锌离子结合类蛋白反应修饰肽的稳定性研究

张娟娟，刘尊英，董士远，毛相朝，赵元晖

（中国海洋大学食品科学与工程学院，山东青岛 266000）

摘要：以牡蛎为原料制备锌离子结合类蛋白反应修饰肽，重点以锌保留率为指标，研究了 pH，胃肠道消化酶，热处理，储存时间等因素对锌离子结合类蛋白反应修饰肽的稳定性的影响，并与锌离子结合多肽和锌离子结合谷氨酸的稳定性进行了比较。结果表明，红外光谱分析发现类蛋白反应后有新的物质生成；锌离子结合物在 pH2.0 下都易于解离，在 pH9.0 下都比较稳定，且锌离子结合肽类的稳定性明显强于锌离子结合谷氨酸的稳定性(P<0.05)；锌离子结合物对消化酶都具有一定的抗消化性，且锌离子结合肽类的稳定性明显强于锌离子结合谷氨酸的稳定性(P<0.05)；锌离子结合类蛋白反应修饰肽和锌离子结合多肽对热处理较为敏感，其稳定性明显低于锌离子结合谷氨酸的稳定性 (P<0.05)；随着储存时间的延长，锌离子结合物都保持较高的稳定性，锌保留率可达 95.50%左右。

关键词：牡蛎；类蛋白反应；锌离子结合类蛋白反应修饰肽；稳定性

文章篇号：1673-9078(2015)9-150-154 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.025

Stability of Modified Peptide Using Zinc Binding and Plastein Reaction

ZHANG Juan-juan, LIU Zun-ying, DONG Shi-yuan, MAO Xiang-zhao, ZHAO Yuan-hui

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

Abstract: Modified peptide was prepared from oysters by zinc binding and plastein reaction. The effects of pH, digestive enzymes, heat treatment, storage time, and other factors on the stability of the modified peptide were studied. Additionally, the stability of the new modified peptide was compared with that of zinc-binding polypeptide and zinc-binding glutamic acid. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy indicated that new substances were generated after plastein reactions; zinc-binding complexes were easily degraded at pH = 2.0, while they were relatively stable at pH = 9.0; and the stability of zinc-binding glutamic acid was significantly lower than that of zinc-binding peptides (p < 0.05). All zinc-binding complexes exhibited resistance to digestive enzymes and the stability of zinc-binding glutamic acid was significantly lower than that of other zinc-binding peptides (P < 0.05). The modified peptide and zinc-binding polypeptides were sensitive to heat treatment and their stability was significantly lower than that of zinc-binding glutamic acid (p < 0.05). Zinc-binding complexes exhibited good stability and zinc retention rate reached up to 95.50% as storage time increased.

Key words: oyster; plastein reaction; zinc binding peptide; stability

锌被成为“生命元素”，它是所有生物系统必需的微量元素，也是人体必需的 14 种微量元素之一。锌不仅具有重要的生物功能，还参与多种酶的合成，与机体代谢和某些疾病的发生有着极为密切的关系[1]。尤其是对于母婴，母体缺锌极易造成后代畸形，哺乳期妇女缺锌以及儿童期缺锌均会导致婴幼儿行为异常[2]。随着人们对锌重要生理功能的深入了解，缺锌对健康的影响越来越为世界各地医学科学家所关注。锌离子结合肽类的产品相对于传统的补锌产品具有稳定性高、生物效价高、吸收快、营养性强等优点，具有很高的开发价值和应用前景，日益成为国内外研究的热点[3]。类蛋白反应是浓缩的蛋白水解物在合适条件下经蛋白酶作用形成凝胶状物质的反应。它不需要添加任何有机溶剂或化学试剂，只需添加相应的酶作催化剂，改变反应的条件就可以得到所需要的产物。牡蛎多肽具有很强的金属结合能力，陈达[4]等以牡蛎为原料，研究了牡蛎多肽与锌螯合的工艺，发现牡蛎肉经过胃蛋白酶酶解后，大于 5000 u 组分较其他组分相比，锌结合能力更强，然而胃蛋白酶对于牡蛎蛋白的水解较彻底，水解物中以低于 5000 u 的短肽组分占优势，达到 88%。因此，本研究将经过胃蛋白酶酶解后的牡蛎肽通过浓缩到适宜浓度，然后加入适量的具有较强的金属结合能力的谷氨酸，在适应的条件下发生类蛋白反应，谷氨酸侧链的-COOH 能够改变局部的电荷密度以及肽链表面的亲水性基团的数量和分布，类

收稿日期：2014-12-04

基金项目：山东省自然科学基金(ZR2010CQ001)；国家自然科学基金(31000830)；长江学者和创新团队发展计划(IRT1188)资助

作者简介：张娟娟（1989-），女，硕士研究生在读，主要从事水产品高值化利用的研究

通讯作者：赵元晖（1979-），男，博士，讲师，主要从事海洋生物功能活性物质的研究

蛋白反应使得多肽中存在的谷氨酸残基，尤其是多聚谷氨酸残基能显著的提高其对金属离子的结合能力[5]，得到更多且具有更强与锌结合能力的多肽，然后与锌离子结合制备锌离子结合类蛋白反应修饰肽。本文重点探讨并比较锌离子结合类蛋白反应修饰肽与锌离子结合多肽、锌离子结合谷氨酸在不同的处理条件下的稳定性，以期为肽锌营养补充剂产品的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

太平洋牡蛎（Crassostrea gigas）购于青岛市黄海水产品批发市场；胃蛋白酶、硫酸锌、氯化铵、氨水、铬黑 T，三乙醇胺、甲醇、$EDTANa_2$、谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、精氨酸、组氨酸；其它化学试剂均为分析纯。

FJ-200 型高速分散均质机：上海标本模型厂产品；GL-21M 型高速冷冻离心机：湘仪离心机仪器有限公司；PHS-3C 型精密 pH 计：上海仪表有限公司；Heidolph 旋转蒸发仪：日本东京理化公司；FDU-1200 型冷冻离心机：上海爱朗仪器有限公司；IRPrestige 傅里叶变换红外光谱仪：日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 锌螯合物的制备

1.2.1.1 牡蛎肽的制备

牡蛎肽的制备参考陈达[4]的方法进行。取牡蛎软体部分，加一定体积去离子水匀浆、均质，于 100 ℃加热 10 min 以灭内源性酶，冷却至室温后于 pH 2.0，T=37 ℃，1.5%(*m/m*)胃蛋白酶条件下酶解 2.5 h 后，于 100 ℃水浴灭酶 10 min。冷却至室温，将酶解液调至 pH 7.0，于 6000 r/min，4 ℃条件下离心 10 min，取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜，然后再过 Chelax-100 交换树脂层析柱脱盐，真空冷冻干燥得牡蛎肽。

1.2.1.2 锌离子结合类蛋白反应修饰肽的制备

配制成 40%(*m/V*)牡蛎肽溶液，加入 1.5%(*m/m*)胃蛋白酶，1%的谷氨酸(*m/m*)，于 pH 5，T=37 ℃条件下反应 60 min 后 100 ℃灭酶 10 min 即得到类蛋白反应修饰肽溶液。然后将其稀释至多肽浓度为 5%，多肽与锌盐(硫酸锌）的质量比为 3:1，于 pH 6.5，T=30 ℃的条件下反应 20 min。离心除去沉淀物，取上清液加 4 倍体积的无水乙醇使配合物沉淀，离心取沉淀后清洗，真空冷冻干燥即为锌离子结合类蛋白反应修饰肽。

1.2.1.3 锌离子结合多肽的制备

配制成 5%(*m/V*)牡蛎肽溶液，反应条件及处理同 1.2.1.2。

1.2.1.4 锌离子结合谷氨酸的制备

配制成 5%(*m/V*)谷氨酸溶液，谷氨酸与锌盐(硫酸锌）的质量比为 3:1，其它反应条件及处理同 1.2.1.2。

1.2.2 蛋白浓度测定

Folin-酚法[6]。

1.2.3 锌含量的测定

精确称取一定量配合物，加 5 mL 水使之完全溶解，随后加入 5 mL 氨-氯化铵缓冲液，再加入铬黑 T 指示剂适量，用 $EDTANa_2$ 标准液滴定至蓝色，记录消耗 $EDTANa_2$ 的毫升数并计算锌含量[7]，计算如下：锌含量(mg)=消耗 $EDTANa_2$ 的体积×1 mL $EDTANa_2$ (0.05 mol/L)所对应的锌质量.锌结合率=锌结合物中锌含量(mg)/反应液可溶性蛋白含量(g)。

1.2.4 最佳外源氨基酸的选择实验

选择具有较强的金属离子结合能力的几种氨基酸，包括赖氨酸、谷氨酸、组氨酸、天冬氨酸、精氨酸[8~9]。将相应氨基酸代替谷氨酸，其它处理同 1.2.1.2 得到相应的氨基酸锌离子结合类蛋白反应修饰肽，以锌离子结合多肽为对照，分别测定它们的锌结合率。

1.2.5 多肽和类蛋白反应修饰肽的红外扫描实验

取适量干燥的溴化钾固体，放入玛瑙研钵中研磨，随后加入适量待测干燥的固体样品与溴化钾粉末一起充分研磨均匀至粒度在 2.5 μm 以下，然后用红外压片机加压形成透明的薄片，在 4000~400 cm^{-1} 范围内进行扫描。

1.2.6 酸碱稳定性实验[10]

将锌离子结合物分别溶解在 pH 2.0 的 Clark-Lubs、pH 7.0 的 Tris-HCl、pH 9.0 的 Clark-Lubs 缓冲液中，配成 1%(*m/V*)的溶液，于 37 ℃下水浴振摇 2 h，然后用无水乙醇提取并洗涤后测定锌结合率。

1.2.7 锌离子结合物的模拟消化实验

按照 Quiros[11]略加修改。将锌离子结合物配成 1%(*m/V*)的溶液，用 1mol/L HCl 调 pH 至 2.0，然后加入 1%(E/S)的胃蛋白酶于 37 ℃水浴中分别消化 1 h、2 h，随后于 100 ℃水浴中灭酶 5 min，冷却至室温，然后用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 8.0，加入 1%(E/S)的胰蛋白酶于 37 ℃水浴中分别继续消化 1 h、2 h，随后于 100 ℃水浴中灭酶 5 min，冷却至室温，然后将不同时期的样品用无水乙醇提取洗涤后测定锌结合率。

1.2.8 热稳定性实验

将锌离子结合物配制成 1%(*m/V*)的溶液，分别于 50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃水浴中作用 10 min 后取出

样品，冷却至室温，然后用无水乙醇提取并洗涤后测定锌结合率。

1.2.9 储存时间长短的稳定性实验

因为螯合反应是一种可逆反应，如果生成的锌结合物稳定性不好，可能随着时间的延长锌会再次解离出来，这样的锌结合物在生产中没有实际上的意义。因此，需要测定它的锌结合率随着时间的变化情况。每隔 10 d 测定其锌结合率一次，共测定 6 次，观察其变化规律。

1.3 数据处理

每个实验都做三次平行，运用 SPSS 统计软件进行方差分析其是否具有显著性差异，并通过 LSD 进行检验。

2 结果与分析

2.1 最佳外源氨基酸的选择实验结果

不同外源氨基酸对锌结合率的影响如图 2 所示。不同外源氨基酸的加入，对锌结合率的影响也不一样，但都明显高于未发生类蛋白反应的锌离子结合多肽，有显著性差异(P<0.05)。并且外源谷氨酸的锌结合率最高，达到 191.55 mg/g。锌离子与多肽的结合能力强弱与肽链的氨基酸组成密切相关。多肽中存在的谷氨酸残基，尤其是多聚谷氨酸残基能显著的提高其对金属离子的结合能力，这与其侧链的-COOH 能够改变局部的电荷密度有关[5],同时肽链表面的亲水性基团的数量及分布同样影响其对金属离子的结合能力,这仍需进一步研究。因此选谷氨酸作为最佳外源氨基酸。

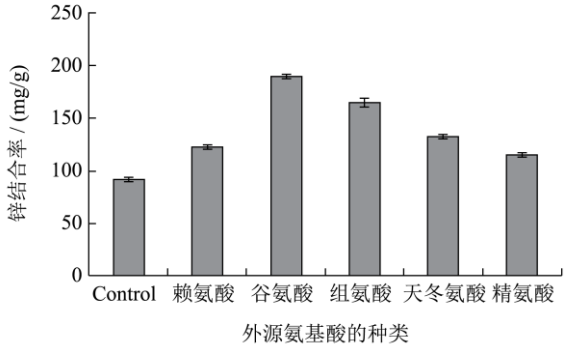


图 1 不同外源氨基酸的加入对锌结合率的影响

Fig.1 Effect of the addition of various external amino acids on the zinc-binding rate

2.2 多肽和类蛋白反应修饰肽的红外扫描结果

红外光谱是分析多肽二级结构的有力工具，其谱带数目、形状、位置和强度都随着化合物的改变而改变。红外光谱中，最重要的波长分布在 4000~1300 cm^{-1}，该区为官能团区或特征区。由图 2 可知，两者在这一区域的红外光谱图差别不大，都表现出多肽的基本红外吸收特征。在 3600~2800 cm^{-1} 区域内，代表 N-H 及 O-H 键的伸缩振动，类蛋白反应后吸收峰变宽且由 3423 cm^{-1} 红移至 3354 cm^{-1}，但 2934 cm^{-1} 处的饱和 C-H 伸缩振动稍有变化，红移至 2930 cm^{-1}，说明其受取代基的影响很小[12]。1700~1500 cm^{-1} 代表酰胺Ⅰ带和Ⅱ带，可反映蛋白质的二级结构，其中，在 1640 cm^{-1} 处，是由 C=O 不饱和键伸缩振动引起的，反映的是 α-螺旋，类蛋白反应后吸收峰变宽增强，且蓝移至 1651 cm^{-1} 处，说明有 α-螺旋出现[13]。在指纹区(1500~400 cm^{-1})吸收带比较多，它是由整个分子振动引起的，反映整个分子的特征，可用于鉴定两种物质是否是同一物质[12]。由图可知，两者的差别较大，有许多小峰的出现和消失，峰的增强和减弱，说明类蛋白反应后形成了新的物质。

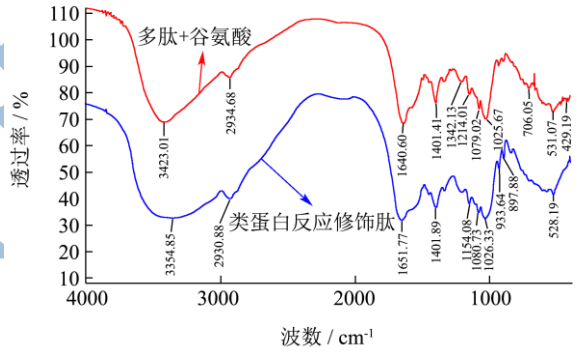


图 2 多肽和类蛋白修饰肽的红外扫描图谱

Fig.2 FT-IR spectra of polypeptide and modified peptide

2.3 酸碱稳定性实验结果

pH 值对锌离子结合物的稳定性的影响如表 1 所示。在 pH 2.0 的缓冲溶液中，锌离子结合物的锌保留率都很低，仅为 30%左右，无显著性差异(P>0.05)，因为酸性太强，H^+浓度过高，它能够与锌离子竞争性的结合供电子基团，促使锌的解离，这与 Castellani 等[14]在研究 pH 对铁离子与卵黄高磷蛋白结合能力影响的结果相一致。在 pH 7.0 和 pH 9.0 的缓冲溶液中，锌离子结合物相对稳定，与它在 pH 2.0 的缓冲溶液中的稳定性相比有显著性提高(P<0.05)，这是由于 pH 升高，H^+浓度降低，使得锌离子与 NH_3^+和 $COOH^-$等供电子基团之间的作用增强，尤其是在 pH 9.0 的缓冲溶液中，锌离子结合物的锌保留率达到最高，且锌离子结合肽类的锌保留率明显高于锌离子结合谷氨酸的锌

保留率(P<0.05)，达到 93%左右。综上所述，锌离子结合物的 pH 稳定性：pH 2<pH 7<pH 9；锌离子结合多肽与锌离子结合类蛋白反应修饰肽的 pH 稳定性无显著性差异(P>0.05)，且明显高于锌离子结合谷氨酸的稳定性(P<0.05)。

表 1 pH 对锌离子结合物稳定性的影响

Table 1 Effect of pH on the stability of zinc-binding complexes

处理后锌保留率/%	锌离子结合多肽	锌离子结合类蛋白反应修饰肽	锌离子结合谷氨酸
Control	100	100	100
pH=2	31.58 ±1.48^{a}	31.19 ±1.29^{a}	30.32 ±1.00^{a}
pH=7	61.40 ±1.25^{a}	59.63 ±0.65^{a}	52.38 ±1.12^{b}
pH=9	92.98 ±1.24^{a}	93.58 ±1.29^{a}	83.81 ±0.89^{b}

注：平均值标准差(n=3)，同一行中不同上标表示差异显著(P<0.05)。

2.4 锌离子结合物的模拟消化实验结果

表 2 胃蛋白酶对锌离子结合物稳定性的影响

Table 2 Effect of pepsin on the stability of zinc-binding complexes

处理后锌保留率/%	锌离子结合多肽	锌离子结合类蛋白反应修饰肽	锌离子结合谷氨酸
无任何处理	100	100	100
对照(pH 2.0)	31.58±1.48^{a}	31.19±1.29^{a}	30.32±1.00^{a}
胃蛋白酶(1 h)消化	22.42±1.37^{b}	26.33±1.19^{a}	24.64±1.05^{ab}
胃蛋白酶(2 h)消化	20.30±1.24^{c}	25.69±1.28^{a}	23.81±1.12^{ab}

注：平均值标准差(n=3)，同一行中不同上标表示差异显著(P<0.05)。

表 3 胃蛋白酶和胰蛋白酶对锌离子结合物稳定性的影响

Table 3 Effect of pepsin and trypsin on the stability of zinc-binding complexes

处理后锌保留率/%	锌离子结合多肽	锌离子结合类蛋白反应修饰肽	锌离子结合谷氨酸
对照(无任何处理)	100	100	100
胃蛋白酶(1 h)+胰蛋白酶(1 h)消化	88.32±1.15^{b}	92.56±1.66^{a}	84.98±1.64^{c}
胃蛋白酶(2 h)+胰蛋白酶(2 h)消化	85.96±1.22^{b}	90.83±0.64^{a}	81.75±1.13^{c}

注：平均值标准差(n=3)，同一行中不同上标表示差异显著(P<0.05)。

锌离子结合物的模拟消化稳定性如表 2、3 所示。经过胃蛋白酶处理后，锌离子结合物的锌保留率都很低。将 pH 调回 8.0，再经过胰蛋白酶处理后，锌离子结合物的锌保留率都有显著提高(P<0.05)，锌离子结合类蛋白反应修饰肽的锌保留率恢复达到 90.83%，明显高于锌离子结合多肽和锌离子结合谷氨酸，有显著性差异(P<0.05)。可见锌离子结合物经过胃蛋白酶处理后，锌保留率显著下降的主要原因是由于 pH 的降低，而不是胃蛋白酶的作用。综上可知，锌离子结合物经过胃蛋白酶、胰蛋白酶共同作用后，锌保留率都较高，表明锌离子结合物都具有一定的抗消化性，且锌离子结合类蛋白反应修饰肽的稳定性明显高于锌离子结合多肽和锌离子结合谷氨酸的稳定性。

2.5 热稳定性实验结果

加热处理对锌离子结合物的稳定性的影响如表 4 所示。随着温度的升高，锌离子结合物的锌保留率均显著降低(P<0.05)，当加热温度为 80 ℃时，锌离子结合谷氨酸的锌保留率明显高于锌离子结合类蛋白修饰肽和锌离子结合多肽。主要原因是蛋白质的高级结构对高温作用相对较敏感，加热处理破坏了蛋白肽的空间结构，使蛋白肽与锌的结合能力下降；锌离子结合谷氨酸仅具有蛋白质结构中的一级结构，一级结构相对于高级结构来说相对稳定，因此明显高于锌离子结合肽类。

表 4 加热温度对锌离子结合物稳定性的影响

Table 4 Effect of heating temperature on the stability of zinc-binding complexes

处理后锌保留率/%	锌离子结合多肽	锌离子结合类蛋白反应修饰肽	锌离子结合谷氨酸
Control	100	100	100
50 ℃	89.47±2.48^{a}	93.12±0.65^{a}	95.40±2.47^{a}
60 ℃	85.09±1.27^{b}	87.16±1.30^{ab}	90.48±2.25^{a}
70 ℃	67.54±1.19^{b}	71.56±2.59^{b}	86.51±1.12^{a}
80 ℃	61.40±2.47^{b}	62.84±0.65^{b}	80.95±2.21^{a}

注：平均值标准差(n=3)，同一行中不同上标表示差异显著(P<0.05)。

2.6 储存时间长短的稳定性实验结果

表 5 时间的变化对锌离子结合物稳定性的影响

Table 5 Effect of time on the stability of zinc-binding complexes

锌保留率/%	锌离子结合多肽	锌离子结合类蛋白反应修饰肽	锌离子结合谷氨酸
Control	100	100	100
10 d	96.49±2.48^{a}	97.80±1.55^{a}	96.83±2.24^{a}
20 d	95.79±2.43^{a}	97.53±0.91^{a}	96.19±2.25^{a}
30 d	95.96±1.19^{a}	97.99±0.78^{a}	94.76±2.50^{a}
40 d	97.02±1.74^{a}	98.08±1.17^{a}	96.98±2.02^{a}
50 d	96.84±1.00^{a}	97.44±0.52^{a}	96.51±1.80^{a}
60 d	95.61±1.24^{a}	97.89±0.39^{a}	95.40±2.92^{a}

注：平均值标准差(n=3)，同一行中不同上标表示差异显著

(P<0.05)。

储存时间长短对锌离子结合物的稳定性的影响如表 5 所示。随着时间的延长，锌离子结合物都保持较高的锌保留率。保存 60 d 后，锌离子结合物的锌保留率仍达到 95.50%左右，无显著性差异(P<0.05)。综上可知，锌离子结合物具有较高的稳定性。

3 结论

锌离子结合物对储存时间的变化都保持较好的稳定性；对消化酶都有一定的耐受性，且锌离子结合肽类的稳定性明显强于锌离子结合谷氨酸的稳定性；对于热处理，锌离子结合肽类比锌离子结合谷氨酸敏感；在强酸的条件下锌离子结合物都不稳定，易解离，在弱碱的条件下，都保持较高的锌保留率。锌离子结合类蛋白反应修饰肽具有较高的锌结合率且具有较好的抗消化性，是一种极具潜力的肽锌补充剂产品。

参考文献

[1] 曾庆祝,陈陆欣.多肽-锌配合物的生物功能活性及安全性[J].现代食品科技,2013,29(8):2035-2039
ZENG Qing-zhu, CHEN Lu-xin. Advance in bioactivity and safety of peptide chelated zinc [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 2035-2039

[2] Prasad AS. Zinc deficiency in human subjects [J]. Prog. Clin. Biol. Res., 1983, 129: 1-133

[3] Wang X, Zhou J, Tong P S, et al. Zinc-binding capacity of yak casein hydrolysate and the zinc-releasing characteristics of casein hydrolysate-zinc complexes [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94, 2731-2740

[4] Da Chen, Zunying Liu, Wenqian Huang, et al. Purification and characterization of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5: 689-697

[5] Kallay C, Varangy K, Micera G, et al. Copper (Ⅱ) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005, 99: 1514-1525

[6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193 (1): 265-275

[7] 郭存荣,方细娟,曾庆祝,等.多肽-锌配合物对奥尼罗非鱼生长性能和血清生化指标的影响[J].中国饲料,2010,427(23): 35-38
GUO Cun-rong, FANG Xi-juan, ZENG Qing-zhu, et al. Effect of Zn(Ⅱ)-peptide complexes on growth performance and serum biochemical indexes of *oreochromis niloticus* [J]. Feed of China, 2010, 427(23): 35-38

[8] Lee L H, Song K B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein [J]. Process Biochemistry, 2009, 44: 378-381

[9] Storcks dieck S, Bonsmann G, Hurrell R F. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from *in vitro* digestion of different meat sources [J]. Journal of Food Science, 2007: S19-S29

[10] 聂瑞艳,刘月娇,刘敏等.罗非鱼鱼鳞肽钙复合物的稳定性研究[J].食品工业科技,2014,4:88-91
NIE Rui-yan, LIU Yue-jiao, LIU Min, et al. Study on the stability of peptide-calcium complex from tilapia scale protein hydrolysates [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 4: 88- 91

[11] Quiros A, Contreras MD, Ramos M, et al. Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties [J]. Peptides, 2009, 30: 1848-1853

[12] 沈晴晴,曾名湧,赵元晖,等.Plastein 反应修饰海地瓜蛋白酶解物及 ACE 抑制肽的制备[J].高等学校化学学报,2014,5(35):965-970
SHEN Qing-qing, ZENG Ming-yong, ZHAO Yuan-hui, et al. Modification of *Acaudina molpadioides* hydrolysates by plastein reaction and preparation of ACE inhibitory peptides [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2014, 5(35): 965-970

[13] 冯蕾,李梦琴,李超然.SPI 挂面特性与其蛋白质结构特征的相关性[J].现代食品科技,2014,30(1):55-62
FENG Lei, LI Meng-qin, LI Chao-ran. The correlation of protein structural features and properties of dry noodles added with SPI [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 55-62

[14] Castellani O, Guerin-Dubiard C, David-Brand E, et al. Influence of physicochemical conditions and technological treatments on the iron binding capacity of egg yolk phosvitin [J]. Food Chem., 2004, 85: 569-577