

三文鱼骨胶原低聚肽钙增加 SD 大鼠的骨密度

张江涛, 王越群, 毕园, 周明, 秦修远, 张瑞雪, 陆路, 谷瑞增, 刘文颖

(中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

摘要: 以三文鱼骨为原料制备三文鱼骨胶原低聚肽, 与钙离子螯合为三文鱼骨胶原低聚肽钙并作为受试物, 以低中高剂量作用 SD 大鼠, 并设置空白组和碳酸钙阳性对照组, 检测体重、钙吸收率与保留率、股骨干重、股骨长、骨密度等重要指标, 评价三文鱼骨胶原低聚肽钙的增加骨密度功能。结果显示, 螯合物的总蛋白含量为 65.37%, 螯合率为 52.56%, 螯合物得率为 43.12%; 各试验组体重无显著性差异 ($p>0.05$), 中、高剂量组和碳酸钙组的钙吸收率分别为 39.18%、40.52%、38.38%, 保留率分别为 38.80%、39.27%、37.58%, 显著高于空白对照组 36.31%、35.91% ($p<0.05$), 且高剂量组明显优于同等钙含量的碳酸钙组 ($p<0.05$); 另外高剂量组的股骨干重、股骨中点直径分别为 0.57 (g) 和 2.40 (mm), 股骨近端、远端和中点密度分别为 0.19、0.22、0.17 (g/cm^2), 均高于空白组 ($p<0.05$), 与碳酸钙组无显著性差异。表明三文鱼骨胶原低聚肽钙具有良好的促钙吸收效果和增加骨密度的功能, 为相关新型功能性食品的开发利用奠定良好的理论基础。

关键词: 三文鱼骨胶原低聚肽钙; 相对分子质量; SD 大鼠; 钙吸收保留率

文章编号: 1673-9078(2020)02-179-185

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.026

Salmon Collagen Oligopeptide Calcium Increase Bone Mineral Density of SD Rat

ZHANG Jiang-tao, WANG Yue-qun, BI Yuan, ZHOU Ming, QIN Xiu-yuan, ZHANG Rui-xue, LU Lu, GU Rui-zeng, LIU Wen-ying

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, Beijing 100015, China)

Abstract: Salmon bone collagen oligopeptide was prepared from salmon bone and chelated with calcium ion as salmon collagen oligopeptide calcium and used as test substance. Sprague-Dawley rats were orally administered with low, medium and high doses of test substances, and a blank control group and a calcium carbonate positive control group were used. The body weight, calcium absorption rate and retention rate, femur dry weight, femur length, bone density and other important indicators were measured to evaluate the bone mineral density of the salmon collagen oligopeptide calcium. The results showed that the total protein content of salmon collagen oligopeptide calcium was 65.37%, the chelation rate was 52.56%, and the chelate yield was 43.12±0.13%. There was no significant difference in body weight between the experimental groups ($p>0.05$). The calcium absorption rates of the middle and high dose groups and the calcium carbonate group were 39.18%, 40.52%, 38.38%, respectively, and the retention rate was 38.80%, 39.27%, 37.58%, respectively, which were significantly higher than the blank control group 36.31, 35.91 ($p<0.05$), respectively. The high dose group was significantly better than the calcium carbonate group with the same calcium content ($p<0.05$). In addition, the femoral dry weight and midpoint diameter of the femur were 0.57 (g) and 2.40 (mm), respectively. The proximal, distal and midpoint density of the femur were 0.19, 0.22, 0.17 (g/cm^2), respectively. These were higher than that in the blank group ($p<0.05$) and there was no significant difference from the calcium carbonate group. It indicated that the salmon collagen oligopeptide calcium had a good calcium-absorbing effect and a bone density-enhancing function, which provided a good theoretical foundation for the development and utilization of related new functional foods.

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400604; 2017YFE0108800); 国家自然科学基金项目(31671963); 中山市协同创新中心认定资助项目(2016C1015); 宁波市“十三五”海洋经济创新发展示范项目(NBHY-2017-S1)

作者简介: 张江涛(1995-), 男, 硕士生, 研究方向: 功能食品与食品过敏原; 共同第一作者: 王越群(1991-), 男, 研究方向: 食品机械工程及自动化

通讯作者: 谷瑞增(1973-), 男, 教授级高工, 研究方向: 食源性肽产业化开发; 共同通讯作者: 刘文颖(1984-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食源性低聚肽

Key words: salmon collagen oligopeptide calcium; relative molecular mass; sprague-dawley rats; calcium absorption retention rate

三文鱼, 又名鲑鱼, 被誉为“鱼中至尊”、“水中珍品”, 是世界著名鱼类之一^[1]。其鱼骨中蛋白质主要为骨胶原, 另外含有较丰富的钙质和微量元素, 目前鱼骨大部分被用作饲料、生产鱼粉或直接丢弃, 使其利用率极低, 造成很大浪费^[1]。三文鱼骨胶原低聚肽是由三文鱼骨酶解制得的小分子混合物, 可以较好地回收利用鱼骨的胶原蛋白及其营养成分。钙营养不足一直是国内外重要健康问题之一, 由于中国居民的膳食习惯, 大量摄入植物性食物, 其含有的草酸、植物酸等在人体内易于钙形成不溶性盐, 从而导致钙的吸收利用率低, 进而导致骨质疏松问题的发生^[2]。近年来, 低聚肽螯合金属离子, 促进微量元素以及金属离子的吸收成为一热点研究方向, 如酪蛋白磷酸肽^[3,4]、鱼皮肤^[5]、大豆肽^[6]、乌鸡肽^[7]等与金属离子螯合研究诸见报道。目前研究表明人体内存在二肽、三肽转运系统, 低聚肽具有易吸收、利用率高、不易饱和等特点^[8]。低聚肽能够与钙形成可溶性配合物, 阻止小肠内钙沉淀, 且借助低聚肽吸收利用机制, 促进钙的吸收^[9-11]。但低聚肽的种类不同和螯合金属离子的不同会导致螯合率以及螯合后的生理功能有所差异, 目前对于三文鱼骨胶原低聚肽钙促钙吸收和增加骨密度的研究鲜为少见, 本实验室先前实验已经对三文鱼骨胶原低聚肽钙进行了稳定性和结构鉴定^[12,13], 为动物实验奠定了良好的基础。所以本实验利用以三文鱼骨为原料制备三文鱼骨胶原低聚肽, 与钙离子螯合为三文鱼骨胶原低聚肽钙并作为受试物, 研究三文鱼骨胶原低聚肽钙的补钙效果及增加骨密度功能。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

三文鱼骨, 北京中食海氏生物技术有限公司提供; 碱性蛋白酶 (Alcalase 2.4 L, 2.4 AU/g), 诺维信生物技术有限公司; 木瓜蛋白酶 (80 wu/g), 庞博生物工程有限公司; 无水氯化钙、无水乙醇、碳酸钙、氧化镧, 北京化学试剂公司 (分析纯); 盐酸、硝酸、高氯酸、乙二胺四乙酸, 北京化工厂 (优级纯); 雌二醇、四种分子量肽标准品、邻苯三酚、三氯乙酸, 美国 Sigma 公司 (色谱纯)。

1.1.2 仪器

固体密度测量仪 (SARTORIUS LA 型), 产地: 德国; QDR-4000 型骨密度仪, 美国 HOLOGIC 公司;

电热鼓风干燥箱 (NC101-1A 型)、游标卡尺 (0~125×0.02 mm), 上海精美量具厂; 电子天平 (SL-1001 型, 0.1 g), 上海民桥电子仪器厂; 电子天平 (JA2003 型, 0.001 g), 上海精科天平; 动物解剖器械、722N 可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; SB-36-4 型电热板, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司、上海圣欣科学仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 (LS-30 型), 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 三文鱼骨胶原低聚肽钙的制备^[13]

三文鱼骨粉碎成鱼骨粉→溶解于蒸馏水中→90 °C 热水中加热 10 min→调节温度 50 °C, pH 8.5→加入碱性蛋白酶 (每克蛋白质 2000 单位的酶量), 酶解 3 h→调节温度 60 °C, pH 7.0→加入木瓜蛋白酶 (每克蛋白质 3000 单位的酶量), 酶解 2 h→100 °C 灭酶 10 min→10000×g 离心 30 min, 取上清液→用截留分子量 1000 u 的超滤膜进行超滤→滤液进行喷雾干燥, 得到三文鱼骨胶原低聚肽干粉→将 3 g 三文鱼骨胶原低聚肽和 1 g 无水氯化钙溶解于 100 mL 蒸馏水中→50 °C 下水浴反应 60 min→冷却至室温→调节 pH 5.0, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 室温放置 1 h→抽滤收集沉淀, 干燥后得到海洋胶原低聚肽钙干粉→干燥器中保存

1.2.2 三文鱼骨胶原低聚肽钙总蛋白含量、螯合率和得率

总蛋白质含量测定采用凯氏定氮法^[14], 以干基计, 蛋白质换算系数为 6.25。计算公式为:

$$\text{总蛋白质含量 (\%)} = N \times 6.25 / W \times 100\%$$

式中: N 为测定出的氮含量/mg, W 为三文鱼骨胶原低聚肽钙的质量/mg。

螯合率和得率的测定参照文献^[15]。采用 EDTA 络合滴定法测定钙的含量, 每毫升 EDTA-2Na 滴定液 (0.05 mol/L) 相当于 2.0039 mg 钙。螯合率及螯合物得率计算公式如下:

$$\text{螯合率 (\%)} = M_1 / M_0 \times 100\%$$

$$\text{螯合物得率 (\%)} = W_1 / W_0 \times 100\%$$

式中: M_1 为螯合物中钙的量/mg; M_0 为加入反应体系中钙的总量/mg。 W_1 为三文鱼骨胶原低聚肽钙的总量/mg, W_0 为三文鱼骨胶原低聚肽与氯化钙的总质量/mg。

1.2.3 分子量分布测定

采用高效凝胶过滤色谱法对海洋胶原低聚肽钙的分子量分布进行测定。流动相: 乙腈:水:三氟乙酸, 45:55:0.1 (V/V/V); 流速: 0.5 mL/min; 进样体积: 10

μL ; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 紫外检测器检测。称取 20.0 mg 样品, 溶解于上述流动相中, 配制 2.0 mg/mL 样品溶液, 经孔径 0.2 μm 聚四氟乙烯过滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪进行凝胶过滤, 使用 GPC 软件处理数据。以乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (分子量 189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (分子量 451 u)、杆菌酶 (分子量 1450 u)、细胞色素 C (分子量 12500 u) 为肽标准品, 配制 0.1% (M/V) 溶液, 过膜后进样。

1.2.4 试验动物

清洁级 SD 种健康大鼠 50 只, 体重 60~75 g, 由北京实验动物研究中心提供。动物使用许可证号: SYXK(京)2011-0006。饲养环境温度 (23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 (40~60) %, 明暗交替周期为 12 h。饲料购置于科澳协力饲料有限公司, 灭菌后使用。所有实验动物适应性喂养一周后开始正式实验。

1.2.5 动物试验方法

大鼠禁食 12 h 后称重, 按体重随机分组为空白对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和碳酸钙阳性对照组, 每组 10 只。低、中和高剂量组按 0.17 g/kg、0.33 g/kg 和 1 g/kg (分别相当于每 60 公斤体重成人推荐量的 5、10、30 倍) 三个剂量以受试物的去离子水溶液灌胃干预, 空白对照组使用等体积去离子水, 碳酸钙对照组灌胃液的钙含量与高剂量组相同, 灌胃 30 d。试验期间大鼠均自由摄食, 饮用去离子水, 避免从饮水中获得钙。30 d 后股静脉放血处死动物, 分离双侧股骨, 进行有关指标测量和检验。

1.2.6 一般指标的测量

动物单笼饲养, 每天观察躯体运动、肌肉张力、皮肤及毛色等一般情况, 每周测量体重 (禁食 12 h 后测定) 一次。

1.2.7 钙吸收实验

实验开始 3 周后进行 3 d 钙代谢实验。各组动物放入代谢笼, 单笼饲养, 记录 72 h 进食量, 收集 72 h 尿液和粪便, 用原子吸收分光光度法测定饲料、尿液及粪便中钙含量。结合测得的数据, 计算大鼠的钙吸收率和钙保留率:

摄入钙 (mg/d) = 饲料中钙含量 (mg/g) \times 饲料消费量 (g/d)

粪钙 (mg/d) = 粪便中钙含量 (mg/g) \times 粪便排出量 (g/d)

尿钙 (mg/d) = 尿液中钙含量 (mg/g) \times 尿液排出量 (g/d)

钙吸收率 (%) = (摄入钙 - 粪钙) (g) / 摄入钙 (g) \times 100%

钙保留率 (%) = (摄入钙 - 粪钙 - 尿钙) (g) / 摄入钙 (g) \times 100%

1.2.8 股骨干重、股骨长、骨密度的测定

实验终止时处死大鼠, 剥离出双侧股骨, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重, 称量股骨干重, 测量股骨长。分别使用 QDR-4000 型骨密度仪 (DXA 法) 及固体骨密度仪 (阿基米德定律法) 测股骨密度^[16]。

1.2.9 数据处理

采用 Originpro 8.0 统计软件对结果进行统计分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 三文鱼骨胶原低聚肽钙的总蛋白含量、螯合率和得率

三文鱼骨胶原低聚肽钙的总蛋白含量为 65.37%, 表明三文鱼骨胶原低聚肽钙中蛋白质含量较高。此外, 螯合率为 52.56%, 螯合物得率为 43.12%, 结果优于李勇^[17]等人在复合肽螯合锌 (螯合率为 42.92%) 及蔡^[18]等人在鳕鱼肽螯合铁 (螯合率达到 34.14%, 螯合物得率 37.31%) 等试验。夏^[19]等人在罗非鱼胶原肽螯合钙优化实验中螯合率达到 78.04%, 优于本实验的骨胶原螯合钙。可能是由于低聚肽种类及螯合工艺的不同, 导致形成的螯合物稳定性有一定的差异。总体来说, 本实验所得的三文鱼骨胶原低聚肽钙具有较高的螯合率和得率, 为动物实验奠定了良好的基础。

2.2 三文鱼骨胶原低聚肽钙中低聚肽的相对分子质量分布

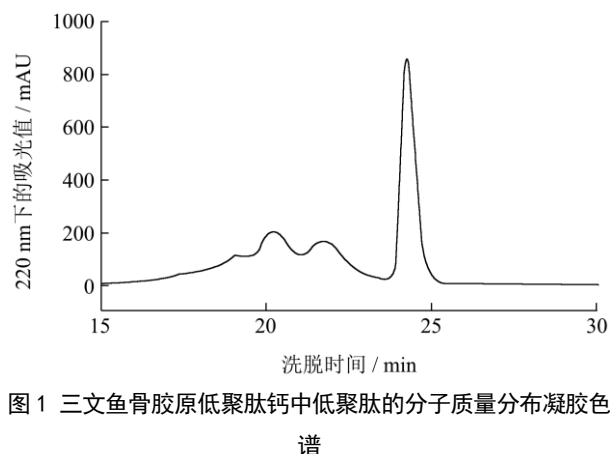


图 1 三文鱼骨胶原低聚肽钙中低聚肽的分子质量分布凝胶色谱

Fig.1 Molecular mass distribution gel chromatography of oligopeptides in salmon collagen oligopeptide

通过 HPLC 分析海洋鱼骨胶原低聚肽的相对分子

质量,其分子量分布凝胶色谱图和具体的分子量分布情况分别如图1和表1所示。其分子量在1000 u以上的仅占11.93%,1000 u以下占88.07%。相对分子质量的大小,直接决定肽的吸收速率,分子量1000u以下的多为二肽和三肽。研究发现,二肽、三肽的转运吸收存在独立的系统以及相应的载体^[8]。相比较于蛋白质,低聚肽具有吸收速度快、耗能低、不易饱和、各种肽之间转运无竞争性与抑制性等特点^[20],因此可以推论海洋鱼骨胶原低聚肽具有良好的吸收效率。

表1 三文鱼骨胶原低聚肽钙中低聚肽的相对分子量分布

Table 1 Relative molecular weight distribution of oligopeptides in salmon collagen oligopeptide calcium

分子量范围/u	开始时间/min	结束时间/min	峰面积百分比/(%, 220 nm)
>10000	8.87	13.85	0.25
10000~3000	13.85	16.45	1.89
3000~1000	16.45	18.82	9.78
1000~500	18.82	20.32	17.77
500~140	20.32	23.07	28.74
<140	23.07	28.57	41.55

2.3 一般观察和体重的变化

在给受试物期间,各剂量组与对照组动物外观体征和行为活动、粪便性状、食量等均未见异常,无中毒体征及死亡。各剂量组动物初始体重与对照相比差异无显著性($p>0.05$),试验期间各组体重与对照组相比差异无显著性($p>0.05$) (见图2)。

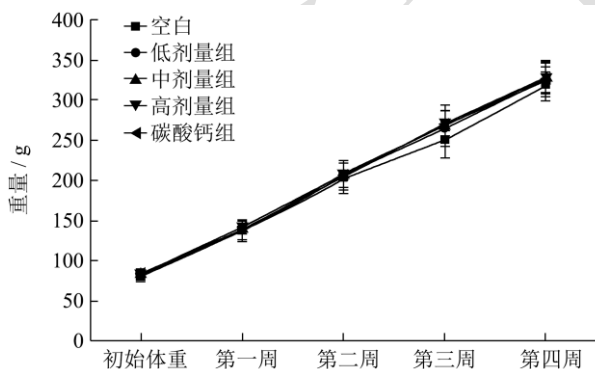


图2 三文鱼骨胶原低聚肽钙对大鼠体重的影响

Fig.2 Effect of salmon collagen oligopeptide calcium on body weight of rats (n=10)

2.4 三文鱼骨胶原低聚肽钙对大鼠钙吸收率和储留率的影响

从图3可以看出,从三文鱼骨胶原低聚肽钙低、中到高剂量组的钙吸收率和钙储留率呈现增加趋势,

高剂量组达到40.52%和39.27%,空白组最低分别为36.31%和35.97%,与空白组比较钙吸收率和储留率分别增加10.80%和9.20%。中、高剂量组和碳酸钙组钙吸收和储留效率显著高于空白对照组($p<0.05$),但是高剂量组要优于钙含量相同的阳性对照碳酸钙组,且具有显著性差异($p<0.05$),表明三文鱼骨胶原低聚肽钙能显著提高大鼠的钙吸收和储留率,且相比较于阳性对照碳酸钙组效果更佳。钙摄入量充足且吸收储留率较高的情况下,可以有效的促进骨钙沉积,进而增加骨密度^[21]。

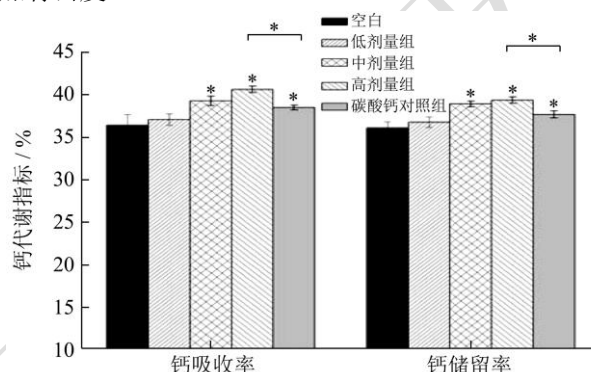


图3 三文鱼骨胶原低聚肽钙对大鼠钙吸收和钙储留的影响

Fig.3 Effect of salmon collagen oligopeptide calcium on calcium absorption and calcium retention in rats

注: *代表显著差异 $p<0.05$, 未特殊标注即与空白对照组相比。

2.5 股骨干重、股骨长、股骨中点直径

表2 三文鱼骨胶原低聚肽钙对大鼠股骨干重、股骨长、股骨中点直径的影响

Table 2 Effect of salmon collagen oligopeptide calcium on femur dry weight, femur length, and femur midpoint diameter (n=10, x±s)

组别	股骨干重/g	股骨长度/mm	股骨中点直径/mm
空白对照组	0.51±0.021	37.57±0.853	2.29±0.182
低剂量组	0.51±0.018	38.25±0.738	2.35±0.198
中剂量组	0.54±0.023	38.49±0.956	2.38±0.217*
高剂量组	0.57±0.037*	38.70±1.069	2.40±0.196*
碳酸钙对照组	0.55±0.026*	38.60±0.887	2.39±0.207*

注: *与空白对照组相比, $p<0.05$ 。

补钙可以促进股骨沉积,股骨生长^[22]。三文鱼骨胶原低聚肽钙喂养30 d后,高剂量组股骨干重较空白对照组增加,差异有显著性($p<0.05$),中、高剂量组股骨中点直径较对照组均增加,差异有显著性($p<0.05$),股骨长度随剂量增加呈现增加趋势但是与对照组(37.57±0.853)相比差异无显著性($p>0.05$);

碳酸钙对照组股骨干重、股骨长、股骨中点直径均较空白对照组增加, 差异有显著性 ($p < 0.05$)。三文鱼骨胶原低聚肽钙高剂量组大鼠股骨干重、股骨长、股骨中点直径增加程度大于碳酸钙对照组 (见表 2)。孙皎皎^[23]等人在猪胶原多肽螯合钙对大鼠股骨干重研究中, 也得到了类似的结论, 高剂量组股骨干重达到约 0.5 g, 显著高于空白对照, 且优于碳酸钙组。骨骼中的钙是以羟基磷灰石沉积的方式, 以骨胶原为黏合剂而固定下来的^[24], 三文鱼骨胶原低聚肽钙能够促进股骨沉积和股骨生长, 在合适范围内剂量与效果呈现线性趋势, 且优于阳性对照碳酸钙组。

2.6 骨密度

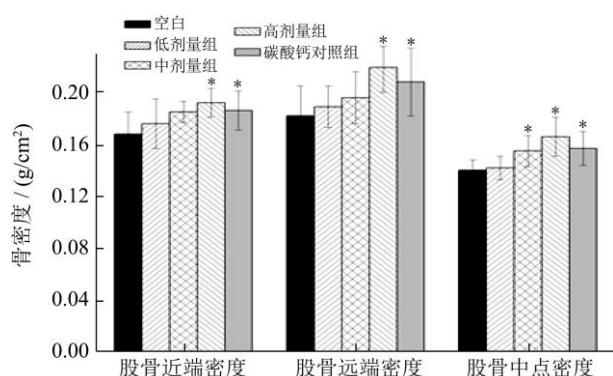


图 4 三文鱼骨胶原低聚肽钙对大鼠股骨远端、近端和中点骨密度的影响

Fig.4 Effect of salmon collagen oligopeptide calcium on bone mineral density in the distal, proximal and midpoint of the femur

注: *代表与空白对照组相比, $p < 0.05$ 。

骨密度是临床上检测补钙效果的一重要指标^[25]。三文鱼骨胶原低聚肽钙喂养 30 d 后, 高剂量组和碳酸钙组的股骨近端、远端密度较空白对照组均增加, 差异有显著性 ($p < 0.05$); 中、高剂量组和碳酸钙组的股骨中点密度较空白对照显著性增加 ($p < 0.05$) (见图 4)。另外三文鱼骨胶原低聚肽钙高剂量组与阳性对照碳酸钙组比较, 虽然没有显著性差异, 但略优于碳酸钙组, 表明三文鱼骨胶原低聚肽钙具有增加骨密度的作用, 随着剂量增加呈现递增趋势, 比单纯的补充同等钙含量的碳酸钙效果更好。许先猛^[5]等人在猪皮胶原多肽螯合钙增加大鼠骨密度研究中, 高剂量组股骨远端密度达到 0.29 g/cm^2 , 显著高于空白对照组 0.25 g/cm^2 和碳酸钙组 0.26 g/cm^2 , 与本实验得到的结论具有一致性, 可能是由于大鼠周龄的不同, 其密度与本实验有所差异。

三文鱼骨胶原低聚肽钙的具体结构特征将在下一步实验进行更深入表征。刘闪^[26]等人对白鲢鱼骨胶原

低聚肽钙进行的结构表征, 表明胶原低聚肽中氨基上的氮原子与羧基上的氧原子均参与了钙离子的螯合反应, 它们之间主要是配位结合。氨基酸和小肽可能以金属离子螯合形式, 利用氨基酸和小肽的转运吸收机制进入人体。另外许多研究表明, 酪蛋白水解产物的酪蛋白磷酸肽 (CPP), 能够在肠道与钙、铁等结合, 促进其吸收利用^[3,27,28]。低聚肽螯合金属离子因其在生物活性及食用药用中的特殊优势, 必将有十分广阔的发展前景。

3 结论

本实验三文鱼骨胶原低聚肽钙喂养 SD 大鼠动物实验, 各剂量组对大鼠体重并没有造成显著性差异; 中、高剂量组和碳酸钙组的钙吸收率、储留率显著高于空白对照组 ($p < 0.05$), 且高剂量组明显优于同等钙含量的碳酸钙组 ($p < 0.05$); 另外高剂量组的股骨干重、股骨长、股骨中点直径以及股骨远端和近端密度均高于空白组 ($p < 0.05$), 与碳酸钙组无显著性差异。表明三文鱼骨胶原低聚肽钙具有良好的补钙和增加骨密度的作用, 而且相比较于阳性对照碳酸钙组, 其效果更佳。本实验的三文鱼骨胶原蛋白肽多为低分子量的小肽, 一般为二肽、三肽, 与钙离子形成配合物时, 能够抑制刷状缘上肽酶的水解活性, 一方面提高了肽的利用率, 另一方面使钙离子够以螯合物整体形式被转运, 更易被肠道直接吸收, 下一步将通过细胞实验对其体内转运机制进行深入探究。本实验证明了三文鱼骨胶原低聚肽钙具有良好的补钙和增加骨密度作用, 有效的开发利用了鱼骨资源, 提高其利用率及附加值, 也为相关功能食品的开发利用奠定良好的理论基础。

参考文献

- [1] 罗刚. 三文鱼高效淡水养殖配套技术[J]. 贵州畜牧兽医, 2009, 33(4): 48-48
LUO Gang. Techniques for efficient freshwater aquaculture of salmon [J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009, 33(4): 48-48
- [2] 慈华聪. 逆境植物的钙晶体特征及垂柳对外源钙的响应[D]. 天津: 南开大学, 2011
CI Hua-cong. Characteristics of calcium crystals in stress plants and response to exogenous calcium in weeping willows [D]. Tianjin: Nankai University, 2011
- [3] 生庆海, 耿倩, 邱泉若. 酪蛋白磷酸肽(CPP)对生长期大鼠骨密度的影响[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(5): 22-25
SHENG Qing-hai, GENG Qian, QIU Quan-ruo. Effect of casein phosphopeptide (CPP) on bone mineral density in

- growing rats [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(5): 22-25
- [4] 生庆海,耿倩,邱泉若.四种酪蛋白磷酸肽(CPP)及不同CPP/Ca 比值对生长期大鼠骨密度的影响[C].中国食品科学技术学会儿童食品专业学会学术年会暨儿童食品安全信用体系建设会议,2005
SHENG Qing-hai, GENG Qian, QIU Quan-ruo. Effects of four casein phosphopeptides (CPP) and different CPP/Ca ratios on bone mineral density in growing rats [C]. *China Food Science and Technology Society Children's Food Professional Society Academic Year Conference on Children's Food Safety Credit System Construction*, 2005
- [5] 许先猛,董文宾,等.猪皮胶原蛋白多肽螯合钙增加大鼠骨密度[J].*食品科学*,2017,23:191-195
XU Xian-meng, DONG Wen-bin, et al. Porcine skin collagen polypeptide chelated calcium increases bone density in rats [J]. *Food Science*, 2017, 23: 191-195
- [6] 孙莉洁,梁金钟.响应面法优化大豆肽与钙离子螯合的研究[J].*中国粮油学报*,2010,25(1):22-27
SUN Li-jie, LIANG Jin-zhong. Optimization of chelation of soy peptides and calcium ions by response surface methodology [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2010, 25(1): 22-27
- [7] 刘文颖,鲁军,宋莎莎,等.乌鸡低聚肽亚铁螯合物的分离纯化与结构鉴定(英文)[J].*现代食品科技*,2017,8:95-102
LIU Wen-ying, LU Jun, SONG Sha-sha, et al. Isolation, purification and structural identification of ethylene chelate of oligomeric peptides from black-bone chicken [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2017, 8: 95-102
- [8] Tamai I, Nakanishi T, Hayashi K, et al. The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of beta-lactam antibiotics in the rat small intestine [J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2011, 49(8): 796-801
- [9] Naito H. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine [J]. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*, 1986, 32(1): 67-76
- [10] 卢玉坤.鳕鱼皮胶原蛋白肽的促钙吸收作用研究[D].中国海洋大学,2013
LU Yu-kun. Calcium absorption of carp skin collagen peptide [D]. *Ocean University of China*, 2013
- [11] 祝德义,李彦春,靳丽强,等.胶原多肽与钙结合性能的研究[J].*中国皮革*,2005,34(3):29-32
ZHU De-yi, LI Yan-chun, JIN Li-qiang, et al. Study on the binding properties of collagen peptide and calcium [J]. *China Leather*, 2005, 34(3): 29-32
- [12] 刘文颖,任玮,谷瑞增,等.三文鱼骨胶原低聚肽钙的分离纯化及结构鉴定[J].*食品工业科技*,2016,37(7):49-51
LIU Wen-ying, REN Wei, GU Rui-zeng, et al. Separation, purification and structural identification of marine collagen oligopeptide calcium [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 37(7): 49-51
- [13] 刘文颖,谷瑞增,林峰,等.三文鱼骨胶原低聚肽钙配合物的稳定性[J].*食品工业科技*,2015,36(4):111-115
LIU Wen-ying, GU Rui-zeng, LIN Feng, et al. Stability of marine collagen oligopeptide calcium complexes [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(4): 111-115
- [14] 卫生部食品卫生监督检验所.GB/T 5009.5-2003 食品中蛋白质的测定[S]
Food Hygiene Supervision and Inspection Institute of the Ministry of Health. GB/T 5009.5-2003 Determination of Protein in Food [S]
- [15] 卫生部食品卫生监督检验所 GB/T 5009.92-2003.食品中钙的测定[S]
Food Hygiene Supervision and Inspection Institute of the Ministry of Health. GB/T 5009.92-2003. Determination of Calcium in Food [S]
- [16] 张朋.保健食品增加骨密度功能评价方法研究[D].南京:东南大学,2012
ZHANG Peng. Study on the evaluation method of bone mineral density increase in health foods [D]. Nanjing: Southeast University, 2012
- [17] 李勇,葛向阳,等.复合肽螯合锌有效螯合率测定方法研究-凝胶过滤色谱络合滴定法[J].*中国食品添加剂*,2012,3:222-228
LI Yong, GE Xiang-yang, et al. Determination of effective chelation rate of compound peptide chelated zinc-gel filtration chromatography complexometric titration [J]. *China Food Additive*, 2012, 3: 222-228
- [18] 蔡冰娜,陈忻,潘剑宇,等.响应面法优化鳕鱼皮胶原蛋白肽螯合铁工艺[J].*食品科学*,2012,33(2):48-52
CAI Bing-na, CHEN Xin, PAN Jian-yu, et al. Optimization of the process of chelated iron of carp collagen peptide by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2012, 33(2): 48-52
- [19] 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*,2013,6:242-246
XIA Guang-hua, SHEN Xuan-ri, Jiu Zhi-qiang. Preparation, identification and antioxidant of lactobacillus collagen small peptide chelate calcium [J]. *Food Science*, 2013, 6: 242-246

- [20] 孙建义,许梓荣,李卫芬,等.小肽转运蛋白(PepT1)基因研究进展[J].动物营养学报,2002,14(4):1-6
SUN Jian-yi, XU Zi-rong, LI Wei-fen, et al. Progress in the study of small peptide transporter (PepT1) gene [J]. Journal of Animal Nutrition, 2002, 14(4): 1-6
- [21] 周倩,马丹丹,李梦洁,等.酶解骨钙粉细粉与普通酶解骨钙粉增加骨密度功能比较[J].食品科学,2012,21:303-307
ZHOU Qian, MA Dan-dan, LI Meng-jie, et al. Comparison of enzymatic calcium-calcium powder and common enzymatic calcium powder to increase bone mineral density [J]. Food Science, 2012, 21: 303-307
- [22] 王灿楠,刘德成,庄明,等.钙吸收利用与钙摄入量关系的动物实验研究[J].卫生研究,2002,6:439-441
WANG Can-nan, LIU De-cheng, ZHUANG Ming, et al. Animal experimental study on the relationship between calcium absorption and calcium uptake [J]. Health Research, 2002, 6: 439-441
- [23] 孙皎皎.猪皮明胶酶解制剂对骨密度影响的研究[D].西安:陕西科技大学, 2015.
SUN Jiao-jiao. Study on the effect of pig skin gelatin hydrolysate on bone mineral density [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2015.
- [24] 成静,陈栋梁,倪萌,等.胶原肽螯合钙的吸收试验研究[J].食品科技,2012,5:64-67
CHENG Jing, CHEN Dong-liang, NI Meng, et al. Experimental study on the absorption of collagen peptide chelated calcium [J]. Food Science and Technology, 2012, 5: 64-67
- [25] 刘华平,张燕荷,杨琳,等.孕期妇女钙代谢及骨密度的变化及补钙的影响[J].空军总医院学报,2002,18(1):10-12,15
LIU Hua-ping, ZHANG Yan-he, YANG Lin, et al. Changes of calcium metabolism and bone mineral density and effects of calcium supplementation in pregnant women[J]. Journal of Air Force General Hospital, 2002, 18(1): 10-12, 15
- [26] Han Fei, Shi Hui, Le Guowei, et al. Molecular characteristics of peptide transporters [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2003, 11(9): 1436-1442
- [27] 刘闪,刘良忠,陈阳明,等.白鲢鱼骨胶原低聚肽螯合钙的结构表征及其促细胞增殖作用[J].中国食品学报,2016,16(9): 185-191
LIU Shan, LIU Liang-zhong, CHEN Yang-ming, et al. Structural characterization and cell proliferation of collagen oligopeptide chelating calcium in white catfish [J]. Chinese Journal of Food Science, 2016, 16(9): 185-191
- [28] Reynolds E C, Cai F, Cochrane N J, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate [J]. Journal of Dental Research, 2008, 87(4): 344

(上接第 128 页)

- [16] Shehata M G, El Sohaimy S A, El-Sahn M A, et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity [J]. Annals of Agricultural Sciences, 2016, 61(1): S057017831630001X
- [17] Vázquez J. Human physiology [J]. American Biology Teacher, 2006, 68(3): 169-169
- [18] Kullak-Ublick G A, Stieger B, Meier P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease [J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322-342
- [19] Tsai C C, Lin P P, Hsieh Y M, et al. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo* [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014(5): 690752
- [20] Liu Y B, Zhao F, Liu J, et al. Selection of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and its effects on rats fed with high-cholesterol diet [J]. Current Microbiology, 2017, 74(5): 623-631
- [21] 李妍,张兰威.几株乳酸菌益生潜力及降胆固醇的研究[J].微生物学通报,2007,34(6):1146-1149
LI-Yan, ZHANG Lan-wei. Study on the probiotic properties of some lactic acid bacteria strains [J]. Microbiology China, 2007, 34(6): 1146-1149
- [22] Ouwehand A C, Tuomola E M, TLkk S, et al. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64(1): 119-126
- [23] Pereira D I A, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4689