

两种酪蛋白磷酸肽混合物的钙结合能力及物化性质比较

郭宝颜¹, 刘果^{2,3}, 梁曹雯³, 何泽琪³, 罗敏娜³, 刘飞⁴, 黄景晟¹, 莫锡乾¹, 曾绮莹¹, 苗建银³, 曹庸³

(1. 广州广检质量检测研究院有限公司, 广东广州 510000) (2. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

(3. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642) (4. 广州绿萃生物科技有限公司, 广东广州 510000)

摘要: 本研究探讨了两款市售酪蛋白磷酸肽产品在物化性质、钙离子结合能力的差异。钙乙醇法结果显示两款 CPP 产品的纯度具有较大差异 ($p < 0.05$), CPP2 的纯度是 CPP1 的 1.36 倍。体外钙离子螯合方法结果显示 CPP1、CPP2 的钙离子结合量分别是 107.15 mg/g 和 142.56 mg/g, CPP2 显著高于 CPP1 ($p < 0.05$)。CPP1 和 CPP2 的轻敲密度、Hausner 比值和 Carr's 指数指标结果存在显著差异 ($p < 0.05$), CPP1 的 Hausner 比值(1.52)显著高于 CPP2(1.36) ($p < 0.05$), CPP1 的 Carr's 指数(34.40)显著高于 CPP2(26.51) ($p < 0.05$)。Hausner 比值和 Carr's 指数可以用来表示粉体的可压缩性和流动性, 两种指标结果分析表明 CPP2 的流动性优于 CPP1。CPP1、CPP2 的休止角均高于 40°, 说明 CPP1、CPP2 都存在一定黏聚性, CPP2 的休止角数值低于 CPP1, 结果表明 CPP2 的流动性略好于 CPP1, 与 Hausner 比值和 Carr's 指数结果一致。30%乙醇溶解性结果表明 CPP1 (93.49%) 和 CPP2 (7.46%) 在 30%乙醇溶解性存在极显著差异, 两款 CPP 产品在物质组成上有一定差异。两种 CPP 产品的纯度和钙结合能力成正比。两者粉末都存在一定黏聚性, 流动性一般, CPP2 强于 CPP1。30%乙醇溶解性存在极显著差异, 可能是影响钙片质量的主要因素。本研究为 CPP 作为食品添加剂的应用情况提供科学依据。

关键词: 酪蛋白磷酸肽; 物化性质; 钙结合能力

文章编号: 1673-9078(2020)09-96-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0571

Calcium-binding Ability and Physicochemical Properties of Two Casein Phosphopeptide Products

GUO Bao-yan¹, LIU Guo^{2,3}, LIANG Cao-wen³, HE Ze-qi³, LUO Min-na³, LIU Fei⁴, HUANG Jing-sheng¹,
MO Xi-qian¹, ZENG Qi-ying¹, MIAO Jian-yin³, CAO Yong³

(1. Guangzhou Guangjian Quality Inspection Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510000, China)

(2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Natural Active Object Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China) (4. Greencream Biotech Co Ltd, Guangzhou 510000, China)

Abstract: In this study, the differences in physicochemical properties and calcium ion-binding ability of two commercially available casein phosphopeptides (CPPs) were investigated. The results of the calcium ethanol method showed that the purity of two CPP products differed significantly ($p < 0.05$), with the purity of CPP2 being 1.36 times as high as that of CPP1. The results of the *in vitro* calcium chelation

引文格式:

郭宝颜,刘果,梁曹雯,等.两种酪蛋白磷酸肽混合物的钙结合能力及物化性质比较[J].现代食品科技,2020,36(9):96-100

GUO Bao-yan, LIU Guo, LIANG Cao-wen, et al. Calcium-binding ability and physicochemical properties of two casein phosphopeptide products [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 96-100

收稿日期: 2020-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3197160311); 广东省自然科学基金面上项目(2020A1515010371)

作者简介: 郭宝颜(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物分离纯化, 食品质量安全与食品法规

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性研究

method showed that the calcium ion binding capacity of CPP2 (142.56 mg/g) was significantly higher than that of CPP1 (107.15 mg/g) ($P < 0.05$). There were significant differences in the tapped density, Hausner ratio and Carr's index between CPP1 and CPP2 ($P < 0.05$). The Hausner ratio of CPP1 (1.52) was significantly higher than that of CPP2 (1.36) ($p < 0.05$), and the Carr's index of CPP1 (34.40) was significantly higher than that of CPP2 (26.51) ($P < 0.05$). The Hausner ratio and Carr's index can be used to reflect power compressibility and fluidity. The analysis results of these two indices showed that CPP2 had better fluidity than CPP1. The angles of repose of CPP1 and CPP2 were both higher than 40° , indicating that both CPP1 and CPP2 had a certain degree of cohesion. The angle of repose of CPP2 was lower than that of CPP1, suggesting that the mobility of CPP2 was slightly higher than that of CPP1, which was consistent with the results of the Hausner ratio and Carr's index. The solubility results based on 30% ethanol showed that CPP1 (93.49%) and CPP2 (7.46%) exhibited significant solubility differences in 30% ethanol. There were differences in composition between the two CPP products. The purity of the two CPP products was directly proportional to the calcium-binding capacity. Both powders had a certain degree of cohesion with normal fluidity (CPP2 was stronger than CPP1). The highly different solubilities in 30% ethanol between the two CPP products, indicating that this may be the main factor affecting the quality of calcium tablets. This research provides a scientific basis for the application of CPP as a food additive.

Key words: casein phosphopeptides; physicochemical properties; calcium binding ability

目前,矿物质的缺乏是一个重大的公共健康问题。饮食中矿物质的不足会对人体器官造成很大的影响,并且导致大量的疾病^[1]。钙的摄入不足显著增加骨质疏松症的风险^[2]。镁摄入的不足则增加骨钙的流失。因此,作为矿物质补充剂的功能食品和营养食品在改善健康和预防疾病方面的研究得到了极大的关注。在过去多年的研究中,离子型钙源一直被认为是人类主要的钙补充剂形式^[3]。钙在体内的吸收量取决于十二指肠和空肠近端可溶性钙的数量,以及在碱性条件下以钙肽结合物的可溶性形式存在的数量。

酪蛋白磷酸肽 (Casein Phosphopeptides, 简称 CPP) 是酪蛋白被消化道蛋白水解酶降解后,在体内形成的不同分子量且具有促进钙离子吸收的肽混合物,商业上 CPP 多采用胰蛋白酶酶解获得^[4]。CPP 被认为是具有提高矿物元素吸收潜力的优良载体。研究发现,许多已报到的 CPP 一级结构中均含有三个磷酸丝氨酸和两个谷氨酸残基^[4]。目前,国内外针对促钙吸收肽促进钙吸收活性的研究比较多,按实验对象从体外到体内划分,大致可将促进钙吸收活性评价分为:体外化学模型评价;体外细胞模型评价方法;体内动物模型评价;体内人体模型评价。Zidane 等学者利用等温滴定量热技术研究 1-25 β -caseinphosphopeptide 与钙、镁、锌、铜二价金属阳离子结合关系,实验结果发现,在 pH 值为 8, 37°C 条件下,1 摩尔 1-25 β -caseinphosphopeptide 能够与两摩尔的钙、镁、锌例子结合^[5]。Hou 等学者利用 Caco-2 细胞单层模型评价脱盐鸭蛋清多肽的钙转运活性,结果显示脱盐鸭蛋清多肽能够显著提高 Caco-2 细胞单层模型的钙转运量,可能由于脱盐鸭蛋清多肽起到钙离子载体的作用,也可能脱盐鸭蛋清多肽与细胞膜相互作用形成一个特殊的钙离子通道^[6]。Daniela 等利用老鼠小肠

末端研究钙离子被动运输,实验结果认为,当 CPP:Ca (质量比) 为 0.37 时,在该模型中促进钙运输的效果最好。目前, CPP 的促钙吸收活性研究已有不同层次活性模型评价报道,但是,关于 CPP 物化性质的报道较少^[7]。

前期实验发现,添加 CPP1 钙片的理化性质复合相关标准,但是添加 CPP2 钙片出现不同程度的裂片的现象。因此,本文旨在研究两种 CPP 的物化性质及钙离子结合能力,以期 CPP 作为食品添加剂的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

两种规格酪蛋白磷酸肽混合物 (CPP1, CPP2), 广州绿萃生物科技有限公司;氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠,广州化学试剂厂;乙醇,天津市富宇精细化工有限公司;硝酸、盐酸,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 实验设备

电感耦合等离子原子发射光谱,日本岛津 ICPE 9820;万分之一电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司 AL104;烘箱,上海齐欣仪器有限公司;pH 计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司 DELTA320。

1.3 酪蛋白磷酸肽纯度

两种市售 CPP 产品纯度测定参考国标钡乙醇法 GB 31617-2014《食品安全国家标准 食品营养强化剂酪蛋白磷酸肽》。主要步骤如下:精确称取 0.5~1.5 g 的 CPP1、CPP2 至于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 去

离子水涡旋振荡使其完全溶解;用盐酸将 pH 值调至 4.6; 4 °C、6000 r/min 离心 30 min, 上清液转移至另一 50 mL 离心管, 氢氧化钠调节 pH 值 6.8; 加入 1.5 mL 100 g/mL 的氯化钙溶液和, 无水乙醇定容至 50 mL, 4 °C 放置过夜; 4 °C、6000 r/min 离心 30 min 得沉淀物, 沉淀烘干至恒重。沉淀物重量除以试样重量得到 CPP 纯度。

1.4 酪蛋白磷酸肽钙结合能力

钙结合能力定义为 CPP (g) 与钙离子结合形成肽钙螯合物时的钙量 (mg)。钙结合能力的测定参考已发表的方法^[8], 根据实验情况做少量修改。主要步骤如下, 将 CPP 溶解在 0.02 M 磷酸钠缓冲液(pH 7.8) 中, 然后加入 5 mM CaCl₂ 混合, 37 °C 下搅拌 30 min, 室温下 4000 r/min 离心 20 min。采用电感耦合等离子体光学发射光谱仪 (ICPE 9820, Shimadzu, Japan) 测定上清钙含量。

1.5 酪蛋白磷酸肽物化性质

1.5.1 松密度、轻敲密度、Hausner 比值、Carr's 指数

松密度、轻敲密度、Hausner 比值、Carr's 指数的测定参考已发表的方法^[9]。

精确称取适量的 CPP1 或 CPP2 样品, 用漏斗将记录重量的 CPP1 或 CPP2 粉末匀速注入 100 mL 量筒, 准确记录样品体积, 重复操作 6 次, 根据重量和体积计算松密度 (ρ_b)。随后将装有 CPP 样品的量筒 (测完松密度的样品) 从距离实验台高度 2 cm 处自由落体, 重复 300 次, 记录粉末体积, 重复测定 6 次, 计算轻敲密度(ρ_t)。

利用松密度(ρ_b)和轻敲密度(ρ_t)结果根据公式计算 Hausner 比值和 Carr's 指数。

$$\text{Hausner 比值} = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (1)$$

$$\text{Carr's 指数} = \frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} \times 100\% \quad (2)$$

1.5.2 休止角

休止角的测定参考国标 GB/T 11986-1989 《表面活性剂 粉体和颗粒休止角的测量》。组装休止角测量装置, 在一块完全平的水平板上固定专用漏斗, 将已知体积的粉末样品通过此漏斗降落形成锥形体, 自由表面与水平面间的夹角即为休止角。测量锥形体高度, 计算休止角。

1.5.3 溶解指数

根据制作钙片的工艺, 考察两种 CPP 在 30%乙醇

水溶液中的溶解指数。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件整理并分析数据, 以平均值±标准差的形式表示, 不同的字母代表显著差异 ($p < 0.05$)。Excel 2013 软件进行做图。

2 结果与讨论

2.1 两种市售 CPP 纯度

钙乙醇法是 CPP 有效含量检测以及 CPP 分离纯化最常见的方法之一。样品水解液中加入钙离子, 在钙离子存在的情况下, CPP 分子之间可通过钙离子相互作用形成钙桥, 形成 CPP-Ca 螯合物。然后加入乙醇改变溶液的介电常数, 使 CPP-Ca 螯合物沉淀, 离心或过滤收集沉淀得到 CPP 粗品, 计算含量。两种市售 CPP 产品的纯度对比见图 1, CPP2 的纯度为 25.12%, 显著高于 CPP1 的纯度 (18.37%)。据报道, 日本明治企业标准采用钙乙醇法生产 CPP, 经酶解、灭酶、喷雾干燥得到明治 CPP-I, 明治 CPP-II 则是在 CPP-I 基础上进一步加入脱苦等工艺制备而得。明治 CPP-I 和明治 CPP-II 的纯度均高于 12%, 明治 CPP-III 在 CPP-I 的基础上进一步处理使纯度大于 85%^[10]。CPP1 和 CPP2 的纯度均高于 12%, 达到日本明治乳业低纯度 CPP 产品要求, CPP2 纯度显著高于 CPP1, 说明 CPP2 可能是在 CPP1 的基础上增加脱苦等其它工艺制备而得。

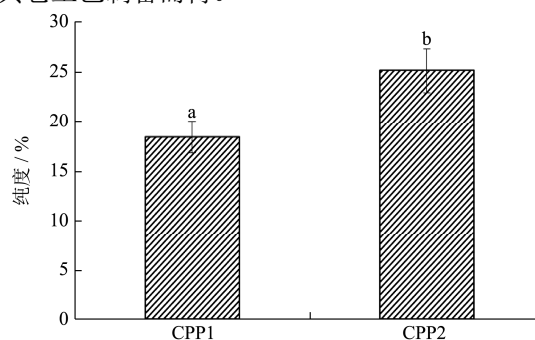


图 1 钙乙醇法测定 CPP 纯度

Fig.1 The purity of CPP detected by calcium ethanol method

2.2 两种市售 CPP 钙离子结合能力

体外钙离子结合法常用于评价 CPP 的钙离子结合能力, 已应用在多种不同来源促钙吸收肽的活性评价^[11]。CPP1 和 CPP2 的钙结合能力结果见图 2, CPP1 和 CPP2 的钙结合量分别是 107.15 mg/g 和 142.56 mg/g。研究报道从乳清蛋白酶解物中分离筛选出的新型促钙吸收多肽的钙结合量为 75.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ^[11], 从罗非

鱼蛋白酶解物中分离的促钙吸收多肽的钙结合能力为 $40.00 \text{ mg/g}^{[12]}$ 。结果表明,与其它来源的促钙吸收肽相比, CPP1 和 CPP2 均具有较高的钙离子结合能力。CPP2 与钙离子结合的量是 CPP1 结合量的 1.33 倍,具有显著差异 ($p < 0.05$),该结果说明 CPP2 结合钙离子的能力显著高于 CPP1。钙结合能力的差异主要是由于 CPP 纯度的差异,钙结合能力与 CPP 纯度呈正相关。CPP 的核心结构为磷酸丝氨酸集团,文献报道氮磷比也能反映 CPP 钙离子结合能力, CPP 的氮磷比越低, CPP 钙离子结合能力越高。

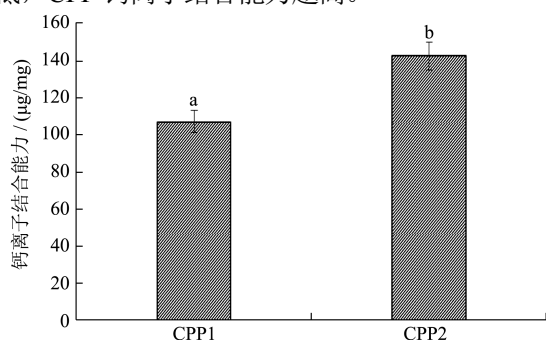


图2 体外钙结合法测定两种 CPP 和钙离子的结合能力
Fig.2 The binding ability of two CPP with calcium ions determined by calcium binding method *in vitro*

2.3 两种市售 CPP 物化性质

由表 1 可知, CPP1、CPP2 的 Hausner 比值和 Carr's 指数存在明显差异, CPP1 的 Hausner 比值 1.52 显著高于 CPP2 的 1.36, CPP1 的 Carr's 指数 34.40 显著高

于 CPP2 的 26.51。Hausner 比值用来表示粉体的可压缩性和流动性,可压缩性反映了粉体的可压缩程度、团聚性及流动性^[13]。一般认为 Hausner 比值小于 1.2 时粉体具有良好的流动性和填充性,可用于生产,而 Hausner 比值大于 1.5 时粉体的流动性和填充性较差,当 Hausner 比值接近 1.6 时,粉体很难从容器自由流出^[14]。当 Hausner 比值接近 2.0 时,粉体不流动^[13]。研究发现 Carr's 指数在 18%~21% 之间时粉末的流动性处于中间水平, Carr's 指数大于 21% 则表明粉末的流动性逐渐变差, Carr's 指数小于 18% 则表明粉末的流动性逐渐变好,当 Carr's 指数处于 5%~10% 时粉末的流动性极好^[9]。由此可知,与 CPP1 相比, CPP2 的流动性较好。

休止角是粉体在自由落体运动形成的角,虽然堆积尺寸随粉体的增加而增加,但堆积角不会变化。休止角可以反映粉体之间摩擦系数,休止角越大,那么粉体之间摩擦系数越大,粉体的流动性越差,通过休止角大小来描述粉体流动性的方法叫做休止角法。通常认为,休止角在 $30^\circ \sim 45^\circ$ 之间时有一定黏聚性,流动性一般;休止角小于 30° 时,流动性较好;休止角在 $45^\circ \sim 55^\circ$ 之间时黏聚性较大,流动性较差;休止角大于 55° 则粉体几乎不流动^[15]。由表 1 可知, CPP1、CPP2 的休止角均高于 40° ,说明 CPP1、CPP2 都存在一定黏聚性,流动性一般。尽管 CPP1、CPP2 之间没有显著差异,但 CPP2 的休止角数值低于 CPP1,结果表明 CPP2 的流动性略好于 CPP1。

表 1 市售两种 CPP 粉体流动性和填充性评价结果

Table 1 Evaluation results of commercial CPP powder fluidity and filling properties

	松密度/(g/mL)	轻敲密度/(g/mL)	Hausner 比值	Carr's 指数	休止角/ $^\circ$
CPP1	0.60 ± 0.01^a	0.92 ± 0.01^b	1.52 ± 0.03^b	34.40 ± 1.31^b	42.06 ± 2.50^a
CPP2	0.63 ± 0.01^a	0.86 ± 0.01^a	1.36 ± 0.02^a	26.51 ± 1.06^a	40.30 ± 1.96^a

注:平均值±相对标准偏差 (n=3); 不同小写字母表示不同组之间具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.4 溶解指数

溶解性是蛋白质的重要性质之一,直接影响蛋白质的应用价值。添加 CPP 作为补钙食品添加剂,湿法造粒制作钙片,结果发现含 CPP1 的钙片达到相关质量标准,但添加 CPP2 的钙片出现裂片和松片的现象,由于钙片制作时使用 30%乙醇水(体积比)作为溶剂,故本论文考察两种 CPP 在 30%乙醇水溶剂中的溶解性质。

由图 3 可知, CPP1 极显著高于 CPP2, CPP1、CPP2 在 30%乙醇水溶液下的溶解指数分别是 93.49%、7.46%。实验结果表明在此条件下, CPP1 基本能够完全溶解,而 CPP2 只有很少的一部分溶解,

CPP1 在溶剂(30%乙醇水溶液)中的溶解度极显著大于 CPP2。

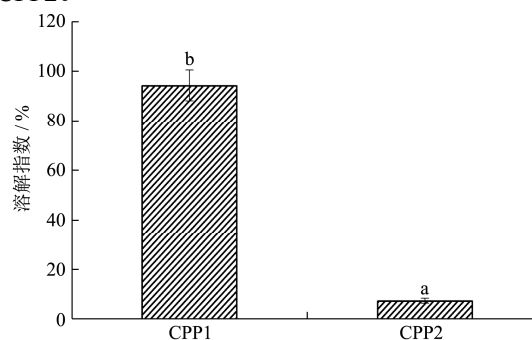


图3 溶解指数

Fig.3 Solubility index

湿法制粒过程中,液体添加量是关键点之一,液

体量添加适量则颗粒保持松散,液体量添加量过少则颗粒之间结合力太弱,液体量添加量过多则颗粒粘性过强。制作钙片时30%乙醇不仅起到润滑作用,还具有诱发制粒物料粘性的作用。CPP1在30%乙醇溶液中溶解度高,溶解的部分起到增加颗粒粘性的作用。相比而言,CPP2在30%乙醇溶液中溶解度低,只有小部分溶解,大部分的CPP2仍然以固态形式存在,并没有起到增加颗粒粘性的作用。从而导致出现松片、裂片现象。

3 结论

3.1 本文对两种市售CPP产品的钙离子结合能力及物化性质进行对比研究。采用国标法-钙乙醇法测定两种CPP纯度,结果显示CPP2(25.12%)的含量显著高于CPP1(18.37%)。体外钙离子结合实验结果表明CPP2 142.56 mg/g的钙离子结合量显著高于CPP1 107.15 mg/g,这是由于CPP2的纯度显著高于CPP1。通过测定两款CPP产品的多种物化指标,发现两种CPP的轻敲密度、Hausner比值、Carr's指数指标均具有显著差异。CPP1的轻敲密度显著高于CPP2,CPP1的Hausner比值、Carr's指数均显著大于CPP2。物化指标揭示CPP2的流动性比CPP1好。流动性还与粉末的形状、大小等因素有关。干燥工艺直接影响粉末的物理状态。通常情况下喷雾干燥的粉末大小均匀,流动性好,而真空干燥和冷冻干燥后的物料流动性相对喷雾干燥较差,干燥方式对流动性的影响需要进一步探索。CPP1在30%乙醇中的溶解度极显著高于CPP2,说明CPP1和CPP2由于制备工艺不同导致在物质组成的极性上有极大的差异,具体的物质组成需要后续进一步研究。

3.2 综上,本实验通过对比分析两款CPP产品的纯度、物化性质、溶解性及钙离子结合活性,为CPP的应用提供理论支撑。

参考文献

- [1] GUO Li-dong, Harnedy P A, LI Ba-fang, 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
- [2] LIU Feng-ru, WANG Li, WANG Ren, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(31): 7537-7544
- [3] LIN Jia-ping, CAI Xi-xi, TANG Meng-ru, et al. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9704-9714
- [4] 李如兰,王立克,戴四发.酪蛋白磷酸肽功能研究进展[J].家禽科学,2012,2:43-45
LI Ru-lan, WANG Li-ke, DAI Si-fa. Research progress on the function of casein phosphopeptide [J]. Poultry Science, 2012, 2: 43-45
- [5] Zidane F, Matéos A, Cakir-Kiefer C, et al. Binding of divalent metal ions to 1-25 β -caseinophosphopeptide: an isothermal titration calorimetry study [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 391-398
- [6] HOU Tao, WANG Chi, MA Zhi-li, et al. Desalted duck egg white peptides: promotion of calcium uptake and structure characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(37): 8170-8176
- [7] Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (W/W) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats [J]. Nutrition, 2002, 18(9): 743-746
- [8] CAO Yong, MIAO Jian-yin, LIU Guo, et al. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in caco 2 cell monolayers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 11(65): 2307-2314
- [9] 陈盛君,朱家壁,祁小乐.粉末直接压片常用辅料的粉体学性质评价[J].中国医药工业杂志,2013,44(10):1010-1013
CHEN Sheng-jun, ZHU Jia-bi, QI Xiao-le. Evaluation of micromeritic properties of excipients for direct compression [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2013, 44(10): 1010-1013
- [10] 凌关庭.《食品添加剂手册》[M].北京:化学工业出版社,2003
LIN Guan-ting. Handbook of Food Additives [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003
- [11] ZHAO Li-na, HUANG Qi-ming, HUANG Shun-li, et al. Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(42): 10274-10282
- [12] CHEN Da, MU Xin-min, HUANG Hai, 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: 575-584