

等温滴定量热法探索酪蛋白磷酸肽单体与不同钙盐的相互作用

罗敏娜¹, 肖杰¹, 张惜君¹, 李伟¹, 曹素芳², 彭小雨², 曹庸¹

(1. 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) (2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410200)

摘要: 本研究探讨了在模拟小肠末端环境下酪蛋白磷酸肽(β -casein phosphopeptides(1-25), 简称 CPP)与不同钙盐的相互作用情况。实验以等温滴定量热仪为方法, 以热力学参数、化学计量数及亲和力常数为指标, 评价不同钙盐与 CPP 的相互作用情况。结果表明, CPP 与不同钙盐两两相互作用, 且均为由熵驱动的自发反应(pH 8.0, 37 °C), 该反应的主要推动力为离子相互作用力。不同钙盐与 CPP 反应时, 焓变, 熵变及自由能无明显差别($p>0.05$), 而化学计量数和亲和力常数存在显著性差异($p<0.05$)。CPP 与葡萄糖酸钙, 乳酸钙和氯化钙相互作用时, 化学计量数较高(3~4 mol/mol), 而与天冬氨酸钙结合的化学计量数较低(2~3 mol/mol)。此外, 相比其他钙盐, 乳酸钙与 CPP 结合的亲和力常数最低。多肽与钙盐结合数高且亲和力较低时有利于小肠对钙的吸收。因此, 相对于其他钙盐, CPP 与乳酸钙结合可能更有利于小肠对钙的吸收。本研究为更好地了解 CPP 与不同钙盐溶液在模拟小肠末端环境下的热力学变化及结合情况奠定坚实的基础。

关键词: 钙盐; 酪蛋白磷酸肽; 等温滴定量热仪; 热力学

文章编号: 1673-9078(2020)10-86-92

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0150

Isothermal Titration Calorimetric Studies on the Interactions between Casein Phosphopeptide Monomers and Different Calcium Salts

LUO Min-na¹, XIAO Jie¹, ZHANG Xi-jun¹, LI Wei¹, CAO Su-fang², PENG Xiao-yu², CAO Yong¹

(1. 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) (2. Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd., Changsha 410200, China)

Abstract: In this study, the interactions between β -casein phosphopeptides (1-25) (CPP) and different calcium salts were investigated in the simulated small intestine terminal environment were investigated. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used as the analysis method, and thermodynamic parameters, stoichiometric number and affinity constants were used as indicators to evaluate the interactions between different calcium salts and CPP. The results showed that CPP could interact with different calcium salts, and both were spontaneous reactions driven by entropy (pH 8.0, 37 °C). The main driving force of this reaction was ionic interactive forces. When different calcium salts reacted with CPP, there was no obvious difference in enthalpy change, entropy change and free energy ($p>0.05$), but there were significant differences in stoichiometric number and affinity constants ($p<0.05$). The stoichiometric number was higher (3~4) when CPP interacted with calcium gluconate, calcium lactate or calcium chloride, whilst the stoichiometric number was lower (2~3) when CPP interacted with calcium aspartate. In

引文格式:

罗敏娜,肖杰,张惜君,等.等温滴定量热法探索酪蛋白磷酸肽单体与不同钙盐的相互作用[J].现代食品科技,2020,36(10): 86-92

LUO Min-na, XIAO Jie, ZHANG Xi-jun, et al. Isothermal titration calorimetric studies on the interactions between casein phosphopeptide monomers and different calcium salts [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 86-92

收稿日期: 2020-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(3197160311); 广东省创新创业团队项目(2019ZT08N291)

作者简介: 罗敏娜(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性提取、分离、鉴定及活性评价

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物提取、分离、鉴定及活性评价

addition, compared with other calcium salts, calcium lactate had the lowest affinity constant for its binding to CPP. A higher number of calcium salt binding to the peptide and a lower binding affinity were beneficial to the absorption of calcium in the small intestine. Therefore, compared with other calcium salts, the binding of CPP with calcium lactate may be more conducive to the absorption of calcium in the small intestine. This study lays a solid foundation for better understanding of the thermodynamic changes and interactions of CPP with different calcium salts in the environment simulating that of the small intestine.

Key words: calcium salts; casein phosphopeptides; isothermal titration calorimetry; thermodynamics

钙是人体中含量最多的微量元素, 约占体重的1.5%~2.0%。长期缺钙会导致骨骼和牙齿发育不全、骨质疏松症、贫血, 甚至于高血压和冠心病等^[1]。酪蛋白磷酸肽(β -casein phosphopeptides(1-25), 简称CPP)是以牛乳酪蛋白为原料, 由 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -和K-酪蛋白(大约为3:0.8:3:1)组成, 经单一酶或复合酶系作用, 再经分离纯化而得到的含有成簇磷酸丝氨酸的促钙吸收肽^[2]。前期研究表明^[3], 酪蛋白磷酸肽通过与钙离子结合, 能防止小肠末端(回肠)中碱性pH下金属离子的沉淀, 从而促进人体或动物对钙离子的吸收。1950年, Mellander等^[4]从酪蛋白的胰蛋白酶水解物中分离得到酪蛋白磷酸肽, 这些多肽与钙盐结合形成的络合物在生理pH下具有非常好的溶解性。无论正常婴儿还是佝偻病患者, 对CPP螯合状态下的钙的吸收比自然状态下的钙(如碳酸钙, 磷酸肽)的吸收更好。孙圣伟等^[5]通过体外实验研究, 发现CPP具有明显延长持钙时间、有效抑制钙沉淀的作用。Perego等^[6]通过HT-29肿瘤细胞模型证明了CPP能促进钙的吸收。Mykkanen等^[7]通过动物实验证明, 酪蛋白磷酸肽可以提高佝偻病鸡的钙吸收能力。

目前, 补钙产品分为三种, 一种为无机钙, 如碳酸钙、磷酸钙、氧化钙及磷酸氢钙等。但因其溶解性小, 生物活性较差^[8], 不利于被吸收利用, 故目前市场比较少用。另一种为有机钙, 如葡萄糖酸钙、乳酸钙、醋酸钙、柠檬酸钙及果糖酸钙等。相对于无机钙, 其溶解性更好且对胃肠道的刺激小。但是, 它的缺点是人体对其吸收较差, 其 Ca^{2+} 易与食物中的磷酸盐和草酸盐形成沉淀而使体内钙离子流失, 从而不利于人体对钙的吸收。随着第三代补钙产品-促钙吸收肽的出现, 越来越多的产品通过将钙盐混合促钙吸收肽使用, 促进钙离子能够最大程度地被人体吸收^[1]。所以, 目前市场上的钙制剂(如钙片和奶粉等)一般会添加多肽来提高其吸收率。将无机钙或有机钙与多肽复合, 能够克服单一钙制剂的缺点, 具有高溶解性, 高生物活性等优点。但是, 目前不同的钙产品的生产采用不同的钙离子来源, 如葡萄糖酸钙-多肽, 氯化钙-多肽, 和乳酸钙-多肽复合物等, 却较少评价不同钙盐对多肽与钙离子相互作用的影响。目前评价蛋白或多肽与小

分子的相互作用的手段主要有等温滴定量热法(Isothermal Titration Calorimetry, 简称ITC)^[9], 超速离心分析技术^[10], 质谱技术^[11]等。其中, 等温滴定量热法因具有样品用量小, 反应时间短, 不破坏样品, 适合研究分子间弱相互作用而成为最有效的实验手段之一^[12]。

不同的钙盐与多肽的相互作用的热力学特性对理解钙离子在生物系统中的作用十分关键^[13]。ITC可用于直接表征生物分子(如蛋白和金属离子)之间相互作用的热能变化, 为多肽和钙离子结合的潜在的分子机制提供大量的信息。目前, ITC已应用于研究牛奶蛋白、大豆蛋白和酪蛋白磷酸肽与钙离子之间的相互作用, 并确定其相互作用的热能参数, 化学计量数, 及亲和力常数。Zidane等^[9]通过ITC研究不同金属离子与多肽的相互作用的情况。Liao^[14]等通过ITC研究多肽单体VLPVPQK与钙离子结合的热力学变化和化学计量数等。Hou^[15]等通过ITC研究不同多肽与钙结合的相互作用情况。

本文旨在研究酪蛋白磷酸肽活性单体CPP与不同钙盐的相互作用情况。实验以目前市面上常用于钙片、奶粉等的钙盐(氯化钙, 乳酸钙, 葡萄糖酸钙和天冬氨酸钙)为原料, 以等温滴定量热法为手段, 以期评价不同钙盐对CPP的相互作用情况奠定坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高纯酪蛋白磷酸肽、氯化钙(分析纯), 广州绿萃生物科技有限公司; 乙腈, 天津市富宇精细化有限公司; 葡萄糖酸钙(分析纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Tris, BBI Life sciences; 乳酸钙(分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; L-天门冬氨酸钙(分析纯), 源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

等温滴定量热仪 ITC200, 英国马尔文仪器有限公司; 电子天平(十万分之一天平)ME204/02, 梅特

勒-托利多仪器(上海)有限公司;分析型高效液相色谱仪 LC-10A, 岛津;制备型高效液相色谱仪 LC-10AT, 岛津仪器(中国)有限公司。

1.3 酪蛋白磷酸肽单体 CPP 的纯度

CPP 是根据实验室之前的分离纯化方法^[16,17], 经过制备高效液相色谱从高纯酪蛋白磷酸肽(含量 $\geq 90\%$)混合物分离纯化获得的具有高结合钙离子活性的多肽。经过 LC-MS/MS 和氨基酸测序等确定其氨基酸序列。其序列为 RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEE Sitr (β -酪蛋白(1-25)), 其中 pS 代表磷酸丝氨酸, 共 25 个氨基酸, 其分子量为 3132。利用高效液相分析型色谱(C18 色谱柱, 检测波长 215 nm)测定收集组分出峰的丰度。利用面积归一化法计算酪蛋白磷酸肽单体的纯度。两种缓冲液体系为: 0.1% TFA-乙腈(有机相)、0.1% TFA-水(水相)。梯度程序为: 0~14 min, 15%~22%有机相、14~30 min, 22%~25%有机相。经过面积归一化法计算 CPP 单体纯度高于 98%。

1.4 溶液的配制

1.4.1 Tris 缓冲液

称取 212.00 ± 0.01 g Tris 粉末, 将其溶解于 100 mL 一级水, 然后测定 pH, 往其中滴入 HCl 溶液, 直至 pH 为 8.00 ± 0.01 。将 Tris-HCl 缓冲液移入 100 mL 的烧杯, 备用。

1.4.2 四种盐溶液的配制

称取四种钙盐粉末, 并将其溶解于已配好的 Tris-HCl 缓冲液中(葡萄糖酸钙 24.60 ± 0.01 mg/20 mL, 氯化钙 31.80 ± 0.01 mg/100 mL, 葡萄糖酸钙 35.30 ± 0.01 mg/20 mL, 天冬氨酸钙 17.40 ± 0.01 mg/20 mL), 配成溶液浓度为 2.86 mM, 备用。

1.4.3 酪蛋白磷酸肽溶液

称取 0.90 ± 0.01 mg 的 CPP 粉末, 将其溶解于 10 mL 的已配好的 Tris-HCl 缓冲液中, 配成溶液浓度为 0.05 mM, 备用。

1.5 等温滴定量热法

等温滴定量热法是通过测定两个物质相互作用后释放/吸收的热量, 计算两者相互作用的热力学参数、化学计量数及亲和力常数。本实验是在 Zidane 等的实验方法^[9]基础上做稍微的修改。首先, 配置 pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。然后, 用该缓冲液配置 0.05 mM 的 CPP 溶液和 2.86 mM 的金属离子溶液浓度。紧接着, 用迪康 90 将样品池洗干净后, 进行空白试验, 即用水

滴缓冲液和用钙盐溶液滴缓冲液, 试验结束后将实验数据扣除该空白实验数据即为 CPP 和钙盐溶液之间的热能变化。在滴定管中加入金属离子溶液, 在样品池中加入多肽溶液。样品池温度 37°C (模拟小肠的温度)。每次进样 $2\ \mu\text{L}$, 滴定 20 针。滴定结束后, 运用仪器配备的 Origin 软件分析以获得结合等温线。实验数据通过非线性最小二乘法拟合, 得到反应的结合位点数 N 、亲和力常数 K 、焓变 ΔH , 熵变 ΔS 。此外, 吉布斯自由能 ΔG 的计算方式如下:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

其中, T 表示实验温度, 即为 310 K。

1.6 统计学方法

采用 OriginPro 9 软件进行实验数据处理, 以平均值 \pm 标准差的形式表示。利用 SPSS 16.0 软件进行数据差异性分析, $p < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 CPP 与不同钙盐的相互作用情况

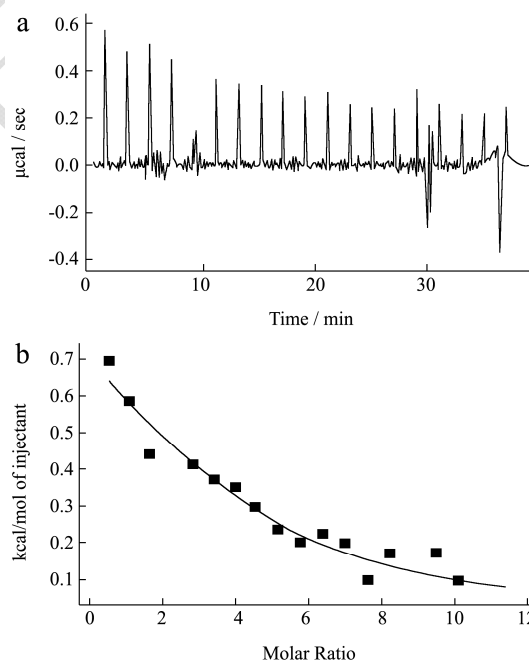


图1 等温滴定法测定 CPP 和葡萄糖酸钙的相互作用情况

Fig.1 The interaction between CPP and calcium gluconate detected by ITC

为了确定 CPP 与不同钙盐是否能反应及其相互作用情况, 我们采用 ITC 进行测定。结果如图 1~4 所示, 葡萄糖酸钙, 氯化钙, 乳酸钙和天冬氨酸钙在模拟小肠环境 (pH 8.0, 37°C) 条件下与 CPP 结合, 存在热量变化且热量逐渐减少, 说明不同的钙盐与 CPP 结合, 两两相互作用并逐渐达到饱和状态。相同地,

很多研究也表明多肽与钙离子能发生相互作用^[14,18]。但是不同钙盐与 CPP 反应, 吸收的热量及 ITC 图形不一致, 说明不同盐溶液对 CPP 与钙离子的结合存在影响。因此我们通过分析 CPP 与不同钙盐的热力学变化, 钙肽结合的化学计量数及亲和力常数具体分析不同钙盐对 CPP 的影响。

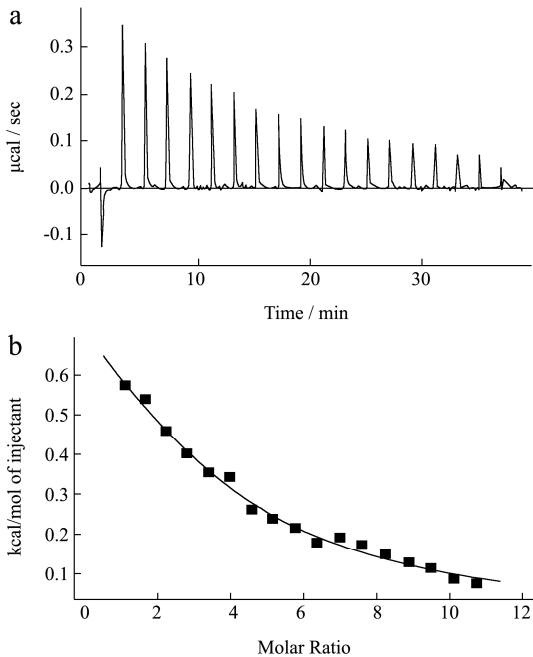


图2 等温滴定法测定 CPP 和氯化钙的相互作用情况
Fig.2 The interaction between CPP and calcium chloride detected by ITC

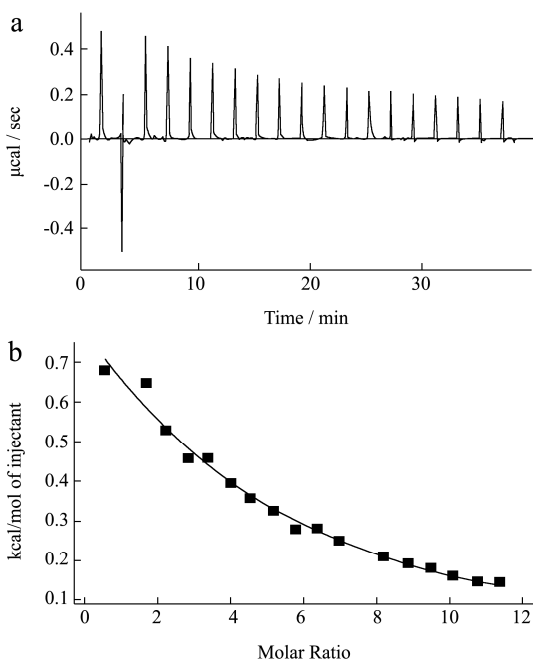


图3 等温滴定法测定 CPP 和乳酸钙的相互作用情况
Fig.3 The interaction between CPP and Calcium lactate detected by ITC

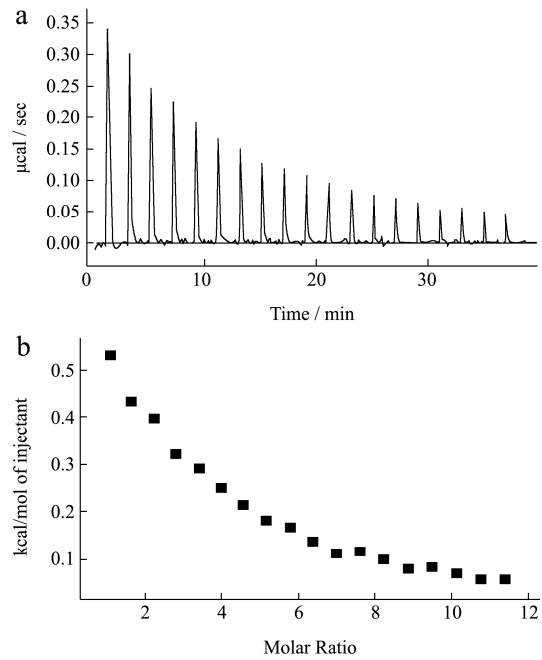


图4 等温滴定法测定 CPP 和天冬氨酸钙的相互作用情况
Fig.4 The interaction between CPP and aspartate calcium detected by ITC

注: 图 1~图 4 中, (上层) 多肽与钙盐反应的吸热反应的原始 ITC 数据; (下层) 通过采用 one set of sites 模式对原始数据进行非线性拟合获得。

2.2 CPP 与不同钙盐溶液相互作用的热力学变化

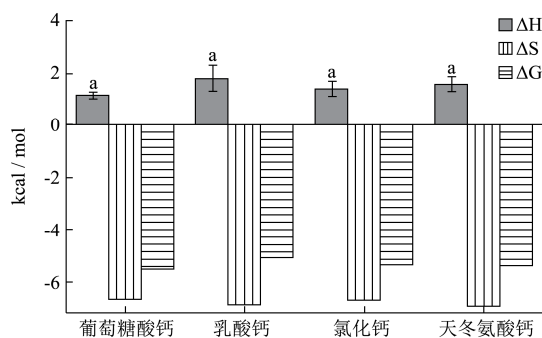


图5 CPP 与不同钙盐溶液相互作用的热力学常数 (ΔH)
Fig.5 The thermodynamic parameters of CPP when binds with different calcium salts

为了分析不同的钙盐滴定 CPP 后的热力学变化, 本研究展示了四种钙盐滴定 CPP 后的焓变 (ΔH), 熵变 (ΔS) 和吉布斯自由能 (ΔG)。如图 5 所示, 不同的钙盐滴定 CPP 后的焓变, 熵变及自由能均无显著性差异 ($p>0.05$)。此外, 不同钙盐与 CPP 结合的焓变均大于 0, 为吸热反应。这与之前的研究一致。金等^[19]通过 ITC 分析蛋清肽与锌离子的结合反应, 得到焓变

亦大于 0。同样地, Zidane 等^[9]通过 ITC 研究表明酪蛋白磷酸肽与钙离子结合为吸热反应。此外, 吉布斯自由能 ΔG (kcal/mol)均小于 0, 表示模拟小肠末端环境下, CPP 与四种钙盐均自发进行反应。并且, 由于 $-T\Delta S$ 均大于 ΔH , 导致 ΔG 小于 0, 表明熵变克服了焓变^[9], 因此该反应是由熵驱动的^[20], 离子相互作用力是该过程的主要推动力^[21]。

2.3 CPP 与不同钙盐溶液的化学计量数的对比

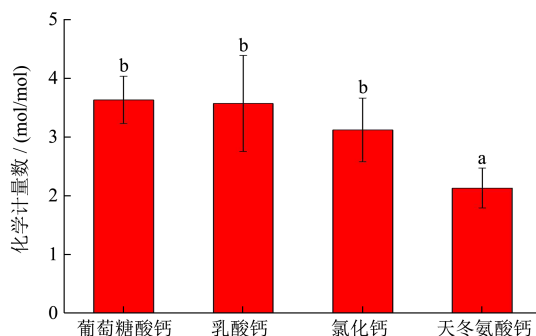


图 6 CPP 与不同钙盐溶液的化学计量数的比较

Fig.6 The stoichiometry of CPP when interacts with different calcium salts

为了研究不同钙盐对 CPP 的钙结合能力的影响, 我们分析了不同钙盐与 CPP 结合的化学计量数, 结果如图 6 所示。CPP 的结合位点数的大小与钙离子在小肠末端被吸收的程度有关。结合位点数越大表示越多钙离子能与 CPP 络合成可溶状态, 从而有利于小肠对钙离子吸收^[22]。在小肠末端环境下 (pH 8.0, 37 °C), 葡萄糖, 乳酸钙和氯化钙与 CPP 结合的结合数无显著性差异 ($p>0.05$), 而这三种钙盐与天冬氨酸钙的肽结合化学计量数存在明显差异 ($p<0.05$)。其中, 葡萄糖酸钙, 乳酸钙和氯化钙与 CPP 的结合位点数约为 3~4 个。而天冬氨酸钙与 CPP 的结合数较小, 约为 2~3 个。这说明天冬氨酸钙与 CPP 的结合与其他钙盐存在差异。表明相比于其他钙盐, 天冬氨酸盐的添加可能会使 CPP 的钙结合能力变弱。此外, 从总体而言, 不同钙盐与 CPP 的化学计量数在 2~4 之间。说明每摩尔 CPP 可结合 2~4 摩尔的钙离子。前人研究中, Zidane 等^[9]在同样实验条件下测得多肽的化学计量数约为 2, 这与本实验结果相似。另外, 有研究表明^[23], 在 pH=8 时, CPP 含有 16 个负电荷 (四个磷酸基残基, 七个谷氨酰胺残基和末端羧基), 它们均可与二价金属离子结合。而本实验 CPP 仅结合 2~4 个钙离子, 这可能是由于同一个钙离子会与多个负电荷基团结合, 导致结合数较少^[15]。此外, 有作者报道^[20], 每 1 摩尔酪蛋白分子可结合 4~10 摩尔的钙离子。而本实验中只结合 2~4 摩尔的钙离子, 这可能是由于酪蛋白分子中的结合位

点比 CPP (注: CPP 是酪蛋白分子中的一个片段) 多, 从而结合钙的个数相对较多。

2.4 CPP 与不同钙盐溶液的亲和力常数的对比

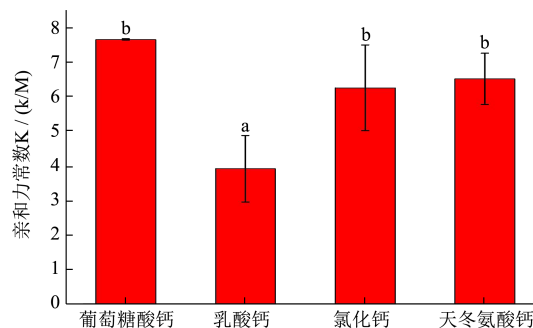


图 7 CPP 与不同钙盐溶液的亲和力常数

Fig.7 The binding affinities of CPP when binds with different calcium salts

为了评价不同钙盐与 CPP 结合的亲和力常数 K, 我们研究了四种常见钙盐对 CPP 结合的亲和力常数的影响, 结果如图 7 所示。多肽与钙离子反应的亲和力大小与 CPP 的钙释放能力相关。亲和力越小, 越有利于钙在小肠中的释放^[9,24]。由图 7 可知, 在小肠末端环境下 (pH 8.0, 37 °C), CPP 与不同的钙盐反应的亲和力不同。其中, 葡萄糖酸钙, 氯化钙和天冬氨酸钙与 CPP 的亲和力常数较高, 而乳酸钙与 CPP 结合的亲和力常数较低。这说明相比于其他钙盐, 乳酸钙与 CPP 结合可能更有利于肠道对钙的吸收。这可能是因为不同钙盐对 CPP 的结构的不同影响所致。前人的研究结果中, 傅里叶红外光谱结果表明钙离子会影响 CPP 的构象^[25]。核磁共振实验研究表明钙离子的添加对 CPP 的化学位移会产生影响, 尤其是对磷酸化区域^[26]。而磷酸化区域 (pSer-pSer-pSer-Glu-Glu) 是钙离子结合的主要区域, 影响该区域构象会影响其钙结合能力及亲和力。此外, 总体而言, 相比于 EDTA^[15], 这四种钙盐与 CPP 的亲和力都较低。此亲和力常数与前人报道的结果一致, 均相对较低。其中, Mekmene 等^[27]的实验表明酪蛋白磷酸肽和 β -酪蛋白与钙结合的亲和力常数分别是 $3701\pm 608 \text{ M}^{-1}$ 和 $5106\pm 635 \text{ M}^{-1}$ 。Zidane 等^[9]实验结果表明 CPP 与钙结合的亲和力常数是 $4900\pm 0.5 \text{ M}^{-1}$, 这说明 CPP 和钙离子结合时的亲和力都相对较低, 印证了多肽螯合钙更有利于小肠吸收的说法。

3 结论

本研究通过等温滴定量热法评价不同钙盐和多肽的相互作用情况, 结果表明, 酪蛋白磷酸肽 (CPP) 与不同钙盐结合时, 均能两两相互作用。不同钙盐与

CPP 结合后其焓变, 熵变和自由能无显著性差异 ($p>0.05$), 而化学计量数和亲和力常数存在差异 ($p<0.05$)。其中, CPP 与葡萄糖酸钙, 乳酸钙和氯化钙相互作用, 结合位点数较高 (3~4 个), 与天冬氨酸钙的结合位点数较低 (2~3 个)。此外, 乳酸钙相比于其他的钙盐, 与 CPP 结合可能更有利于肠道对钙离子的吸收, 原因是葡萄糖酸钙, 氯化钙和天冬氨酸钙与 CPP 的亲和力常数较高, 而乳酸钙与 CPP 结合的亲和力常数较低。此外, 从总体而言, 在小肠末端条件下 (pH 8.0, 37 °C) 不同钙盐与钙离子结合均为由熵驱动吸热反应, 且该实验自发发生, 离子相互作用力是该反应的主要推动力。此外, 在此条件下, CPP 可结合为 2~4 个钙离子, 且与钙离子的亲和力都较低。说明 CPP 与钙离子的结合有利于肠道的吸收。本实验为更好地了解 CPP 与不同钙盐溶液的热力学变化及其结合情况奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] 陈华, 钟红茂, 范洁伟, 等. 国内补钙产品的研究现状[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 6: 57-59
CHEN Hua, ZHONG Hong-mao, FAN Jie-wei, et al. Research status of calcium-supplemented products in China [J]. Journal of Modern Food and Medicine, 2007, 6: 57-59
- [2] SUN Na, WU Hai-tao, DU Ming, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 140-148
- [3] Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of casein phosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate [J]. Nutrition Research, 2001, 21(4): 649-656
- [4] Mellander O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. Some aspects of the pathogenesis of rickets [J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 1950, 55: 247-257
- [5] 孙圣伟, 郭斌, 苗建银, 等. 不同钙片产品体外快速持钙活性与原子吸收法测定含钙量的比较研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 93-98, 83
SUN Sheng-wei, GUO Bin, MIAO Jian-yin, et al. Comparison of calcium content in different calcium products by rapid calcium-holding activity *in vitro* and atomic absorption spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 93-98, 83
- [6] Ferraretto A, Signorile A, Gravaghi C, et al. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells [J]. Journal of Nutrition, 2001, 131(6): 1655-1661
- [7] Mykkänen H, Wasserman R. Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks [J]. The Journal of Nutrition, 1980, 110(11): 2141-2148
- [8] 蒋金来, 王令充, 吴皓, 等. 钙制剂研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 379-382, 387
JIANG Jin-lai, WANG Ling-chong, WU Hao, et al. Research progress in calcium preparation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 379-382, 387
- [9] Zidane F, Mateos A, Cakir-Kiefer C, et al. Binding of divalent metal ions to 1-25 beta-casein phosphopeptide: an isothermal titration calorimetry study [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 391-398
- [10] Schuck P. Analytical ultracentrifugation as a tool for studying protein interactions [J]. Biophysical Reviews, 2013, 5(2): 159-171
- [11] Smits A H, Vermeulen M. Characterizing protein-protein interactions using mass spectrometry: challenges and opportunities [J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(10): 825-834
- [12] Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands [J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 186-191
- [13] Makowska J, Żamojć K, Wyrzykowski D, et al. Binding of Cu (II) ions to peptides studied by fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 153: 451-456
- [14] LIAO Wan-wen, LIU Shuo-jun, LIU Xiao-rong, et al. The purification, identification and bioactivity study of a novel calcium-binding peptide from casein hydrolysate [J]. Food & Function, 2019, 10(12): 7724-7732
- [15] 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
- [16] 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, 65(11): 2307-2314
- [17] 刘果, 孙圣伟, 苗建银, 等. 酪蛋白磷酸肽活性单体分离纯化、固相合成及结构差异研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33

- (10):110-116
LIU Guo, SUN Sheng-wei, MIAO Jian-yin, et al. Purification, solid-phase synthesis and structural differentiation of casein phosphopeptides active monomers [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 110-116
- [18] SUN Na, JIN Zi-qi, LI Dong-mei, et al. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide, Asp-His-Thr-Lys-Glu, and *in vitro* calcium absorption studies of peptide-calcium complex [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(44): 9782-9789
- [19] 金子琪,王迪,林松毅,等.蛋清肽(DHTKE)的锌结合模式研究[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会,2018:1
JIN Zi-qi, WANG Di, LIN Song-yi, et al. Study on zinc-binding pattern of egg white peptide (DHTKE) [C]// The 15th Annual Meeting of CIFST, 2018: 1
- [20] Canabady-Rochelle L-S, Sanchez C, Mellema M, et al. Thermodynamic characterization of calcium-milk protein interaction by isothermal titration calorimetry [J]. Dairy Science & Technology, 2009, 89(3): 257-267
- [21] 齐心洁,王玥,王彦晟,等等温滴定量热法在蛋白质-配体相互作用中的应用[J].生物技术通报,2017,33(5):40-49
QI Xin-jie, WANG Yue, WANG Yan-sheng, et al. Applications of isothermal titration calorimetry in protein-ligand interactions [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(5): 40-49
- [22] Holt C, Wahlgren N M, Drakenberg T. Ability of a beta-casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters [J]. Biochemical Journal, 1996, 314(3): 1035-9
- [23] Cross K J, Huq N L, Bicknell W, et al. Cation-dependent structural features of beta-casein-(1-25) [J]. Biochemical Journal, 2001, 356(1): 277-286
- [24] 李宜斐,周茜.我的名字叫钙[J].医药世界,2007,11:18-19
LI Yi-fei, ZHOU qian. My name is calcium [J]. Medicine World, 2007, 11: 18-19
- [25] Curley D M, Kumosinski T F, Unruh J J, et al. Changes in the secondary structure of bovine casein by fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature [J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81(12): 3154-3162
- [26] Wahlgren N M, Dejmek P, Drakenberg T. Secondary structures in β -casein peptide 1-42: a two dimensional nuclear magnetic resonance study [J]. Journal of Dairy Research, 1994, 61(4): 495-506
- [27] Mekmene O, Gaucheron F. Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: a modelling approach using free calcium measurement [J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 676-682

(上接第 225 页)

- [20] 朱雪峰.大豆分离蛋白热聚集颗粒稳定 Pickering 乳液的冻融稳定性[D].广州:华南理工大学,2017
ZHU Xue-feng. Freeze-thaw stability of the Pickering emulsion stabilized by soy protein isolate heat-aggregated particles [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [21] Rayner M, Marku D, Eriksson M, et al. Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 458: 48-62
- [22] Magnusson E, Rosén C, Nilsson L. Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(4): 707-715
- [23] Anton M. Composition and Structure of Hen Egg Yolk [M]. Springer, Berlin, Heidelberg: Bioactive Egg Compounds, 2007: 1-6
- [24] Shariful I M, Katsuno N, Nishizu T. Factors affecting mayonnaise destabilization during freezing [J]. Reviews in Agricultural Science, 2018, 6: 72-80
- [25] Khanitta Manoi, Syed S H Rizvi. Emulsification mechanisms and characterizations of cold, gel-like emulsions produced from texturized whey protein concentrate [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7): 1837-1847
- [26] LIU Xiao, GUO Jian, WAN Zhi-li, et al. Wheat gluten-stabilized high internal phase emulsions as mayonnaise replacers [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 168-175
- [27] XU Yan-teng, TANG Chuan-he, LIU Tong-xun, et al. Ovalbumin as an outstanding Pickering nanostabilizer for high internal phase emulsions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(33): 8795-8804