



高能湿法球磨制备鱼胶原肽螯合钙及其理化特征

彭玲, 丛林, 熊善柏, 尹涛*, 尤娟, 胡杨

(华中农业大学食品科学技术学院,

国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了拓展胶原肽螯合钙的制备工艺, 以鱼胶原肽和 CaCl_2 为原料, 以高能湿法球磨的方法制备了鱼胶原肽螯合钙, 并采用 FT-IR 红外图谱、X-衍射、EDS 能谱等技术手段对其理化特性和结构进行分析。结果显示, 随着球磨时间从 15 min 延长到 240 min, 鱼胶原肽的平均粒径逐渐降低, ZETA 电位绝对值、分子量和 pH 值逐渐增加, 鱼胶原肽对钙的螯合率逐渐从 74.21% 增加到 85.42%。鱼胶原肽螯合钙与鱼胶原肽的主体化学结构相似, 但是球磨后鱼胶原肽的 $-\text{COO}^- \text{V}_{\text{AS}}$ 吸收峰 ($1\,643.89\text{ cm}^{-1}$) 向短波数方向移动到 $1\,540\sim 1\,555\text{ cm}^{-1}$, 而 $-\text{NH}_2$ 的特征吸收峰 ($3\,313.9\text{ cm}^{-1}$) 向长波数方向移动到 $3\,337.12\sim 3\,380.59\text{ cm}^{-1}$ 。球磨后鱼胶原在 $2\theta=20^\circ$ 处的特征宽吸收峰消失, 而在 $2\theta=26^\circ, 28^\circ, 48^\circ$ 和 58° 处出现多个尖峰和弥散峰, 表明其从无定形结构向兼具结晶和无定形结构转变。鱼胶原肽螯合钙中钙元素比例逐渐增加, 证实鱼胶原肽对钙的螯合率增加。研究表明, 高能湿法球磨可应用于鱼胶原肽螯合钙的制备, 该方法具有加工工艺简单、无污染和螯合率高等优点。

关键词: 鱼胶原肽螯合钙; 高能湿法球磨; 螯合率; 能谱; 粒径

中图分类号: TS 254

文献标志码: A

钙元素约占人体体质量的 1.5%~2.2%^[1], 其 99% 以晶体形式存在于牙齿和骨骼中, 1% 分布在血液、细胞间液及软组织中。钙缺乏会引起骨质疏松症, 甚至导致高血压、糖尿病和肾结石等疾病^[2]。市场上的补钙制剂以无机钙和有机钙为主, 例如以氯化钙、碳酸钙等为代表的第二代无机型补钙制剂, 以乳酸钙、乙酸钙、葡萄糖酸钙等为代表的第二代有机型补钙制剂^[3]。虽然此类钙制品的钙含量较高, 但是钙的生物利用率低^[4]。针对以上钙制剂的局限性, 出现了第三代具有活性结构的生物钙制剂——肽螯合钙, 该钙制剂中钙与肽可以形成可溶性复合物, 从而促进钙的利用, 具有稳定性好、抗干扰能

力强、生物利用度高等特点^[5]。

目前, 螯合钙的生产方法主要有酸分解法、碱分解法和生物酶解法。Guo 等^[6]通过酸水解合齿鱼科 (Synodontidae) 鱼鳞制备鱼胶原肽, 再将其与氢氧化钙一起进行物理搅拌, 制备得到鱼胶原肽螯合钙。张晓霞等^[7]通过碱法水解乌鳢 (*Channa argus*) 鱼鳞制备鱼胶原肽, 将其与钙螯合制备得到了鱼胶原肽螯合钙; 夏光华等^[8]通过碱性、中性和酸性蛋白酶酶解罗非鱼鱼皮制备得到鱼胶原蛋白肽, 再将其与氯化钙进行螯合制得鱼胶原肽螯合钙, 并确定了最佳螯合工艺条件为 pH 值 8、肽钙比 7:1、螯合温度 50°C 、螯合时间 30 min。在生物酶解法制备螯合钙中,

收稿日期: 2021-01-13 修回日期: 2021-04-21

资助项目: 湖北省技术创新专项 (2018ABA100); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45-28)

第一作者: 彭玲 (照片), 从事水产品加工及贮藏工程研究, E-mail: pengling@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 尹涛, E-mail: yintao@mail.hzau.edu.cn



目前已报道的研究主要是将动物骨骼、鱼骨等原料先进行酶解得到胶原蛋白肽类产物,进一步与钙进行螯合产生蛋白肽螯合钙。例如,洪惠等^[9]以鲾科(Pleuronectidae)鱼类的骨为原料,用酶法制备了鱼胶原肽螯合钙,并优化了制备工艺参数;周小敏等^[10]通过酶解金枪鱼鱼骨得到鱼胶原肽,将其与氯化钙螯合制备得到鱼胶原肽螯合钙;何云等^[11]以黄鲛鲷(*Lophius litulon*)骨为原料,在适宜条件下制备鱼胶原多肽,并与鱼骨钙提取液进行螯合,制成鱼胶原肽螯合钙;吴蕾^[12]将鱼胶原肽与无机钙通过直接配位法螯合,有机溶剂沉淀法制备得到鱼胶原肽螯合钙。以上方法存在制备工艺复杂、生产成本高和化学污染等问题。

目前,高能球磨技术主要应用于生产粉尘、无定形化合物和金属化合物合金^[13],例如用于改变淀粉颗粒的性能^[14]、制备淀粉纳米晶^[15]和制备高强度的铝合金^[16]等。高能球磨法包括干法和湿法,湿法球磨通过高速旋转球之间的摩擦、碰撞和挤压将原料研磨成纳米级,省去了干法球磨中的抽真空和氩气保护等复杂工艺,降低了生产成本^[17]。前期研究发现,在球磨后,纳米鱼骨(NFB)悬浮液中的钙离子浓度显著增加,这表明钙在研磨过程中,从鱼骨释放到了悬浮液中;并且在鱼骨粒径大小稳定后,释放量仍随球磨时间的延长而逐渐增加^[18]。鱼骨是由60%的胶原蛋白和30%的矿物盐组成,其中90%的蛋白质为I型胶原蛋白,80%的矿物盐为钙盐。因此,推测球磨过程中胶原蛋白与钙进行螯合,促进钙的释放^[19]。基于以上信息,高能湿法球磨可能成为制备鱼胶原肽螯合钙的有效新方法,但是相关研究还未见报道。

因此,本研究以鱼胶原肽和CaCl₂为原料,采用高能湿法球磨的方法制备了鱼胶原肽螯合钙,分析了不同高能球磨时间对鱼胶原肽的化学结构、元素组成、晶体特征等的影响,并进一步探究鱼胶原肽通过高能球磨作用与钙离子螯合的机制,以期优化新型蛋白肽螯合钙的加工工艺提供科学的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验材料 鱼胶原肽粉,提取于狭鳕

(*Gadus chalcogrammus*)鱼皮和鱼鳞,主要为I型胶原蛋白,购于河南盛牧生物科技公司;氯化钙(CaCl₂)分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

实验试剂 无水乙醇(C₂H₆O)、六偏磷酸钠[(NaPO₃)₆]、溴化钾(KBr),均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Nano ZS90 纳米分析仪,英国马尔文仪器公司;岛津6300C原子吸收仪,日本岛津仪器有限公司;真空冷冻干燥器,北京博医康实验仪器有限公司;MINI ZETA 03E 高能湿法球磨机,德国耐驰仪器制造有限公司;电子pH计,美国Thermo Scientific公司;分析天平,上海奥豪斯国际贸易有限公司;X射线衍射仪,北京华跃英泰科技有限公司;能谱仪,上海纳腾仪器有限公司;NEXUS-470 傅里叶变换红外光谱仪,美国梅特勒公司;TGL-16GA 台式高速离心机,湖南星科科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

鱼胶原肽螯合钙的制备 参考Yin等^[18]制备纳米鱼骨液(NFB)的方法,略有改动。称取15 g鱼胶原肽粉,加入285 mL去离子水,搅拌使其充分溶解。加入3 g烘干的CaCl₂,混合均匀。转入球磨机研磨腔,在填充率85%和2 000 r/min下球磨。取球磨15、30、60、120和240 min的样品用于测试分析。

粒径和ZETA表面电位的测定 参考李亚杰等^[20]的方法,略有改动。加去离子水将鱼胶原肽螯合钙液稀释至质量浓度为0.1 g/100 mL,加入0.2 g/100 mL分散剂(NaPO₃)₆,然后在100 W功率下超声15 min。粒径和电位采用Zetasizer Nano分析仪测定。测试电位前,将稀释液pH值调整为7。

分子量测定 参考刘丽莉^[21]的方法,略有修改。将样品溶液用无水乙醇沉淀,沉淀后得到澄清液。在4 000 r/min下离心10 min,采用不同截留分子量的超滤管截留后,测定吸光度值。根据吸光度值查看标准曲线,求出不同分子量区间的蛋白肽含量。

pH值的测定 取10 mL鱼胶原肽螯合钙样液于试管中,使用pH计测定。

化学结构测定 参考Yin等^[18]的方法,

略有修改。用无水乙醇沉淀鱼胶原肽整合钙溶液后进行真空冷冻干燥,将其粉碎成粉末。取1 mg样品粉末,与100 mg KBr一起放在干燥的研钵中,在红外灯下混合、研磨使其颗粒小于2.5 μm ,装入压片模具,制得透明的KBr样品片。用FT-IR红外光谱仪分析,波数扫描范围为400~4 000 cm^{-1} 。

整合率的测定 参考钱峰等^[22]的方法,略有修改。取5 mL不同球磨时间的样品加无水乙醇沉淀,静置3 h、微滤、浓缩、乙醇沉淀,再静置3 h、稀释100倍后取样,用火焰原子吸收的方法测定不同球磨时间滤液中的游离钙含量,并记录数据。

$$\text{整合率}(\%) = (\text{Ca}^{\text{T}} - \text{Ca}^{\text{F}}) / \text{Ca}^{\text{T}} \times 100\%$$

式中, Ca^{T} 表示反应液中加入 Ca^{2+} 的总质量(mg); Ca^{F} 表示反应结束后未发生整合反应的游离 Ca^{2+} 质量(mg)。

X-衍射(XRD)晶体特性的测定 参考付文雯^[23]的方法,略有修改。采用X-衍射仪测定鱼胶原肽和钙整合后的晶体结构。X-衍射条件:光源为 $\text{CuK}\alpha$,辐射源管压为40 kV,管流为40 mA,扫描速率为 $6^\circ/\text{min}$,扫描范围(2θ)为 $10^\circ\sim 80^\circ$ 。

元素组成的测定 样品参考Yin等^[18]的方法,使用配备有能量色散X-射线光谱检测器(X-Max 50, Oxford Instrument, UK)的场发射扫描电子显微镜进行元素组成分析。鱼胶原肽整合钙用乙醇沉淀后,滴到铝制的样品台上,然后用吹风机吹干。施加20 kV电压,每个样品扫描3个点,获取元素组分图。将鱼胶原肽粉均匀地

铺撒到样品台上后,采用与鱼胶原肽整合钙相同的测试条件分析元素组成。

数据分析 所有指标均重复测定3次,取平均值。采用Origin 2019b软件作图,用SAS V8软件进行分析,显著性方法为最小显著性差异法LSD(least significant difference),检测限为0.05。

2 结果

2.1 粒径与电位

不同球磨时间混合物的粒径呈现近似正态分布:15 min样品分布范围为343~1 000 nm,30 min样品分布范围为280~900 nm,60 min样品分布范围为200~900 nm,120 min分布范围为100~800 nm,240 min样品分布范围为90~700 nm(图1-a)。鱼胶原肽和钙在球磨15、30、60、120和240 min后的平均粒径分别为872、701、661、564和343 nm(图1-b)。

鱼胶原肽和钙混合物在球磨15、30、60、120和240 min后的电位绝对值分别为3、4、8、9和11 mV。随着球磨时间的增加,混合物的电位绝对值逐渐增加(图2)。

2.2 分子量分布

鱼胶原肽整合钙分子量主要分布在<3 000 u(表1)。球磨15 min后,样品分子量位于>3 000 u、1 000~3 000 u、500~1 000 u、<500 u所占比例分别为4.344%、21.672%、19.178%和55.806%。随着球磨时间的延长,样品分子量位于<500 u的

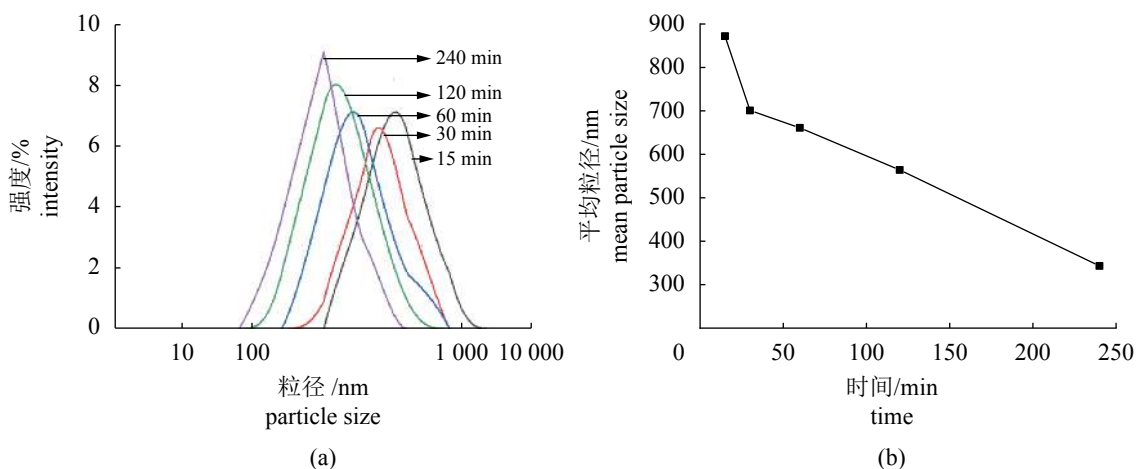


图1 不同球磨时间的鱼胶原肽和钙混合物的粒径分布(a)和平均粒径(b)

Fig. 1 Particle size distribution (a) and mean particle size (b) of the mixture of fish collagen peptide and calcium with different ball milling time

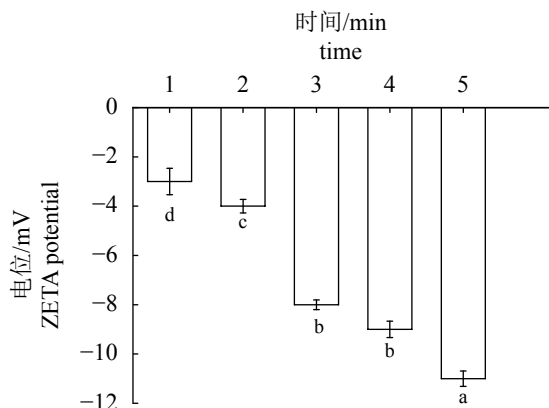


图2 不同球磨时间鱼胶原肽和钙混合物的电位

1. 15 min, 2. 30 min, 3. 60 min, 4. 120 min, 5. 240 min, 不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 误差棒代表3次测定的标准偏差, 下同

Fig. 2 ZETA potential of the mixture of fish collagen peptide and calcium with different ball milling time

1. 15 min, 2. 30 min, 3. 60 min, 4. 120 min, 5. 240 min, different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the error bars represent the standard deviation of the three measurements, the same below

占比逐渐降低, $>3\ 000\ u$ 、 $1\ 000\sim 3\ 000\ u$ 和 $500\sim 1\ 000\ u$ 的占比逐渐增加 ($P < 0.05$)。球磨 240 min 后, 样品分子量位于 $>3\ 000\ u$ 、 $1\ 000\sim 3\ 000\ u$ 、 $500\sim 1\ 000\ u$ 、 $<500\ u$ 所占比例分别为 5.981%、30.539%、27.031% 和 35.999%。

2.3 pH 值

鱼胶原肽和钙混合物在球磨 15、30、60、120 和 240 min 后的 pH 值分别为 6.34、6.85、6.92、7.69 和 8.75(表 2)。随着球磨时间延长, 鱼胶原肽螯合钙的 pH 值显著上升 ($P < 0.05$), 呈现弱碱性。

2.4 螯合率

鱼胶原肽和钙混合物在球磨 15、30、60、

120 和 240 min 后的螯合率分别为 74.21%、76.35%、79.12%、82.22% 和 85.42% (图 3)。随着球磨时间的延长, 鱼胶原肽与钙的螯合率逐渐增加 ($P < 0.05$)。

2.5 化学结构分析

在图 4 中可以明显地观察到酰胺 A ($3\ 300\sim 3\ 420\ cm^{-1}$)、酰胺 B ($2\ 940\ cm^{-1}$ 附近) 以及酰胺 I ($1\ 600\sim 1\ 700\ cm^{-1}$)、酰胺 II ($1\ 500\sim 1\ 600\ cm^{-1}$)、酰胺 III ($1\ 200\sim 1\ 400\ cm^{-1}$) 带的特征峰。胶原肽的 $-COO^{-1} V_{AS}$ 吸收峰位于 $1\ 643.89\ cm^{-1}$, 螯合肽的该吸收峰为 $1\ 540\sim 1\ 555\ cm^{-1}$; 胶原肽的 $-NH_2$ 的特征吸收峰位于 $3\ 313.9\ cm^{-1}$, 球磨 240 min 后, 鱼胶原肽螯合钙的 $-NH_2$ 吸收峰为 $3\ 380.59\ cm^{-1}$ 。

2.6 X-衍射晶体特性

鱼胶原肽的 X 衍射晶体特性分析图 (XRD) 存在大量弥散峰 (图 5), 在 $2\ \theta=20^\circ$ 附近有一个非常宽的弥散峰。球磨后, 图谱发生了明显的变化。球磨后的鱼胶原肽 XRD 图谱在 $2\ \theta=20^\circ$ 附近的宽弥散峰消失, 产生了许多新的尖吸收峰。以球磨 15 min 为例, 鱼胶原肽在 $2\ \theta=20^\circ$ 处的宽吸收峰消失, $2\ \theta=26^\circ$ 、 28° 、 48° 和 58° 处产生了新的吸收峰。

2.7 元素组成

鱼胶原肽主要元素按照原子比例高低依次为 C(69.09%)、O(25.45%)、P(4.36%)、Cl(0.73%) 和 Ca(0.36%), 其中 C、O 为主要元素。随着球磨时间的延长, C、O 占比逐渐减少 ($P < 0.05$), 而 Ca 的比例逐渐增加。球磨 240 min 后, C、O、P、Cl、Ca 的占比分别为 8.47%、8.35%、20.34%、32.20%、30.51%, 其中 P、Cl 和 Ca 为主要元素 (表 3)。

表 1 不同球磨时间的鱼胶原肽和钙混合物的分子量比例

Tab. 1 Molecular weight of fish collagen peptide and calcium mixture with different ball milling time %

分子量范围/u molecular weight	球磨时间 ball milling time				
	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
<500	55.806±0.450 ^c	53.123±1.020 ^a	49.022±0.260 ^b	43.627±0.490 ^c	35.999±0.510 ^c
500~1 000	19.178±1.640 ^a	19.532±0.290 ^b	21.402±0.420 ^c	25.490±0.350 ^b	27.031±0.120 ^d
1 000~3 000	21.672±0.160 ^d	22.286±0.420 ^c	26.671±0.920 ^a	27.378±0.230 ^b	30.539±0.410 ^c
>3 000	4.344±0.440 ^c	5.071±1.680 ^a	4.170±0.280 ^b	6.615±0.470 ^c	5.981±1.620 ^a

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below

表 2 不同球磨时间鱼胶原肽和钙混合物的 pH 值

Tab. 2 pH of fish collagen peptide and calcium mixture with different ball milling time

球磨时间/min ball milling time	pH
15	6.34±0.67 ^a
30	6.85±0.56 ^b
60	6.92±0.54 ^b
120	7.69±0.79 ^c
240	8.75±0.92 ^c

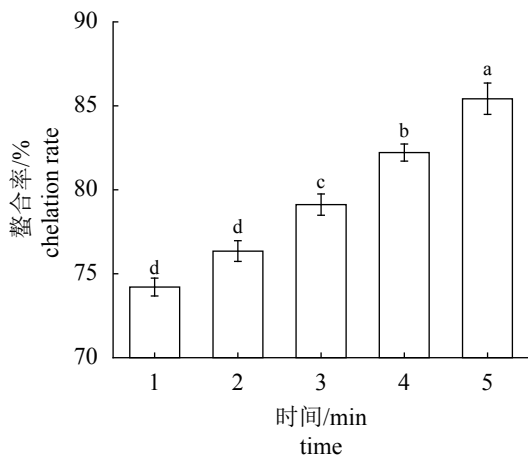


图 3 不同球磨时间鱼胶原肽和钙的螯合率

Fig. 3 Chelation rate of fish collagen peptide and calcium with different ball milling time

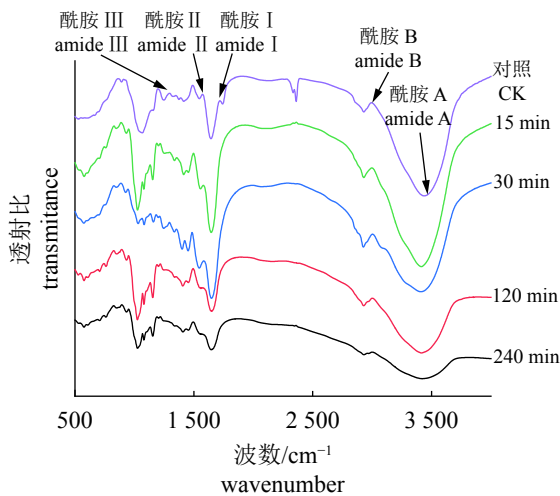


图 4 不同球磨时间鱼胶原肽螯合钙的红外光谱图

CK. 对照组, 为鱼胶原肽, 下同

Fig. 4 Infrared spectrorogram of fish collagen peptide chelated calcium with different ball milling time

CK. control group, which is fish collagen peptide, the same below

3 讨论

3.1 粒径与电位

随着球磨时间的增加, 混合物的平均粒径逐渐减小, 这与尹涛^[24]所得出纳米鱼骨颗粒的粒径随着球磨时间的延长而显著减小是一致的。混合物颗粒在磨球与磨球之间、球磨和研磨腔内壁之间的机械碰撞和物理剪切作用下, 鱼胶原蛋白分子链不断断裂, 使得粒径减小^[25]。混合物颗粒平均粒径在 15~30 min 急剧减小。随着球磨时间进一步延长, 粒径减小的幅度有所降低, 其原因可能是分子间范德华力和静电引力增加, 促进混合物中小颗粒之间聚集^[26]。

悬浊液中固体颗粒和液体剪切面的电位称为 ZETA 表面电位, 又叫 ζ 电位, 是表征胶体分散系稳定性的重要指标^[27]。如图 2 所示, 电位为负值, 其绝对值随着球磨时间的增加而显著增加 ($P < 0.05$), 可能是与球磨过程中鱼骨颗粒中带正电的钙离子的释放有关^[24]。ZETA 电位绝对值增加会增强颗粒之间的相互排斥力, 有助于提高鱼胶原肽螯合钙的稳定性^[24]。

3.2 分子量分布

鱼胶原肽分子量在球磨后增加, 其原因可能与球磨过程中鱼胶原肽与钙螯合形成多聚体有关。付文雯^[23]发现牛骨胶原肽和钙螯合后分子量显著增加, 这与本实验结论一致。随着球磨时间延长, 混合物粒径逐渐降低, 而分子量逐渐增大。在测定粒径时, 样品需经过充分稀释、超声处理以及添加分散剂, 促使螯合的鱼胶原肽解离, 测定的是单个鱼胶原肽分子的粒径。而在超滤法测定分子量中, 样品未经以上预处理, 所以本实验测试中混合物的分子量逐渐增大, 而鱼胶原分子粒径在逐渐降低。

3.3 pH 值

随着球磨时间的延长, 鱼胶原肽螯合钙的 pH 值显著上升 ($P < 0.05$)。原因可能是在球磨过程中, 鱼胶原蛋白降解生成碱性氨基酸, 悬液中碱性氨基酸增多, 使其 pH 值逐渐增加^[28]。

3.4 螯合率

随着球磨时间的延长, 在机械碰撞和物理剪切作用下, 胶原肽分子的分子量和粒径不断

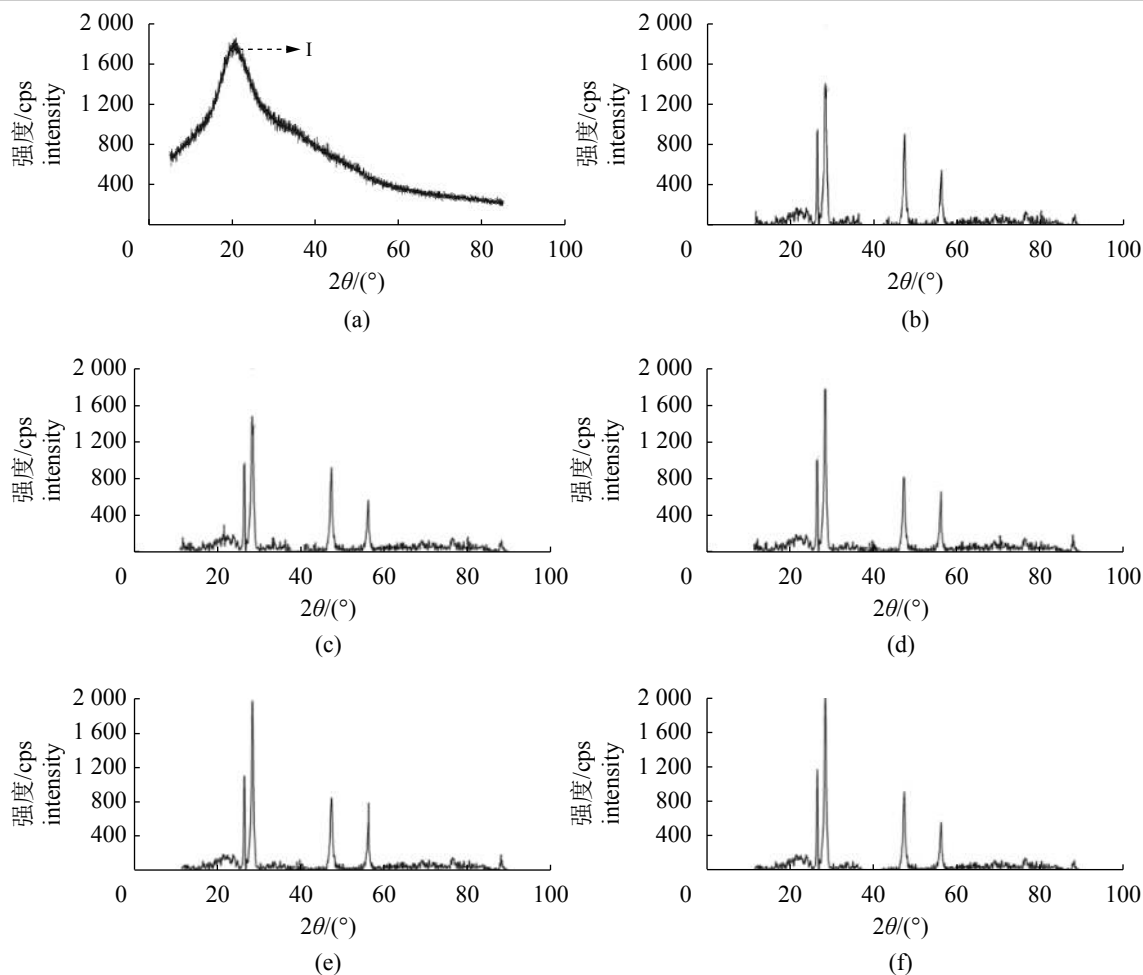


图5 不同球磨时间鱼胶原肽螯合钙的X衍射晶体特性分析图

(a) 对照组, (b) 15 min, (c) 30 min, (d) 60 min, (e) 120 min, (f) 240 min

Fig. 5 X-ray diffraction (XRD) histogram of fish collagen peptide chelated calcium with different ball milling time

(a) control group, (b) 15 min, (c) 30 min, (d) 60 min, (e) 120 min, (f) 240 min

降低, 暴露带电基团增加, 这有利于钙离子与氨基和羧基配位, 从而使螯合率不断提高^[23]。杜冰等^[29]通过酸水解蛋壳制备了可溶性钙, 再将其与甘氨酸螯合制备氨基酸螯合钙, 最佳条件: 可溶性钙和甘氨酸质量比 1:6、pH 值 4.8、温度 60 °C、螯合时间 1.5 h, 螯合率为 89.32%; 张晓霞等^[7]通过碱水解鱼鳞制备了鱼胶原肽螯合钙, 最佳条件: 肽钙质量比 4:1、pH 值 9.0、温度 30 °C、螯合时间 20 min, 螯合率为 90% 以上。Wu 等^[30]酶解猪骨与氯化钙螯合制备了胶原肽螯合钙, 采用响应面法确定最佳螯合条件: 肽钙质量比 4.5:1、温度 50 °C、pH 值 9、螯合时间 40 min, 在此条件下螯合率为 78.38%; 高敏^[31]酶解牛骨与外源氯化钙螯合制备了胶原肽螯合钙, 其最佳螯合条件: 肽钙质量比 2:1、温度 60 °C、pH 值 8.0、螯合时间 40 min, 在此条件下螯合率为

38.97%; 张磊等^[32]酶解鹿骨制备胶原肽螯合钙, 通过正交实验确定最佳螯合条件: 酶解液与氯化钙溶液体积比 2:1、pH 值 6.0、温度 40 °C、螯合时间 50 min, 最大螯合率为 51.6%。

采用高能球磨的方法所得到的螯合率虽然低于酸和碱法, 但明显高于上述的生物酶解法。与酸、碱和生物酶法相比, 本方法具有材料易得、制备工艺简单的优势。

3.5 化学结构分析

在图 4 中可以明显地观察到酰胺 A (3 300~3 420 cm^{-1})、酰胺 B (2 940 cm^{-1} 附近) 以及酰胺 I (1 600~1 700 cm^{-1})、酰胺 II (1 500~1 600 cm^{-1})、酰胺 III (1 200~1 400 cm^{-1}) 带的特征峰, 说明鱼胶原肽螯合钙和鱼胶原肽具有典型的胶原蛋白红外光谱特征吸收峰^[33]。不同球磨时间的鱼胶原肽

表3 不同球磨时间鱼胶原肽螯合钙中的原子比例
 Tab.3 Atomic ratio of fish collagen peptide chelated calcium with different ball milling time %

组别 groups	C	O	P	Cl	Ca
对照组 control group	69.09±1.69 ^a	25.45±6.03 ^b	4.36±2.16 ^a	0.73±2.64 ^a	0.36±2.12 ^a
15 min	9.83±1.12 ^b	13.56±6.43 ^a	5.42±0.54 ^a	47.46±0.54 ^a	23.73±0.17 ^b
30 min	11.15±0.74 ^b	10.78±3.24 ^c	6.69±0.29 ^b	44.61±0.33 ^a	26.77±0.66 ^b
60 min	10.79±2.16 ^a	13.67±2.56 ^b	10.79±7.31 ^a	39.57±0.46 ^b	27.70±2.57 ^b
120 min	10.03±2.02 ^a	9.70±1.01 ^c	16.72±1.29 ^a	36.79±1.79 ^c	28.43±6.12 ^b
240 min	8.47±1.04 ^c	8.35±0.74 ^b	20.34±2.67 ^c	32.20±2.43 ^a	30.51±1.69 ^a

螯合钙与鱼胶原肽的红外扫描图谱基本一致,这表明鱼胶原肽螯合钙和鱼胶原肽在主体化学结构上不存在显著性差异;红外图谱上,胶原肽的 $-\text{COO}^{-1}$ ν_{AS} 吸收峰位于 $1\ 643.89\ \text{cm}^{-1}$,螯合肽的该吸收峰向短波方向移动到 $1\ 540\sim 1\ 555\ \text{cm}^{-1}$,其原因可能是胶原肽中羧基与钙离子螯合所致^[34];鱼胶原肽在 $3\ 313.9\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{NH}_2$ 的特征吸收峰,而球磨240 min鱼胶原肽螯合钙的 $-\text{NH}_2$ 吸收峰为 $3\ 380.59\ \text{cm}^{-1}$,吸收峰向长波数方向移动的原因可能是氨基与钙离子配位结合后, NH_3^+ 部分消失,氢键减少^[35]。因此,在本实验中钙离子可能主要与胶原肽氨基酸末端的氨基和羧基同时配位,形成双螯合结构^[36]。

3.6 X-衍射晶体特性

胶原蛋白是由类似于甘氨酸-X-羟脯氨酸(甘氨酸)-X-脯氨酸的重复三肽组成,其中X可以代表任意氨基酸残基^[23]。鱼胶原肽的X射线衍射图谱存在大量弥散峰,表明鱼胶原肽是弱结晶结构或非晶型结构^[37]。球磨后,图谱发生了明显的变化。球磨后鱼胶原肽产生了许多新的吸收峰,说明鱼胶原肽与钙结合时,在其空间结构上产生了新的相互作用力,导致I处宽弥散峰消失,新的衍射峰出现,即鱼胶原肽和钙发生了螯合反应^[38]。尖峰的本底小,峰高且尖锐,呈现出较好的晶体特征。随着球磨时间的延长,胶原肽螯合钙的尖峰范围变窄,且强度变大,说明球磨作用使得鱼胶原肽与钙发生螯合,产生了一种新物质,使原有的多肽状态发生变化,并且随着球磨时间的延长,其晶体结构和分子排列更加紧密,结晶度更高^[23]。鱼胶原肽螯合钙的X射线衍射谱图是由尖峰衍射特征和弥散衍射特征这2个部分组成,既具备非晶特性,也具备晶体性质^[21]。胶原蛋白是有机物,而氯化钙是

无机物,有机物一般为无定形结构,为宽峰,而无机物为晶体结构,为尖峰,导致胶原肽螯合钙兼具2种结构^[39]。

3.7 元素组成

鱼胶原肽含有微量钙元素,所占比例为0.36%,而球磨之后的鱼胶原肽螯合钙元素的含量较高,所占比例为30.51%。随着球磨时间的延长,钙元素所占比例有所增加,表明球磨促进了鱼胶原肽与钙的螯合^[40-41]。

综上所述,高能球磨过程中钙螯合率逐渐增加,球磨240 min后螯合率达到85.42%;球磨过程中,螯合率逐渐增加主要是胶原肽分子逐渐降解,暴露到胶原肽表面的带电荷基团逐渐增多,导致螯合率逐渐增加;钙离子可能与胶原肽的氨基和羧基同时作用形成双环螯合结构;采用高能湿法球磨制备鱼胶原肽螯合钙,其工艺流程简单、螯合率高,可望成为加工第三代钙制剂的有效方法。

参考文献 (References):

- [1] Wichitra D, Wunwiboon G, Onanong N, *et al.* Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(20): 6051-6061.
- [2] Sun N, Wu H T, Du M, *et al.* Food protein-derived calcium chelating peptides: a review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 58: 140-148.
- [3] Zhou Q, Zhang C L, Ma D D, *et al.* Effect of different calcium supplements on bone metabolism in rats[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(8): 675-679.

- [4] 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 Foods*, 2013, 5(2): 689-697.
- [5] Guo L D, Harnedy P A, O'keeffe M B, *et al.* Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 536-542.
- [6] 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): 1595-1601.
- [7] 张晓霞, 刘盛取, 李国英. 碱法水解黑鱼鱼鳞及制备多肽螯合钙工艺的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(12): 130-134.
Zhang X X, Liu S Q, Li G Y. Study on the hydrolyzation of snakehead scales with alkali method and the preparation of polypeptide-Ca²⁺[J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(12): 130-134(in Chinese).
- [8] 夏光华, 申铨日, 酒志强. 罗非鱼皮胶原蛋白小肽螯合钙的制备、鉴定及抗氧化研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(6): 242-246.
Xia G H, Shen X R, Jiu Z Q. Preparation, identification and antioxidant activity of tilapia fish skin collagen polypeptide chelated calcium[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(6): 242-246(in Chinese).
- [9] 洪惠, 罗永康, 吕元萌, 等. 酶法制备鱼骨胶原多肽螯合钙的研究[J]. *中国农业大学学报*, 2012, 17(1): 149-155.
Hong H, Luo Y K, Lü Y M, *et al.* Preparation of collagen polypeptide chelated calcium by enzymatic method[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2012, 17(1): 149-155(in Chinese).
- [10] 周小敏, 郑万源, 李澄. 金枪鱼骨胶原多肽螯合钙的制备[J]. *食品工业*, 2020, 41(7): 22-26.
Zhou X M, Zheng W Y, Li C. The preparation of chelated calcium from tuna bone collagen polypeptide[J]. *the Food Industry*, 2020, 41(7): 22-26(in Chinese).
- [11] 何云, 汪有先, 赵淑静, 等. 鲢鱼骨胶原多肽螯合钙的工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 133-138.
He Y, Wang Y X, Zhao S J, *et al.* Process optimization of calcium chelate collagen peptide chelate of *Lophius litulon* bone[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(21): 133-138(in Chinese).
- [12] 吴蕾. 胶原蛋白肽螯合钙的制备研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
Wu L. Study on preparation of collagen peptide chelate calcium[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2012 (in Chinese).
- [13] Gilman P S, Nix W D. The structure and properties of aluminum alloys produced by mechanical alloying: powder processing and resultant powder structures[J]. *Metallurgical Transactions A*, 1981, 12(5): 813-824.
- [14] Martínez-Bustos F, López-Soto M, Martín-Martínez E S, *et al.* Effects of high energy milling on some functional properties of jicama starch (*Pachyrrhizus erosus* L. Urban) and cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78(4): 1212-1220.
- [15] Dai L M, Li C W, Zhang J, *et al.* Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 180: 122-127.
- [16] Rana J K, Sivaprahasam D, Raju K S, *et al.* Microstructure and mechanical properties of nanocrystalline high strength Al-Mg-Si (AA6061) alloy by high energy ball milling and spark plasma sintering[J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2009, 527(1-2): 292-296.
- [17] 赵广慧, 居毅, 郭绍义. 高能球磨制备NdFeB纳米晶粉末[J]. *浙江工程学院学报*, 2004, 21(4): 297-299, 327.
Zhao G H, Ju Y, Guo S Y. Making of NdFeB nanometer-crystal powder by high energy ball milling[J]. *Journal of Zhejiang Institute of Science and Technology*, 2004, 21(4): 297-299, 327(in Chinese).
- [18] Yin T, Park J W, Xiong S B. Physicochemical properties of nano fish bone prepared by wet media milling[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(1): 367-373.
- [19] Li J L, Yin T, Xiong S B, *et al.* Mechanism on releasing and solubilizing of fish bone calcium during nano-milling[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2020, 43(4): e13354.
- [20] 李亚杰, 熊善柏, 尹涛, 等. 六种纳米化鱼骨的理化特
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 性比较研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 125-132, 155.
- Li Y J, Xiong S B, Yin T, *et al.* Comparative study on the physicochemical properties of six types of nano-sized fish bones[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(7): 125-132, 155(in Chinese).
- [21] 刘丽莉. 牛骨降解菌的筛选及其发酵制备胶原多肽螯合钙的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- Liu L L. Research on screening of bovine bone degrading bacteria and preparation of collagen polypeptides chelated calcium by fermentation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [22] 钱峰, 李超. 猪骨渣中可溶性钙的提取及蛋白肽螯合钙的制备[J]. *中国食品添加剂*, 2014(8): 68-73.
- Qian F, Li C. Study on extraction of soluble calcium from pig bone residue and preparation of chelated peptide calcium compound[J]. *China Food Additives*, 2014(8): 68-73(in Chinese).
- [23] 付文雯. 牛骨胶原多肽螯合钙的制备及其结构表征 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- Fu W W. Preparation and structure characterization of cattle bone collagen peptide chelating calcium[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [24] 尹涛. 纳米鱼骨的制备、特性表征及其对鱼糜胶凝影响的机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- Yin T. Studies on production and characterization of nano fish bone and the mechanism of its influences on surimi gelation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [25] 范露, 刘茹, 熊善柏. 鱼蛋白肽钙的分级及肽与钙的结合性能研究[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(2): 6-9, 133.
- Fan L, Liu R, Xiong S B. Studies on classification of fish protein peptides-calcium and combination between peptide and calcium[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(2): 6-9, 133(in Chinese).
- [26] Ullah I, Yin T, Xiong S B, *et al.* Structural characteristics and physicochemical properties of okara (soybean residue) insoluble dietary fiber modified by high-energy wet media milling[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 82: 15-22.
- [27] 吴恒. 纳米颗粒 zeta 电位测量关键技术的研究 [D]. 广州: 华南师范大学, 2016.
- Wu H. Research on the key technology of zeta potential measurement of nanoparticles[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2016 (in Chinese).
- [28] 李亚杰, 熊善柏, 尹涛, 等. 4种骨的纳米化加工及其制品的特性[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 38-44.
- Li Y J, Xiong S B, Yin T, *et al.* Production and properties of four kinds of nano-sized bone products[J]. *Food Science*, 2017, 38(5): 38-44(in Chinese).
- [29] 杜冰, 蔡巽楷, 谢伊澄, 等. 蛋壳粉制备氨基酸螯合钙工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 287-289, 292.
- Du B, Cai X K, Xie Y C, *et al.* Study on preparation technology of calcium amino acid chelate from eggshell power[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(4): 287-289, 292(in Chinese).
- [30] Wu W M, He L C, Liang Y H. 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] 高敏. 牛骨酶解多肽螯合物的制备研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
- Gao M. Preparation of bovine bone enzymatic polypeptide chelate[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [32] 张磊, 刘松鑫, 刘畅, 等. 鹿骨胶原多肽螯合钙的制备[J]. *食品工业*, 2019, 40(11): 1-6.
- Zhang L, Liu S X, Liu C, *et al.* Preparation of deer bone collagen polypeptide chelated calcium[J]. *the Food Industry*, 2019, 40(11): 1-6(in Chinese).
- [33] 张萌. 鱼胶原肽螯合钙的制备和应用研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- Zhang M. Study on the preparation and application of fish collagen peptide chelating calcium[D]. Xiamen: JiMei University, 2015 (in Chinese).
- [34] Nara M, Tanokura M. Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(1): 225-239.
- [35] 冯玲玲, 冯进, 李春阳. 海蜇 I 型胶原蛋白的提取及结构特性研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 15-21.
- Feng L L, Feng J, Li C Y. Extraction and structural char-

- acteristics of type I collagen from *Rhopilema esculenta*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(7): 15-21(in Chinese).
- [36] 夏松养, 谢超, 霍建聪, 等. 鱼蛋白酶水解物的钙螯合修饰及其功能活性[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 471-477. Xia S Y, Xie C, Huo J C, *et al.* Preparation and bioactivity of Ca²⁺ chelate of hydrolysate by enzymolysis from the waste fish proteins[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 471-477(in Chinese).
- [37] Wang S J, Zheng M G, Yu J L, *et al.* Insights into the formation and structures of starch protein-lipid complexes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(9): 1960-1966.
- [38] 何昇鸿, 王一安, 曾令智, 等. 营养强化剂壳寡糖铜、锰螯合物的合成与表征及抗氧化活性[J]. *中国食品添加剂*, 2018(4): 148-153.
- He S H, Wang Y A, Zeng L Z, *et al.* Synthesis, characterization and antioxidant activity of nutrition fortifiers chitooligosaccharide copper and manganese chelates[J]. *China Food Additives*, 2018(4): 148-153(in Chinese).
- [39] Jin Y G, Fu W W, Ma M H. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(50): 10204-10211.
- [40] Zhang J, Yin T, Xiong S B, *et al.* Thermal treatments affect breakage kinetics and calcium release of fish bone particles during high-energy wet ball milling[J]. *Journal of Food Engineering*, 2016, 183: 74-80.
- [41] Yang X, Yu X J, Yagoub A G, *et al.* Structure and stability of low molecular weight collagen peptide (prepared from white carp skin)-calcium complex[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 136: 110335.

Preparation and physicochemical characteristics of fish collagen peptide chelated calcium by high-energy wet ball milling

PENG Ling, CONG Lin, XIONG Shanbai, YIN Tao*, YOU Juan, HU Yang

(National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Calcium is an essential mineral for human body. Deficiency of calcium leads to osteoporosis, even induces diseases such as hypertension, diabetes and kidney stones. The common calcium supplements found on the market include calcium acetate, calcium lactate and calcium gluconate. Calcium concentrations of these calcium supplements are high, while bioavailability is low. It has been reported that the collagen peptide chelated calcium has the characteristics of high stability, strong anti-interference ability, and high bioavailability. In this study, fish collagen peptide and CaCl_2 were physically milled with a high-energy wet ball mill, in order to develop new production process of collagen peptide chelated calcium. The techniques including FT-IR infrared spectrum, X-diffraction and EDS energy spectrum, were used to analyze physicochemical properties and structure of the collagen peptide chelated calcium. As the milling time was extended from 15 to 240 min, the particle size of the mixture showed an approximately normal distribution and the average particle size of fish collagen peptides gradually decreased from 872 to 343 nm. The absolute value of ZETA potential gradually increased from 3 to 11 mV. The proportion of molecular weights in the <500 u range decreased from 55.806% to 35.999%, that in the 500-1 000 u range increased from 19.178% to 27.031%, that in the 1 000-3 000 u range increased from 21.672% to 30.539%, and that in the >3 000 u range increased from 4.344% to 5.981%. pH value gradually increased from 6.34 to 8.75. The calcium chelation rate gradually increased from 74.21% to 85.42%. The chemical structure of fish collagen peptide chelated calcium was similar to that of fish collagen peptide. However, $-\text{COO}^{-1} \text{V}_{\text{AS}}$ absorption peak ($1\ 643.89\ \text{cm}^{-1}$) of collagen peptide moved to $1\ 540-1\ 555\ \text{cm}^{-1}$ (shorter wave number) after milling, and the characteristic absorption peak of $-\text{NH}_2$ ($3\ 313.9\ \text{cm}^{-1}$) shifted to $3\ 337.12-3\ 380.59\ \text{cm}^{-1}$ (longer wave number). The characteristic broad fish collagen absorption peak located at $2\ \theta=20^\circ$ disappeared after milling, while multiple sharp peaks (including $2\ \theta=26, 28, 48$ and 58°) and dispersion peaks appeared, indicating that it changed from amorphous to both crystalline and amorphous structure. The proportion of calcium in the collagen peptides chelated calcium gradually increased, confirming that more calcium was chelated by collagen peptides. The above results suggest that high-energy wet ball milling can be applied to produce fish collagen peptide chelated calcium, which has the advantages of simple processing, no pollution, and high chelation rate.

Key words: fish collagen peptide chelated calcium; high-energy wet ball milling; chelation rate; energy dispersive spectroscopy (EDS); particle size

Corresponding author: YIN Tao. E-mail: yintao@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: Hubei Province Technical Innovation Special Major Project (2018ABA100); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45-28)