Harnedy P A, Li B, et al. Food protein - derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement [J]. Trends in Food Science & Technology 2014 37(2): 92-105.
- [5] Torres-fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates [J]. Journal of Neurochemistry, 2011, 98(6): 1746-1762.
- [6] Yichen X, Fatemeh B, Michael G, et al. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. [J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1509-1518.
- [7] Guo L, Hou H, Li B, et al. Preparation, isolation and identification of iron - chelating peptides derived from Alaska pollock skin [J]. Process Biochemistry 2013 48(5-6): 988-993.
- [8] Wang C, Li B, Jing A. 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.
- [9] Jiang B, Mine Y. Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosphovitin: effect of molecular size on the calcium - binding properties. [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry 2001 65(5): 1187-1190.
- [10] Seth A, Mahoney R R. Binding of iron by chicken muscle protein digests: the size of the iron-binding peptides [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture 2000 80(80): 1595-1600.
- [11] Hoz L D L, Ponezi A N, Milani R F, et al. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides [J]. Food Chemistry, 2014, 142: 166-169.
- [12] Sang B K, Seo I S, Khan M A, et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis [J]. International Dairy Journal 2007, 17(6): 625-631.
- [13] Swain J H, Tabatabai L B, Reddy M B. Histidine content of low-molecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells [J]. Journal of Nutrition, 2002, 132

(132): 245–251.

[14] Chen D, Mu X, Huang H, et al. Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6(1): 575–584.

[15] KIM S B, LIM J W. Calcium-binding Peptides Derived from Tryptic Hydrolysates of Cheese Whey Protein [J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(10): 1459–1464.

[16] Lee S H, Song K B. Article isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2009, 52(3): 290–294.

[17] Jung W K, Park P J, Byun H G, et al. Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase [J]. *Food Chemistry* 2005, 91(2): 333–340.

[18] Palika R, Mashurabad P C, Nair M K, et al. Characterization of iron-binding phosphopeptide released by gastrointestinal digestion of egg white [J]. *Food Research International* 2015, 67: 308–314.

[19] Zhao L, Huang S, Cai X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate [J]. *Journal of Functional Foods* 2014, 10(3): 46–53.

[20] Chan W, Chan W, Bo L, et al. Zn(II) chelating with peptides found in sesame protein hydrolysates: identification of the binding sites of complexes [J]. *Food Chemistry* 2014, 165(3): 594–602.

[21] Li N C, Miller G W, Solony N, et al. The Effects of Optical Configuration of Peptides: Dissociation Constants of the Isomeric Alanylalanines and Leucyltyrosines and Some of their Metal Complexes [J]. *Journal of the American Chemical Society* 2002, 124(14): 3737–3739.

[22] 靳利娥, 王晓娟, 申帆帆, 等. 六元环氨基酸螯合物的合成、表征及光谱特性 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(4): 1061–1065.

[23] Armas A, Sonois V, Mothes E, et al. Zinc(II) binds to the neuroprotective peptide humanin. [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2006, 100(10): 1672–1678.

[24] 刘永, 李夏欣, 刘玲, 等. 鱼鳞胶原蛋白肽钙螯合物制备工艺的优化 [J]. *食品工业科技* 2013, 34(20): 235–240.

[25] 胡荣, 马宇熙, 陈铮, 等. 鸡蛋壳制备的谷氨酸螯合钙片剂配方及工艺研究 [J]. *食品工业科技* 2016, 37(7): 238–245.

[26] Ren Z Y, Huang G R, Jiang J X, et al. Preparation and Characteristic of Iron-Binding Peptides from Shrimp Processing Discards Hydrolysates [J]. *Advance Journal of Food Science & Technology* 2011, 3(5): 348–354.

[27] 董亚飞, 徐彤视, 杨文鸽, 等. 响应面法优化带鱼下脚料酶解物螯合锌的制备工艺 [J]. *核农学报*, 2016, 30(3): 541–547.

[28] 崔潇, 江虹锐, 刘小玲, 等. 响应面法优化罗非鱼鱼皮胶原多肽螯合镁的工艺条件的研究 [J]. *食品工业科技* 2013, 34(15): 238–241.

[29] 许先猛, 董文宾, 孙皎皎. 猪皮胶原多肽螯合钙的制备及

其结构表征 [J]. *食品工业科技* 2015(20): 309–313.

[30] 唐军虎, 康玮丽, 任志艳, 等. 响应面法玉米蛋白肽锌制备条件的优化 [J]. *食品工业科技* 2011(3): 294–296.

[31] Ani-Kibangou B, Bouhallab S, Mollé D, et al. Improved absorption of caseinophosphopeptide-bound iron: role of alkaline phosphatase [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, 16(7): 398–401.

[32] 吕莹, 刘静, 陈湘宁. 铁离子螯合亲和层析分离抗氧化活性核桃肽 [J]. *中国粮油学报* 2013, 28(1): 65–69.

[33] 汪学荣, 彭祥伟, 阚建全. 猪血多肽亚铁螯合盐的体外抗氧化作用研究 [J]. *食品工业科技* 2011(10): 135–138.

[34] Murray K S, Newman P J, Taylor D. Structure and absolute configuration of tris(N-methylthioformyl-L-histidyl-L-histidyl-L-histidyl) iron(III), an antibacterial metal chelate and potential iron siderochrome [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(7): 2251–2252.

[35] 邓尚贵, 杨燊, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-铁(II)螯合物的酶解制备及其抗氧化、抗菌活性 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2006, 26(4): 54–58.

[36] Sun N, Wu H, Du M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology* 2016, 10(4): 1–9.

[37] 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(1): 202–206.

[38] Feng J, Ma W H, Wu X M, et al. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers [J]. *Biological Trace Element Research*, 2010, 133(2): 203–211.

[39] 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*, 1997, 229(2): 648–652.

[40] 龚毅, 胡晓波, 彭丽霞, 等. 锌氨基酸螯合物的抑菌活性研究 [J]. *食品科学* 2009, 30(17): 84–87.

[41] Megías C, Pedroche J, Yust M M, et al. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2008, 41(10): 1973–1977.

[42] Yang M, Cui G, Zhao M, et al. The effect of complexation of Cu(II) with P6A peptide and its analogs on their thrombolytic activities [J]. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 362(s1–2): 81–87.

[43] 王卫国, 张天勇. 纳米级小肽螯合铜对小白鼠铜排泄和免疫指标的影响 [J]. *饲料工业* 2011, 32(7): 11–15.

[44] Dinakarpanian D, Morrisette V, Chaudhary S, et al. An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide [J]. *Bmc Chemical Biology* 2004, 4(1): 1–7.

[45] Wada O, Wu G Y, Yamamoto A, et al. Purification and chromium-excretory function of low-molecular-weight chromium-binding substances from dog liver [J]. *Environmental Research*, 1983, 32(1): 228–239.

[46] Yamamoto A, Wada O, Ono T. Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit

liver. [J]. European Journal of Biochemistry, 1987, 165 (3): 627-631.

[47] 刘安军, 马艳弘, 张国蓉, 等. 多肽铬螯合物对糖尿病小鼠肝脏蛋白质表达影响的研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(7): 961-963.

[48] Etani Y, Nishimoto Y, Kawamoto K, et al. Selenium deficiency in children and adolescents nourished by parenteral nutrition and/or selenium-deficient enteral formula[J]. Journal of Trace Elements in Medicine & Biology, 2014, 28(4): 409-413.

[49] 杨文英, 庞国忠, 靳利娥. 蛋氨酸螯合硒对运动大鼠血脂和抗氧化酶的影响[J]. 太原理工大学学报, 2013, 44(6): 704-708.

[50] 许东. 诺伟司 MINTREX 矿物质螯合物通过 AAFCO 原料

定义委员会审评[J]. 中国家禽, 2011(16): 72.

[51] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds (E6) as feed additives for all animal species: Zinc chelate of amino acids hydrate, based on a dossier submitted by Zinpro Animal Nutrition Inc [J]. Efsa Journal, 2012, 10(3): 2621.

[52] 刘青, 甘林火, 邓爱华, 等. 新氨基酸螯合钙制剂 L-亮氨酸钙的急性毒性及致突变性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2009, 30(4): 429-431.

[53] 汪学荣, 周玲, 阚建全, 等. 猪血多肽亚铁螯合盐的急性毒性及 30d 喂养实验研究[J]. 食品工业科技, 2012(1): 366-369.

(上接第 325 页)

3 结论

冷鲜滩羊肉微生物群落变化是从复杂到简单的过程。本文确定了宁夏盐池地区冷鲜滩羊肉的初始菌相为假单胞菌、肠杆菌、热死环丝菌及乳酸菌; 并指出其中的优势菌群为假单胞菌, 其次为肠杆菌科。为了探明差异代谢物与菌群的关联性, 主成分分析及聚类分析相关数据说明与假单胞菌关联程度较大的差异代谢物为 D-甘油酸和苯丙氨酸, 且代谢物 D-甘油酸与苯丙氨酸之间、菌群与代谢物之间均呈现出正相关关系。而 1-磷酸葡萄糖、5'-肌苷酸和乳酸菌关联性较大, 且代谢物 1-磷酸葡萄糖与 5'-肌苷酸之间呈现出正相关关系, 而代谢物与菌群呈现出负相关关系。差异代谢物天冬氨酸、天冬酰胺、乙酰苯胺和核糖与肠杆菌及热死环丝菌菌群相互联系与影响的程度较大, 且代谢物天冬酰胺、乙酰苯胺和核糖与菌群之间负相关, 而代谢物天冬氨酸与菌群之间正相关; 代谢物天冬氨酸与代谢物天冬酰胺、核糖负相关, 与乙酰苯胺正相关。宏基因组测序技术可被应用于分析探究微生物群体丰度和多样性, 该方法既可将繁琐的微生物培养分离过程避开, 而且可灵敏的将外界环境对微生物群落结构的影响探测出来, 为微生物的研究开辟了新的思路与方向。

参考文献

[1] 臧晋, 刘凤霞, 李永祥, 等. 高产醋酸菌的分离选育[J]. 中国酿造, 1999(5): 20-22.

[2] 孟宪刚, 周鸽鸽, 张丽珂. 发酵蔬菜浆水中优势好氧微生物的分离及鉴定[J]. 食品工业科技, 2010(3): 222-224.

[3] Carlez A, J-P R, Richard N, et al. High Pressure Inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in Inoculated Minced Beef Muscle [J]. LWT - Food Science and Technology, 1993, 26(4): 357-363.

[4] Garriga M, Grèbol N, Aymerich M T, et al. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2004, 5(4): 451-457.

[5] Chen H. Temperature-assisted pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* in turkey breast meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1): 55-60.

[6] 李旻. 人体肠道菌群结构与宿主代谢的相关性研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009: 15-21.

[7] 张艳. 酱香型白酒发酵中乳酸菌结构及功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 17-26.

[8] 罗欣, 朱燕. 乳酸钠在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 1-5.

[9] 李苗云, 周光宏, 徐幸莲. 应用 PCR-DGGE 研究冷却猪肉贮藏过程中的优势菌[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(9): 185-189.

[10] 林惠珍. 冰鲜鸭优势腐败菌的分析及其控制技术的研究[D]. 福州: 福建农业大学, 2011: 12-25.

[11] 刘莹莹, 罗瑞明, 卢君逸, 等. 冷却羊肉贮藏中品质变化及假单胞菌生长预测模型的建立[J]. 肉类研究, 2013, 27(5): 5-9.

[12] Wang C, Geng X. Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor using hydrophobic interaction chromatography at a large scale [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2262-2266.

[13] 张赫宇, 杨波, 罗瑞明, 等. 高通量测序分析冷鲜滩羊肉储藏过程中的细菌群落多样性[J]. 食品工业科技, 2016(13): 177-182.

[14] 杜宗绪. 3 种平板计数琼脂培养基的质量比较[J]. 山西农业科学, 2014, 42(8): 835-837.

[15] 刘莹莹, 罗瑞明, 卢君逸, 等. 冷却羊肉贮藏中品质变化及假单胞菌生长预测模型的建立[J]. 肉类研究, 2013, 27(5): 5-9.

[16] 袁东晓. 冷却肉防腐剂的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2006: 4-8.

[17] 扈麟. 冷却猪肉腐败的细菌群体感应研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010: 20-24.

[18] 中华人民共和国卫生部. GB/T 9959.2-2008 分割鲜、冻猪瘦肉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[19] 彭佳程. 冷鲜肉品质安全控制技术的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2014: 37-40.