

不同水解度酪蛋白磷酸肽的理化性质和 持钙能力比较

王倩倩¹, 杜 鹃², 冯凤琴^{1*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; 2. 杭州康源食品科技有限公司, 杭州 310012)

摘要: 目的 研究不同水解度(degree of hydrolysis, DH)酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptide, CPP)的理化性质和持钙能力。**方法** 实验室自制得到水解度分别为 4.32%~26.76%的 CPP 样品, 分别测定 CPP 含量[高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和钡-乙醇沉淀法]、等电点不溶物含量、相对分子质量分布和持钙能力。**结果** 随着水解度的上升, 通过 HPLC 测定的 CPP 标志峰的峰面积随之增加, 等电点不溶物含量随之减少, 而通过钡-乙醇沉淀法得到的 CPP 含量无明显变化, 可将等电点不溶物含量作为评价产品质量的指标; 目前的相对分子质量分布检测方法对不同水解度的 CPP 样品检测误差较大, 需使用酸溶蛋白含量作为校正系数进行校正后方可使用; 当 CPP 的质量浓度为 0.6~0.8 mg/mL 时, 水解度为 9.22%和 15.06%的 CPP 的持钙能力效果优于其他水解度的 CPP。**结论** 水解度对酪蛋白磷酸肽的理化性质和持钙能力有明显的影响, 在实际应用时应选用合适的水解度和检测方法。

关键词: 酪蛋白磷酸肽; 水解度; 理化性质; 持钙能力

Comparative study on the physicochemical characteristics and calcium holding capacities of casein phosphopeptides with different degrees of hydrolysis

WANG Qian-Qian¹, DU Juan², FENG Feng-Qin^{1*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Hangzhou Kangyuan Food Science & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: Objective To study the physicochemical characteristics and calcium holding capacities of casein phosphopeptides (CPP) with different degrees of hydrolysis (DH). **Methods** CPP was prepared by the laboratory with the DH of 4.32%–26.76%, the content of CPP [high performance liquid chromatography (HPLC) and barium-ethanol precipitation method], content of isoelectric insoluble substance, molecular mass distribution and calcium holding capacity were measured. **Results** With the DH increased, the peak area determined by HPLC and the content of isoelectric insoluble substances of CPP were increased and decreased, respectively, but the content of CPP determined by barium-ethanol precipitation method had not significantly changed, and the content of isoelectric point insoluble matter could be used as an index to evaluate the quality of products; the current relative molecular weight distribution detection method had large detection error for CPP samples with different DH, which could be used after using acid soluble protein content as correction coefficient; when the concentration of CPP was 0.6–0.8

*通信作者: 冯凤琴, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品添加剂。E-mail: feng_fengqin@hotmail.com

*Corresponding author: FENG Feng-Qin, Ph.D, Professor, College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, No.866, Yuhangtang Road, Xihu District, Hangzhou 310058, China. E-mail: feng_fengqin@hotmail.com

mg/mL, the calcium binding capacities of CPP with the DH value of 9.22% and 15.06% were better than that of CPP with other DH. **Conclusion** The degree of hydrolysis has distinct effects on physicochemical characteristics and calcium holding capacities, and the appropriate degree of hydrolysis and detection method should be choose in practical application.

KEY WORDS: casein phosphopeptide; degree of hydrolysis; physicochemical characteristic; calcium holding capacity

0 引言

钙是维持人类身体健康必不可少的矿物质元素, 约占成年人体重的 1.0%~2.0%左右^[1]。据报道, 钙缺乏会导致儿童生长发育不良、骨质疏松症、佝偻病等疾病的发生^[2]。营养调查结果显示, 包括儿童、青少年、孕妇和老年人都存在钙缺乏的现象^[3-5]。因此, 作为钙物质补充剂的功能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。

酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptide, CPP)是牛乳酪蛋白经过酶解得到的结构片段, 其基本结构为-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-, 分子量为 1000~5000 Da^[6-7]。研究表明 CPP 的核心部位(磷酸丝氨酸簇)在弱碱性的条件下, 能有效地与钙形成可溶性复合物, 抑制不溶性钙沉淀的生成, 从而促进小肠对钙的吸收, 同时也以同样的方式促进锌、铁等其他微量元素的吸收, 被誉为“矿物质载体”^[8-12]。随着钙强化剂的推广应用, 国外已将 CPP 广泛应用于钙强化乳制品、营养补充剂以及防龋齿口香糖中^[13-14]。我国目前也已经将 CPP 作为食品营养强化剂用于婴幼儿奶粉、营养保健食品、粮食和粮食制品以及饮料中。

前人研究表明, 水解程度不同时所得到的 CPP 的氨基酸组成和相对分子质量分布是不同的, 这将直接影响其促进钙吸收和利用的功能^[15-16]。因此, 本研究对不同水解度的酪蛋白磷酸肽产品的酪蛋白磷酸肽含量[采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和钼-乙醇法测定]、等电点不溶物含量、相对分子质量分布进行分析, 并通过模拟实验测定了其在不同添加量的持钙能力, 以期在实际生产中 CPP 的质量评估提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干酪素、蛋白酶(食品级, 市售)。

乙腈(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 无水乙醇、氯化钼、盐酸、氢氧化钠、三氟乙酸、硝酸、氧化镧、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液、磷酸盐缓冲液、氯化钙(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

BSA224S 分析天平(0.1 mg)、PB-10 pH 计(赛多利斯科学仪器北京有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司); Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TSK 凝胶色谱柱(G2000SWXL, 300 mm×7.8 mm, 5 μm, 日本 TOSOH 公司); Welch Ultimate AQ-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 上海月旭科技有限公司); HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中佳科学仪器有限公司); TAS-986 原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 不同水解度 CPP 的制备

称取一定量的干酪素, 调节料液的 pH 至 7.0, 添加一定量的蛋白酶, 于 45 °C 下酶解一定时间后置于沸水浴中灭酶 10 min, 经浓缩、冷冻干燥制备得到 CPP 粉末, 然后根据 CUI 等^[17]的方法测定样品的水解度。酶解工艺中具体的加酶量和酶解时间如表 1 所示。

表 1 CPP 酶解工艺中的加酶量和酶解时间
Table 1 Enzyme dosage and hydrolysis time in the enzymatic hydrolysis process of CPP

水解度/%	加酶量/%	酶解时间/h
4.32	2	1.0
9.22	2	2.0
15.06	3	4.0
19.21	4	4.5
23.68	5	5.0
26.76	6	5.5

1.3.2 CPP 的含量和等电点不溶物的测定

(1) 钼-乙醇法测定 CPP 含量和等电点不溶物

根据 GB 31617—2014《食品安全国家标准 食品营养强化剂 酪蛋白磷酸肽》的钼-乙醇沉淀法测定 CPP 含量和等电点不溶物。

(2)HPLC 测定 CPP 含量

参考杜鹃等^[18]的 HPLC 测定 CPP 的含量(准确度为 96.63%~101.42%; 精密密度为 0.00%~0.02%)。配制样品质量浓度为 1 mg/mL, 并采用 Ultimate 3000 高效液相色谱仪(配备 Welch Ultimate AQ-C₁₈ 柱)进行测定分析。

1.3.3 CPP 相对分子质量分布的测定

配制样品质量浓度为 1 mg/mL, 然后参考丁树慧等^[19]的凝胶过滤色谱法测定 CPP 的相对分子质量分布。色谱条件: 色谱柱为 TSK 凝胶色谱柱; 流动相(A/B)为 45%乙腈+55%水+0.1%三氟乙酸, 等度洗脱; 流速 0.5 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积 20 μL; 检测波长 220 nm。

1.3.4 CPP 持钙能力的测定

参照李建美等^[20]的方法并作适当的修改。取 0.5 mol/L 的氯化钾溶液 1 mL、2.5 mol/L (pH 7.2)的 Tris-HCl 缓冲液 1.0 mL、CPP 系列溶液 1.0 mL(质量浓度分别为 0、1、2、3、4、5 mg/mL)、蒸馏水 1.2 mL、0.1 mol/L 的氯化钙溶液 0.4 mL, 每加一种试剂都要充分摇匀, 置于 37 °C 水浴中, 然后加入预先保温在 37 °C 的 0.1 mol/L (pH 7.2)的磷酸盐缓冲溶液 0.4 mL, 摇匀, 继续在 37 °C 保温。3.5 h 后取出, 迅速放入冰浴, 于 4 °C、6000 r/min 条件下离心 15 min, 取 3 mL 上清液于容量瓶, 加入 3 mL 的 0.1 mol/L 的盐酸, 定容至 10 mL。取 1.0 mL 上述溶液, 加入 1%氧化镧溶液 1.0 mL、硝酸(1:1, V:V) 0.1 mL, 用水稀释至 10 mL, 然后用原子吸收分光光度计测定溶液中钙的含量。CPP 的持钙能力根据公式(1)进行计算。

$$\text{持钙能力}/\% = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (1)$$

其中, C_1 为测定溶液中的 Ca^{2+} 含量, mg/mL; C_2 为加入体系中的 Ca^{2+} 含量, mg/mL。

1.4 数据统计

采用 Excel 软件进行统计分析, 所有实验数据均做 3 次平行实验, 结果以平均值±标准偏差表示, 并采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 水解度对 CPP 含量和等电点不溶物含量的影响

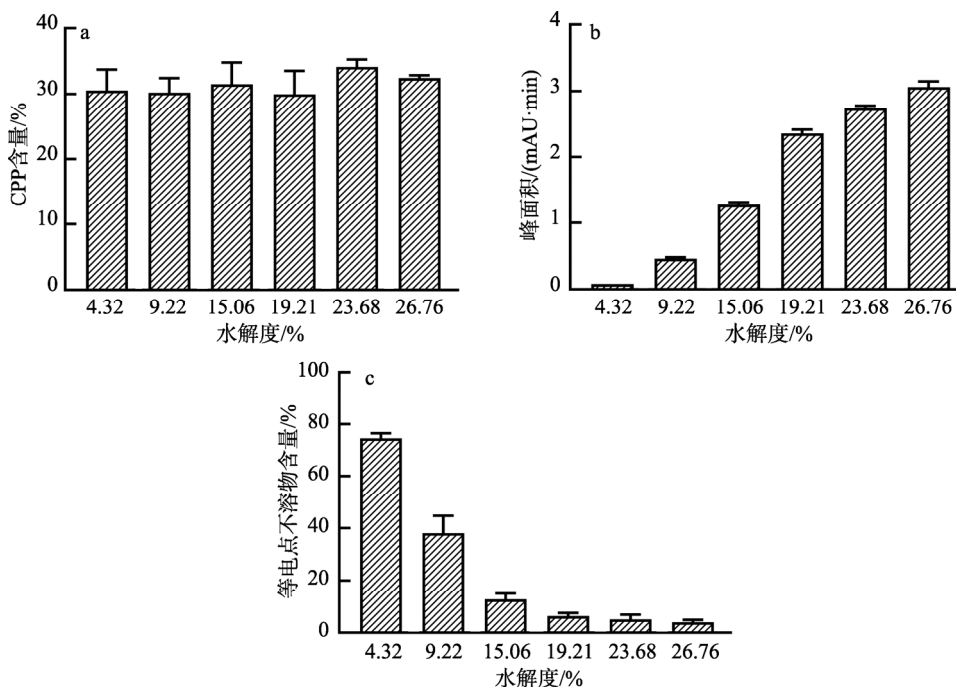
通过 HPLC 和钡-乙醇沉淀法测定了不同水解度 CPP 产品的酪蛋白磷酸肽含量, 结果如图 1 所示。随着水解度的升高, HPLC 中的峰面积随之增大, 即酪蛋白磷酸肽的含量增加, 而用钡-乙醇沉淀法测得的磷酸肽含量均在 30%左右, 无明显变化。这可能是由于 HPLC 是根据磷酸肽所在的峰面积进行定量分析, 目标性和准确性强, 能够真实地反映 CPP 中的磷酸肽的含量。例如, 曾凤泽等^[21]采用 HPLC 测定乳粉及乳制品中酪蛋白磷酸肽的含量,

酪蛋白磷酸肽的质量浓度与其峰面积之间具有良好的线性关系。葛城等^[22]采用 HPLC 测定婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽的含量, 发现在 100~500 μg/mL 范围内线性关系良好。钡-乙醇沉淀法则是通过计算与 Ba^{2+} 络合产生的大分子团形成的沉淀来计算磷酸肽的含量, 无法鉴别出相对分子质量分布不同的 CPP 产品(如水解度较低时得到较多相对分子质量较大的磷酸肽和非磷酸肽), 造成检测结果准确性降低^[23]。例如, 郭斌等^[24]采用钡-乙醇沉淀法测定奶粉中的 CPP 含量, 回收率高达 6436.11%。另外, 由图 1c 可知, 随着水解度的增加, 等电点不溶物也随之减少, 这与 HPLC 测定的峰面积增加趋势相一致。HPLC 虽然测定准确, 但是检测所需的设备昂贵, 而且对操作人员的素质要求较高, 很难适应生产过程中的质量监控和产品测定。因此, 可以通过测定其等电点不溶物的含量来间接评价其产品质量, 从而对 CPP 的研究和生产具有一定意义。

2.2 水解度对 CPP 相对分子质量分布的影响

目前, CPP 相对分子质量分布的检测参照 GB/T 22729—2008《海洋鱼低聚肽粉》中的方法进行, 针对的是相对分子质量分布低于 1000 Da 的低聚肽(水解度较大)。而当水解度较低时, 测定时用流动相溶解后的产品中含有较多的不溶物, 过膜后被去除, 滤液用于进样检测, 所以检测结果不能反映样品中真实的蛋白肽的分子量分布, 需对过膜去除的大分子物质进行准确计量, 以便对测定结果进行校正。经过分析和实验验证, 本研究推荐使用将酸溶蛋白含量对相对分子质量的结果进行校正, 这是由于相对分子质量测定过程中, 溶解样品的流动相溶液的 pH 为 2.11, 因此, 进入凝胶色谱柱测定的部分为酸性条件下的可溶蛋白。GB/T 22492—2008《大豆肽粉》中肽含量的测定方法中, 第一步即为测定酸溶蛋白质含量, 该溶液体系的 pH 为 1.95, 与分子量测定时流动相溶液相近。因此, 以酸溶蛋白质含量与样品总蛋白含量的比值作为校正系数, 校正样品的相对分子质量检测结果。对比表 2 和表 3 的数据可以看出, 通过校正系数校正后, 不同水解度 CPP 的检测数据能够真实反映产品中各分子量区间的所占的比例。因此, 在测定不同水解度 CPP 的相对分子质量时需要进行适当的校正。

据文献^[13]报道, CPP 的功能成分相对分子质量在 1000~3000 Da 之间。由表 3 可知, 水解度在 4.32%~15.06% 时, 分子量在 1000~3000 Da 的含量随着水解度的增加而增加; 在 15.06%~19.21% 时趋于平稳; 当水解度大于 19.21% 时, 分子量在 1000~3000 Da 的含量随着水解度的增加而降低。因此, 在实际生产时选用水解度在 15%左右的 CPP 效果较好。



注: a. 钼-乙醇沉淀法测定的 CPP 含量; b. HPLC 测定的 CPP 的峰面积; c. 等电点不溶物含量。

图 1 不同水解度下的 CPP 的含量和等电点不溶物含量(n=3)

Fig.1 Content and isoelectric point insoluble content of CPP with different degrees of hydrolysis (n=3)

表 2 校正前不同水解度 CPP 的相对分子质量分布

Table 2 Molecular mass distribution of CPP with different degrees of hydrolysis before correction

分子量/Da	水解度/%					
	4.32	9.22	15.06	19.21	23.68	26.76
>10000	30.44±1.02	5.87±0.14	1.01±0.11	0.16±0.05	0.73±0.09	0.57±0.11
5000~10000	34.54±0.82	10.06±0.72	2.16±0.28	1.58±0.26	0.58±0.17	0.34±0.11
3000~5000	13.37±1.00	12.06±0.09	3.49±0.24	3.16±0.15	0.52±0.12	0.25±0.09
1000~3000	14.50±1.98	37.79±2.71	26.20±1.95	22.39±1.41	10.59±1.25	7.04±0.64
500~1000	3.34±0.44	17.12±0.94	28.37±1.54	25.62±2.13	27.44±1.25	24.84±1.00
<500	3.81±0.10	17.10±0.26	38.77±1.57	47.09±1.92	60.14±3.71	66.96±5.27

表 3 校正后不同水解度 CPP 的相对分子质量分布

Table 3 Molecular mass distribution of CPP with different degrees of hydrolysis after correction

分子量/Da	水解度/%					
	4.32	9.22	15.06	19.21	23.68	26.76
>10000	97.75±0.03	72.54±0.04	38.13±0.07	29.06±0.07	21.01±0.07	12.60±0.09
5000~10000	1.12±0.03	2.94±0.21	1.35±0.17	1.12±0.18	0.46±0.14	0.30±0.09
3000~5000	0.43±0.03	3.52±0.02	2.18±0.15	2.25±0.10	0.41±0.09	0.22±0.08
1000~3000	0.47±0.05	11.03±0.82	16.37±1.51	15.92±1.04	8.43±0.97	6.19±0.56
500~1000	0.11±0.01	5.00±0.27	17.73±0.96	18.20±1.52	21.84±0.99	21.83±0.88
<500	0.12±0.01	4.99±0.08	24.23±0.98	33.46±1.36	47.86±2.95	58.86±4.63

2.3 水解度对 CPP 持钙能力的影响

LUO 等^[25]通过体外表征和分子动力学模拟相结合的方法发现, 钙与 CPP 的结合位点主要位于 Glu-2 的羰基和磷酸化的 Ser-15、Ser-18 和 Ser-18 的磷酸基处, 同时还发现疏水相互作用是钙离子结合的主要驱动力。酪蛋白磷酸肽促钙吸收的活性不仅受丝氨酸上磷酸基、氨基酸组成以及分子结构的影响^[26-27], 而且两者的比值对钙的吸收也有相当大的影响。例如, TSUCHITA 等^[28]的研究表明, CPP 对钙的吸收依赖于小肠内 CPP 和钙的相对数量, 当二者质量比为 0.37 时对提高矿物元素运输是最有效的。类似地, 与对照组相比, 当大鼠饲料中二者比例为 0.2 时, 小肠中钙的表观吸收率、储留率和可溶性钙含量均显著提高^[29]。因此, 本研究探究了在不同水解度和不同添加量下的 CPP 的持钙能力, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 在 0~0.4 mg/mL 时, 不同水解度 CPP 的持钙能力逐渐增加, 但增加不明显, 此后随着添加量的增加, 持钙能力明显增加, 当 CPP 质量浓度为 0.6 和 0.8 mg/mL 时, 水解度在 4.32%~26.76% 的 CPP 的持钙能力分别为(40.23±1.27)%、(52.24±0.03)%、(43.56±1.38)%、(25.63±0.35)%、(18.43±2.84)%、(24.16±1.72)%和(59.96±3.93)%、(63.36±3.50)%、(65.99±0.22)%、(48.15±2.30)%、(29.86±1.09)%、(39.66±2.08)%。结果表明, 当 CPP 的质量浓度为 0.8 mg/mL 时(此时 CPP 与钙的比值为 2.5), 钙的结合率达到最大, 这和孟妍等^[30]的研究结果相一致。当 CPP 的质量浓度为 0.6~0.8 mg/mL 时, 水解度为 9.22%和 15.06% 的 CPP 的持钙能力优于其他水解度的 CPP。

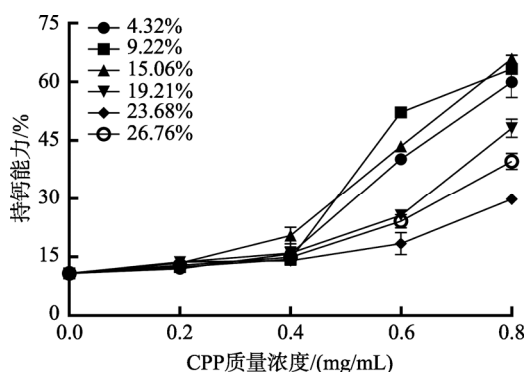


图 2 不同水解度 CPP 的持钙能力(n=3)

Fig.2 Calcium holding capacities of CPP with different degrees of hydrolysis (n=3)

3 结论与讨论

本研究探究了水解度对 CPP 含量、等电点不溶物含量、相对分子量分布和持钙能力的影响, 主要结论如下:

(1)随着水解度的增加, HPLC 测定的磷酸肽的峰面积

随之增加, 等电点不溶物含量也随之增加, 而采用钡-乙醇沉淀法测定的酪蛋白磷酸肽含量均在 30%左右, 可将等电点不溶物含量作为评价产品质量的一个指标。

(2)目前常用标准 GB/T 22729—2008 中 CPP 相对分子量分布的检测方法对水解度较低的 CPP 样品误差较大, 经分析验证后得出, 通过将样品中的酸溶蛋白含量作为校正系数校正后, 不同水解度 CPP 的检测数据能够真实反映产品中各分子量区间的分布。

(3)当 CPP 的质量浓度为 0~0.8 mg/mL 时, 在 4.32%~15.06%范围内, CPP 的持钙能力随水解度的增加而增强; 水解度大于 15.06%后, 其持钙能力随水解度的增加有减弱趋势, 水解度为 9.22%和 15.06%时的 CPP 持钙能力优于其他水解度的 CPP。

参考文献

- [1] PENG Z, HOU H, ZHANG K, *et al.* Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats [J]. Food Chem, 2017, 221: 373-378.
- [2] SLAM MN, VARANI J. The western-style diet, calcium deficiency and chronic disease [J]. J Nutr Food Sci, 2016, 6(3): 1000496.
- [3] ZHANG W, STOECKLIN E, EGGERSDORFER M. A glimpse of vitamin D status in Mainland of China [J]. Nutrition, 2013, 29(7-8): 953-957.
- [4] HUNG KC, HSU SH. Polymer surface interacts with calcium in aqueous media to induce stem cell assembly [J]. Adv Health Mater, 2015, 4(15): 2186-2194.
- [5] MUSCARIELLO R, RENDINA D, GIANNETTINO R, *et al.* Calcium daily intake and the efficacy of a training intervention on optimizing calcium supplementation therapy: A clinical audit [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2021, 31(1): 354-360.
- [6] NAQVI MA, SINGH J, HAN E, *et al.* Purification and identification of β -casein phosphopeptide (1-25) [J]. J Dairy Sci, 2016, 99(10): 7803-7808.
- [7] PRAKASH D, LAKSHMI AJ. Preparation of casein phosphopeptides and assessing their efficacy in enhancing the bioaccessibility of iron and zinc [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(11): 7493-7499.
- [8] PEREGO S, ZABEO A, MARASCO E, *et al.* Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel [J]. J Funct Foods, 2013, 5(2): 847-857.
- [9] LIU G, SUN SW, GUO BY, *et al.* Bioactive peptide isolated from casein phosphopeptides promotes calcium uptake *in vitro* and *in vivo* [J]. Food Funct, 2018, 9(4): 2251-2260.
- [10] LIU G, SUN SW, GUO BY. Promoting the calcium-uptake bioactivity of casein phosphopeptides *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Nutr, 2021, 8: 743791.
- [11] 孙圣伟. 酪蛋白磷酸肽体内活性对比及其促钙吸收机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
SUN SW. Study on activity comparison of casein phosphopeptides *in vivo* and *in vitro* and mechanism of calcium absorption [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- [12] 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, 125.
- GUO BY, LIU G, LIANG CW, *et al.* Calcium-binding ability and physicochemical properties of two casein phosphopeptide products [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(9): 96–100, 125.
- [13] CAO Y, MIAO JY, GUO L, *et al.* Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(11): 2307–2314.
- [14] SMIALOWSKA A, MATIA-MERINO L, CARR AJ. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(4): 2553–2563.
- [15] 姜春秀, 全威, 陈洁, 等. 不同酪蛋白磷酸肽产品理化性质与持钙能力的相关性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 292–299.
- JIANG CX, QUAN W, CHEN J, *et al.* Correlation analysis between properties and calcium-holding capacity of different casein phosphopeptide products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(18): 292–299.
- [16] 徐曼. 酪蛋白磷酸肽的制备及其持钙能力的研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2011.
- XU M. Preparation of casein phosphopeptides and studies on its calcium-holding ability [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2011.
- [17] CUI Q, SUN YX, CHENG J, *et al.* Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate [J]. *Food Chem*, 2022, 366: 130711.
- [18] 杜鹃, 王倩倩, 闫永刚, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中酪蛋白磷酸肽含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1161–1167.
- DU J, WANG QQ, YAN YG, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(5): 1161–1167.
- [19] 丁树慧, 齐曼婷, 齐斌, 等. 低值海洋鱼低聚肽抗氧化和抗疲劳活性[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 163–169.
- DING SH, QI MT, QI B, *et al.* Antioxidant and anti-fatigue activity of marine trash fish-derived oligopeptide [J]. *Food Sci*, 2019, 40(1): 163–169.
- [20] 李建美, 孙琦, 潘健存, 等. 两种酪蛋白磷酸肽产品的理化性质和持钙能力的比较[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(3): 7–10.
- LI JM, SUN Q, PAN JC, *et al.* Study on the comparative analysis of physicochemical properties and the calcium binding capacities between two casein phosphopeptide (CPP) products [J]. *China Dairy Ind*, 2014, 42(3): 7–10.
- [21] 曾凤泽, 姚宇泽. HPLC 法测定乳粉及乳制品中酪蛋白磷酸肽含量[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 295–298.
- ZENG FZ, YAO YZ. Determination of casein phosphopeptide in milk and milk products by HPLC [J]. *Food Ind*, 2020, 41(10): 295–298.
- [22] 葛城, 张浩, 黄缘, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 832–838.
- GE C, ZHANG H, HUANG Y, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in infant formulate milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 832–838.
- [23] 邵琪, 魏丽娜, 张东丽, 等. 酪蛋白磷酸肽检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 220–224.
- SHAO Q, WEI LN, ZHANG DL, *et al.* Research progress of the detection methods on casein phosphopeptides [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(3): 220–224.
- [24] 郭斌, 刘飞, 李双祁, 等. 高效液相色谱法测定奶粉中酪蛋白磷酸肽的含量[J]. 食品工业, 2018, 39(2): 305–310.
- GUO B, LIU F, LI SQ, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2018, 39(2): 305–310.
- [25] LUO MN, XIAO J, SUN SW, *et al.* Deciphering calcium-binding behaviors of casein phosphopeptides by experimental approaches and molecular simulation [J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 5284–5292.
- [26] SUN N, WANG Y, BAO Z, *et al.* Calcium binding to herring egg phosphopeptides: Binding characteristics, conformational structure and inter-molecular forces [J]. *Food Chem*, 2020, 310: 125867.
- [27] ZONG HL, PENG S, ZHANG Y, *et al.* Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides [J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235: 811–816.
- [28] TSUCHITA H, GOTO T, SHIMIZU T, *et al.* Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats [J]. *J Nutr*, 1996, 126(1): 86–93.
- [29] SAITO Y, LEE YS, KIMURA S. Minimum effective dose of casein phosphopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats [J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 1998, 68(5): 335–340.
- [30] 孟妍, 李荔, 高远, 等. 酪蛋白磷酸肽促进钙吸收效果的研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(4): 489–491.
- MENG Y, LI L, GAO Y, *et al.* Study on the effect of casein phosphopeptide in promoting calcium absorption [J]. *J Hyg Res*, 2009, 38(4): 489–491.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



王倩倩, 博士, 主要研究方向为生物活性肽的功能评价及机理研究。

E-mail: w5982234537@163.com



冯凤琴, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品添加剂。

E-mail: feng_fengqin@hotmail.com