

蚕蛹多肽螯合钙的制备工艺优化及结构表征

Preparation and structural characterization of silkworm pupa peptides chelated calcium

赵梓月^{1,2,3}王思远^{1,2,3}廖森泰^{1,2,3}穆利霞^{1,2,3}邹宇晓^{1,2,3}ZHAO Zi-yue^{1,2,3} WANG Si-yuan^{1,2,3} LIAO Sen-tai^{1,2,3} MU Li-xia^{1,2,3} ZOU Yu-xiao^{1,2,3}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610; 2. 广东省农产品加工重点

实验室, 广东 广州 510610; 3. 农业农村部功能食品重点实验室, 广东 广州 510610)

(1. *Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510610, China*; 2. *Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou, Guangdong 510610, China*; 3. *Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou, Guangdong 510610, China*)

摘要:利用蚕蛹多肽为原料制备多肽螯合钙,以可溶性钙含量为主要指标,综合考察螯合率和得率,研究了螯合pH、温度、时间以及肽钙比等单因素的影响,并进一步通过响应面优化法对制备工艺进行优化,确定最优的反应条件为反应时间 80 min、反应温度 73 ℃、pH 10、肽钙质量比 3.4 : 1.0,该条件下蚕蛹多肽螯合钙的含钙量为 14.51%。傅利叶红外光谱分析表明蚕蛹多肽主要通过羧基、胺基和磷酸基团与钙离子结合。

关键词:蚕蛹多肽;螯合反应;补钙制剂;结构表征

Abstract: Preparation of peptides chelated calcium from silkworm pupa peptides, taking the soluble calcium content as the main index, and considering the chelation and yield rate, the effects of reaction pH, temperature, time, and peptide-calcium ratio were examined. On the basis of single factor experiment, Box-Behnken central composite design was utilized, and the optimal conditions were as followed: reaction time 80 min, reaction temperature 73 ℃, pH 10, peptide calcium ratio 3.4 : 1.0. Under this condition, the soluble calcium content of the silkworm pupa peptide chelated calcium was 14.51%. Through the UV absorption and

infrared spectroscopy and SEM analysis, it showed that the silkworm pupa peptides and calcium ions chelation occurred, and the phosphate group, carboxyl group and amino group participated in the reaction.

Keywords: silkworm pupa peptides; chelation reaction; calcium supplement; structure characterization

目前市场上的补钙产品大多为碳酸钙、葡萄糖酸钙和乳酸钙等离子钙,这些离子钙溶解性较差,吸收时需消耗大量胃酸,吸收率和生物利用率低,在肠道中易形成钙沉淀^[1]。氨基酸及多肽能与钙离子形成可溶性螯合物,完整地转运吸收,螯合钙作为第三代补钙制剂,具有稳定性好、生物利用率高、抗干扰性强的优点,如酪蛋白磷酸肽,是目前为止发现的最具促钙吸收作用的短肽,作为钙强化剂被广泛应用于婴幼儿食品及其他补钙类功能食品当中,此外市场上还有卵黄高磷蛋白磷酸肽螯合钙和复方氨基酸螯合钙等,但产品种类还较单一,价格较高。近年来,国内外学者已从多种食品蛋白中制备出金属螯合肽,如大豆^[2]、南极磷虾^[3]、太平洋鲑鱼^[4]等,并发现这些肽类在改善钙等二价矿物元素生物利用度方面具有极大的潜力,同时有研究^[2]表明肽钙结合能力与多肽中羧基含量呈线性相关,其结合位点可能是 Glu、Asp 上的羧基。因此,寻找高效、低成本的多肽材料来开发多肽螯合钙制剂具有十分重要的意义。同时,目前关于肽钙结合机制的研究主要集中在磷酸基团—钙、羧基—钙两种模式^[5],也有研究^[6]发现还有其他多种基团在肽钙反应中发生了变化,但上述研究均未涉及多肽中活性基团与钙结合的先后顺序,还有待进一步深入探讨。

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-18);广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:2016LM1087);广州市科技计划项目(编号:201804010095)

作者简介:赵梓月,女,华南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:王思远(1987—),女,广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所助理研究员,硕士。

E-mail:284990289@qq.com

廖森泰(1962—),男,广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所研究员,硕士。E-mail:liaoost@126.com

收稿日期:2019-02-04

中国种桑养蚕历史悠久,传统养蚕业以茧丝为主产品,蚕蛹作为副产物产量很大。据统计,中国每年可产鲜茧 60 余万 t,蚕蛹产量可达 40 余万 t^[7],缫丝后的蚕蛹大多废弃或加工为饲料,利用率和经济效益较低。蚕蛹中蛋白质含量约为 12%~16%,具有良好的氨基酸配比,且 Asp 和 Glu 含量最高,分别可达总氨基酸的 10%和 14%左右^[8],可提供丰富的肽—钙结合位点,是制备肽螯合钙的优质原料,但目前尚无蚕蛹多肽螯合钙的相关研究报道。笔者^[9]前期建立了蚕蛹多肽制备工艺,并发现其具有良好的与钙结合能力。试验以蚕蛹为原料制备肽螯合钙,利用响应面优化法确定其最佳工艺条件,并跟踪螯合反应中多肽随钙源添加的结构变化规律,探索钙与多肽的结合机理,以期挖掘出一种高含钙量的多肽螯合钙原料,为新型高效的补钙制剂研制和蚕桑资源综合开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜削丝蚕蛹:两广 2 号,韶关翁源县真诚意蚕桑专业合作社;

Alcalase 酶(4.3×10^6 U/mg)、胃蛋白酶(3.0×10^5 U/mg)、胰蛋白酶(4.3×10^6 U/mg)、复合蛋白酶(2.3×10^6 U/mg);诺维信(中国)生物技术有限公司;

石油醚、硫化钠、柠檬酸钠、氢氧化钾、氯化钙、无水乙醇、盐酸:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

氢氧化钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA):分析纯,福晨(天津)化学试剂有限公司;

络黑 T:分析纯,天津市天新精细化工开发中心。

1.1.2 主要仪器设备

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

高速冷冻离心机:CR22G III 型,广东广州日立工机有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9245A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

真空冷冻干燥机:ST85Best 型,美国 Millrock 公司;

紫外分光光度计:UV-1800 型,日本岛津公司;

傅立叶红外光谱测定仪:VERTEX 70 型,德国 Bruker 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 蚕蛹多肽螯合钙的制备

蚕蛹→漂烫(2 min)→烘干(60 ℃)→粉碎、过筛(40 目)→石油醚脱脂(3 倍体积的石油醚浸泡蚕蛹粉,于常温振荡 4 h,抽滤除去溶剂,重复 3 次)→酶解(调配质量分数 20%的蚕蛹粉溶液,加入质量分数 0.2%的

Alcalase 酶,55 ℃酶解 4 h)→灭酶(沸水浴 5 min)→离心(4 000 r/min 离心 15 min)取上清液→钙螯合→醇沉(加入 4 倍体积 95%乙醇进行沉淀)→离心(4 000 r/min 离心 15 min)取沉淀→冷冻干燥→蚕蛹多肽螯合钙

1.2.2 蚕蛹多肽螯合钙含量、得率及螯合率的测定

(1) 钙含量测定:参照 GB/T 5009.92—2016 中的 EDTA 滴定法。

(2) 蚕蛹多肽螯合钙得率:按式(1)计算。

$$Y = \frac{m_1}{m_2 + m_3} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——得率,%;

m_1 ——蚕蛹多肽螯合钙质量,g;

m_2 ——蚕蛹多肽质量,g;

m_3 ——氯化钙质量,g。

(3) 蚕蛹多肽螯合钙螯合率:按式(2)计算。

$$C = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

C——螯合率,%;

m_1 ——螯合态钙元素含量,g;

m_2 ——反应体系中钙元素含量,g。

1.2.3 单因素试验设计

(1) 蛋白酶的影响:选取 4 种蛋白酶(Alcalase 酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、胃蛋白酶)对蚕蛹蛋白进行酶解,酶解后的蚕蛹多肽在 pH 8、反应温度 60 ℃、反应时间 60 min、肽钙质量比 1:1 的条件下进行反应,以钙含量为主要指标确定出最佳蛋白酶。

(2) pH 的影响:选取 Alcalase 酶酶解蚕蛹蛋白,在反应温度 60 ℃、反应时间 60 min、肽钙质量比 1:1 条件下,分别选取 pH 4,6,8,10,12 进行反应,以钙含量为主要指标确定出最佳 pH。

(3) 反应温度的影响:选取 Alcalase 酶酶解蚕蛹蛋白,在 pH 10、反应时间 60 min、肽钙质量比 1:1 条件下,分别选取反应温度 30,45,60,75,90 ℃进行反应,以钙含量为主要指标确定出最佳反应温度。

(4) 反应时间的影响:选取 Alcalase 酶酶解蚕蛹蛋白,在 pH 10、反应温度 75 ℃、肽钙质量比 1:1 条件下,分别选取反应时间 20,40,60,80,100 min 进行反应,以钙含量为主要指标确定出最佳反应时间。

(5) 肽钙质量比的影响:选取 Alcalase 酶酶解蚕蛹蛋白,在 pH 10、反应温度 75 ℃、反应时间 80 min 条件下,分别选取肽钙质量比 10:1,4:1,2:1,1:1,1:2 进行反应,以钙含量为主要指标确定出最佳肽钙质量比。

1.2.4 响应面试验分析 在单因素试验确定的适宜反应条件基础上,按照 Box-Behnken 中心组合设计原理进一

步优化反应条件。

1.2.5 蚕蛹多肽螯合钙紫外光谱分析 配制浓度为 2 mg/mL 的蚕蛹多肽和蚕蛹多肽螯合钙样品,在 200~400 nm 的波长范围内进行紫外扫描。

1.2.6 蚕蛹多肽螯合钙红外光谱分析 分别取蚕蛹多肽和肽钙质量比为 30:1,20:1,10:1,5:1 的蚕蛹多肽螯合钙 1 mg 与 100 mg 干燥的 KBr 混合、研磨、压片,在 4 000~400 cm^{-1} 的范围内利用傅里叶红外光谱仪扫描出红外光谱图。

1.2.7 蚕蛹多肽螯合钙扫描电镜分析 取一定量蚕蛹多肽短肽、蚕蛹多肽螯合钙冻干粉样品抖落至样盘双面胶上,经喷金镀膜处理后放入扫描电镜抽真空,施加一定电压后,在 1 000 倍数下获取扫描图像。电镜扫描条件设定为高压 5.00 kV;束流 6.9×10^{-2} mA;工作距离 8.5 mm。

1.2.8 数据分析 试验应用 Design-expert V8.0.6 软件进行响应面设计,应用 Origin 9.0 软件进行紫外光谱图和红外光谱图绘制,采用 Excel 软件绘制图表,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,所有试验重复 3 次及以上,结果用(平均值 $\pm$ 标准误差)表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 蛋白酶对蚕蛹多肽螯合钙相关指标的影响 利用不同蛋白酶对蚕蛹蛋白进行酶解制备蚕蛹多肽,发现经 Alcalase 酶酶解的蚕蛹多肽与钙结合后制备出的多肽螯合钙中钙含量最高。这可能是由于不同蛋白酶的酶切位点不同导致,Adamson 等^[10]曾研究出 Alcalase 酶的酶切位点为 Glu、Met、Leu、Tyr、Lys 和 Gln 羧基侧的肽键,使得多肽上的羧基暴露出来,提供较多的与钙结合位点。

2.1.2 pH 对蚕蛹多肽螯合钙相关指标的影响 由图 2 可得,蚕蛹多肽螯合钙钙含量受 pH 影响较大。当 pH 较低时,溶液中的 H^+ 含量较高, H^+ 与 Ca^{2+} 争夺供电子基

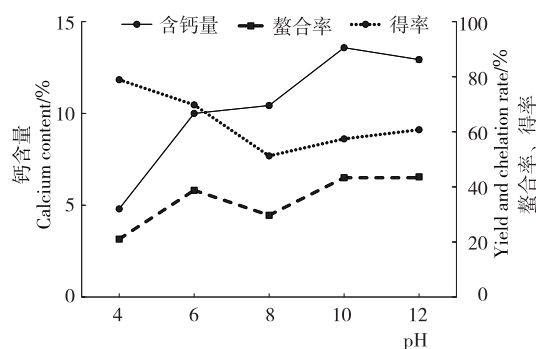


图 2 pH 值对钙含量、螯合率、得率的影响

Figure 2 Effect of pH on calcium content, yield and chelation rate

团 $-\text{COO}-$,使多肽螯合钙的量较少;当 pH 达到 10 时, OH^- 较多,使得 $-\text{COOH}$ 的 H^+ 电离出来,有利于与钙离子的结合;若 pH 继续增大,过量的 OH^- 会与 Ca^{2+} 结合生成氢氧化钙沉淀,从而使蚕蛹多肽螯合钙量下降。因此,在响应面设计时,将 pH 因素的中心试验点选在 pH 10。

2.1.3 反应温度对蚕蛹多肽螯合钙相关指标的影响 由图 3 可以看出,反应温度从 30 $^{\circ}\text{C}$ 升高至 90 $^{\circ}\text{C}$ 过程中,蚕蛹多肽螯合钙的钙含量呈现先上升后平稳的趋势,在 75 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大值。反应温度越高,分子间运动越剧烈,使得分子间碰撞的几率增大,有利于发生结合反应,当碰撞几率达到一定程度,蚕蛹多肽与钙结合反应达到最大。温度继续升高时,结合率反而下降,可能是高温破坏了多肽分子的结构,其构象发生变化影响了与钙的结合。因此,在响应面设计时将温度因素的中心试验点选在 75 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.4 反应时间对蚕蛹多肽螯合钙相关指标的影响 由图 4 可知,从反应 20 min 延长至反应 100 min,蚕蛹肽螯合钙中钙含量变化较小,但在 80 min 时,螯合率和得率均达到最大值,因此选择 80 min 作为蚕蛹肽螯合钙的反应时间,响应面试验中不再研究反应时间对蚕蛹多肽与钙离子结合反应的影响。

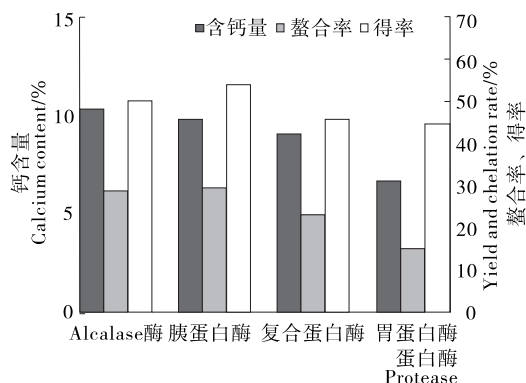


图 1 蛋白酶对钙含量、螯合率、得率的影响

Figure 1 Effect of protease on calcium content, yield and chelation rate

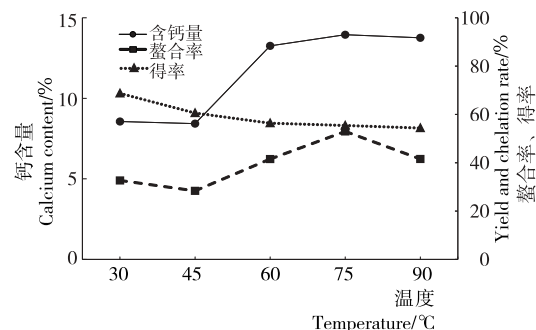


图 3 温度对钙含量、螯合率、得率的影响

Figure 3 Effect of temperature on calcium content, yield and chelation rate

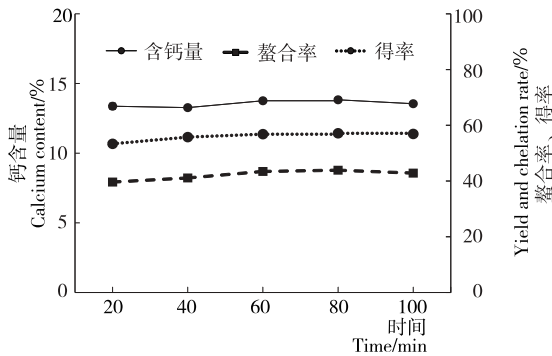


图4 反应时间对钙含量、螯合率、得率的影响
Figure 4 Effect of time on calcium content, yield and chelation rate

2.1.5 肽钙质量比对蚕蛹多肽螯合钙相关指标的影响

由图5可见,肽钙质量比对蚕蛹多肽螯合钙中的钙含量有较大影响,随着肽钙质量比的增加,钙含量呈先上升后下降的趋势,在肽钙质量比为4:1时钙含量、得率达到最大值。若肽钙质量比过大,则氯化钙添加不足,结合反应不完全,造成效率较低;若肽钙质量比过小,则氯化钙添加过量,多肽上的钙结合位点已饱和,造成钙浪费。因此,在响应面设计时将肽钙质量比因素的中心试验点选在4:1。

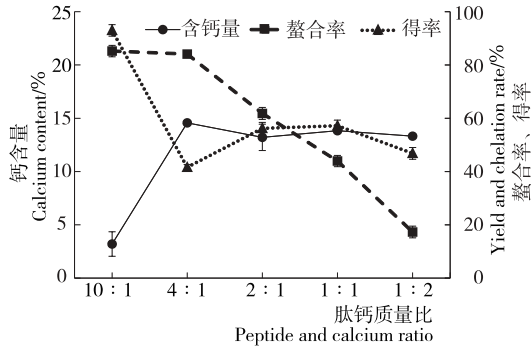


图5 肽钙质量比对钙含量、螯合率、得率的影响
Figure 5 Effect of peptide calcium ratio on calcium content, yield and chelation rate

2.2 响应面试验设计结果及分析

根据单因素试验结果,按照 Box-Behnken 中心组合设计原理对蚕蛹多肽螯合钙制备条件进一步优化,以 pH 10、温度 75 ℃、肽钙质量比 4:1 为零点进行响应面设计。响应面编码设计见表1。

2.2.1 响应面试验方案及结果 根据响应面设计确定响应面试验方案如表2所示。选用 Box-Behnken 模型对 pH、温度、肽钙质量比3个因素结果进行多元线性回归拟合,得到3个因素关于钙含量的二次多项回归方程模型为:

$$R = 14.48 + 0.13A - 1.14B - 0.80C - 1.33AB - 1.36AC + 1.15BC - 3.67A^2 - 3.36B^2 - 2.12C^2. \quad (3)$$

表1 中心组合实验因素水平编码表

Table 1 Center combination of experimental factors level coding table

水平	A pH	B 温度/℃	C 肽钙质量比
-1	9	65	6:1
1	10	75	4:1
0	11	85	2:1

表2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Response surface analysis scheme and test results

序号	A	B	C	钙含量/%
1	-1	0	-1	7.60
2	-1	-1	0	7.56
3	0	-1	-1	12.07
4	1	-1	0	9.50
5	0	0	0	14.85
6	0	0	0	15.21
7	0	0	0	14.37
8	1	1	0	4.69
9	0	1	1	8.24
10	0	0	0	12.94
11	0	1	-1	7.36
12	0	-1	1	8.35
13	-1	1	0	8.05
14	-1	0	1	8.55
15	1	0	-1	11.55
16	0	0	0	15.02
17	1	0	1	7.06

2.2.2 响应面回归模型方差分析 进一步对响应面回归模型方差进行分析见表3。由表3可知,模型F值为25.14,P值<0.0002,差异显著,说明此模型对钙含量有显著影响,回归方程中失拟项检验不显著(P=0.5606),该模型能较好地拟合试验所选因素对钙含量的影响。回归方程决定系数 $R^2=0.9700$,修正决定系数 $R_{adj}^2=0.9314$,两者相近,说明模型与实际试验拟合性良好。B差异极显著,C差异显著,AB、AC、BC交互作用均显著,二次差异均极显著。

在设定的因素水平内对回归方程进行数学运算,得出的反应最佳条件为 pH 10.12、温度 72.57 ℃、肽钙质量比为 3.41:1,钙含量最高理论值为 14.7405%。为方便试验进行,调整反应条件为 pH 10、温度 73 ℃、肽钙质量比 3.4:1,在此条件下进行3次实验验证,得到的蚕蛹多肽螯合钙中平均钙含量为 14.51%,与预测值接近。

蚕蛹是蚕茧抽丝后剩下的主要副产物,本研究开发的蚕蛹多肽螯合钙中钙含量为 14.51%,与已报道的多种肽螯合钙如羊骨胶原多肽螯合钙^[11]、大豆肽螯合钙^[12]、豆粕多肽螯合钙相比^[13],钙含量显著提高,具有较高的研究和生产价值。

2.3 紫外光谱分析

如图 7 所示,通过蚕蛹多肽以及蚕蛹多肽螯合钙进行紫外光谱扫描对比,发现蚕蛹多肽与钙结合后,在 280~300 nm 的最大吸收峰值发生红移,由 288 nm 移动至 290 nm,且吸光度发生变化,表明有金属螯合物生成,与多肽螯合物的相关报道^[14-15]一致。

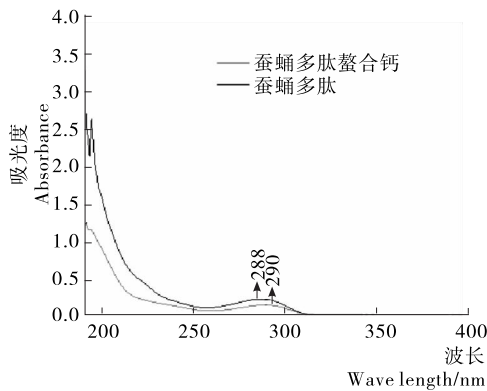


图 7 紫外光谱图

Figure 7 Ultraviolet spectrum

2.4 红外光谱分析

蚕蛹多肽分子中含有羧基、羟基、氨基等基团,为进一步确定参与钙结合的基团和先后顺序,试验研究了不同肽钙比制备出的蚕蛹多肽螯合钙的红外光谱特征,如图 8 所示,随着钙源的增加,蚕蛹肽螯合钙红外结构有显著差异。蚕蛹多肽与钙反应后,在 3 278.55, 2 102.46, 1 450.55, 1 398.83, 923.24 cm^{-1} 5 个吸收峰发生了明显的变化。其中 3 278.55 cm^{-1} 附近为 N—H 伸缩振动特征区,多肽螯合钙变为 3 379.73 cm^{-1} ,可能是由于 NH_2 与 Ca^{2+} 配位引起 NH 拉伸和氢键被取代,随着钙含量的提高,该峰强度不断增强,说明氨基在不断与 Ca^{2+} 配位。2 102.46 cm^{-1} 是亚磷酸基团缔结氢键形成的吸收峰,此峰在添加钙量很小的情况下便消失,是由于蚕蛹多肽与钙结合后亚磷酸基团缔结的氢键被 Ca^{2+} 取代^[16],推测亚磷酸基团优先参与肽钙反应。添加 Ca^{2+} 后,对应于 C—O 的波数从 1 655.00 cm^{-1} 发生了蓝移,随着 Ca^{2+} 的增加,当肽钙质量比达到 5 : 1 时,在这附近生成一个新的吸收峰即 1 598.80 cm^{-1} 处,主要是由于钙含量增大使得羧酸与钙反应生成羧酸盐。在 1 398.83 cm^{-1} 处观察到的吸收峰发生了红移,归因于—COO—羧酸酯基团的延

伸与 Ca^{2+} 结合形成 $\text{COOCa}^{[17]}$ 。羧基中—OH 的面内振动吸收峰 1 450.55 cm^{-1} 及面外振动吸收峰 923.24 cm^{-1} 与钙结合后消失,说明羧基中—OH 参与肽钙结合^[18]。因此,氨基、羧基、磷酸基团参与了蚕蛹多肽与钙的结合,其结合模式推测如图 9 所示。

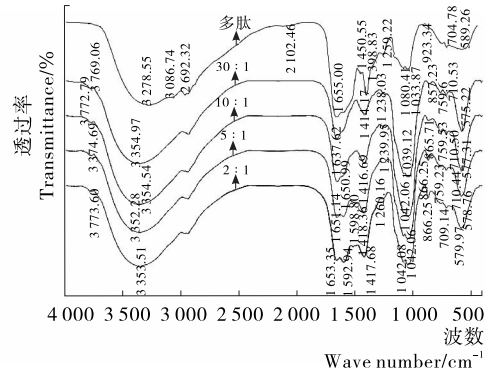


图 8 不同肽钙比制备的蚕蛹多肽螯合钙红外光谱图

Figure 8 Infrared spectrum of chelated calcium of silkworm pupapolypeptide prepared by different peptide to calcium ratio

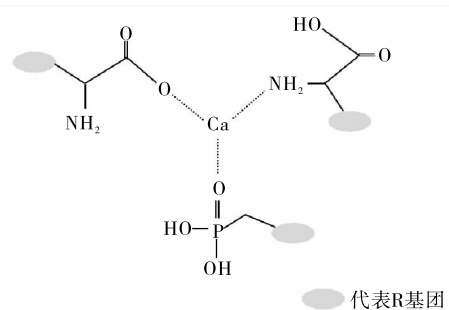
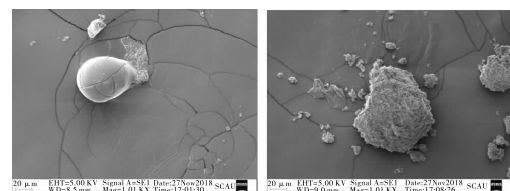


图 9 肽钙结合模式

Figure 9 Peptide calcium binding mode

2.5 扫描电镜分析

由图 10 可看出,蚕蛹多肽表面光滑,结构紧实;反应后,蚕蛹多肽螯合钙表面变为疏松多孔结构,有利于溶解吸收。



(a) 蚕蛹多肽

(b) 蚕蛹多肽螯合钙

图 10 蚕蛹多肽与蚕蛹多肽螯合钙扫描电镜图片

Figure 10 Silkworm pupa protein peptides and silkworm pupa protein peptides binding calcium SEM pictures

3 结论

以蚕蛹为原料制备了蚕蛹多肽螯合钙,通过响应面优化法确定了制备的最优条件为 pH 10、反应温度 73 ℃、肽钙质量比 3.4:1、反应时间 80 min,在此条件下,得到的蚕蛹肽螯合钙中钙含量可达到 14.51%,具有较高的研究和生产价值。通过紫外光谱、红外光谱、扫描电镜分析可知,蚕蛹多肽与钙结合后结构发生了变化,多肽中氨基、羧基、磷酸基团参与肽钙结合反应。同时探究了多肽随钙源添加的结构变化规律,发现磷酸基团极易参与肽钙螯合反应。虽然蚕蛹本身具有产量大、氨基酸配比良好等优势,开发出的蚕蛹多肽螯合钙钙含量高,成本较低,但其生物利用率及安全性还有待通过细胞试验和动物试验进一步研究。

参考文献

- [1] SUZUKI Y, LANDOWSKI C P, HEDIGER M A. Mechanisms and regulation of epithelial Ca^{2+} absorption in health and disease[J]. Annual Review of Physiology, 2008, 70(1): 257-271.
- [2] BAO X L, LV Y, YANG B C, et al. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): C117-C121.
- [3] HOU Hu, WANG Shi-kai, ZHU Xiao, et al. A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 389-395.
- [4] PENG Zhe, HOU Hu, ZHANG Kai, et al. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 373-378.
- [5] 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.
- [6] ZHAO Ning-ning, HU Jun, HOU Tao, et al. Effects of de-

salted duck egg white peptides and their products on calcium absorption in rats[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 8: 234-242.

- [7] 廖森泰, 肖更生, 施英. 蚕桑资源高效综合利用的新内涵和新思路[J]. 蚕业科学, 2009, 35(4): 913-916.
- [8] 张燕, 陈业高, 海丽娜, 等. 蚕蛹氨基酸成分及其营养价值[J]. 云南化工, 2002, 29(6): 22-23.
- [9] 穆利霞, 鲁珍, 廖森泰, 等. 膜超滤对蚕蛹蛋白酶解液风味的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 108-112.
- [10] ADAMSON N J, REYNOLDSE C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity[J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 19(3): 202-207.
- [11] 申勇涛, 原恺, 霍乃蕊, 等. 高钙含量肽钙螯合物的制备与表征分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2018, 38(5): 50-56.
- [12] 崔宇, 王小林, 孔祥珍, 等. 大豆肽螯合钙能力影响因素的研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(2): 70-74.
- [13] 谢焯州, 曹志华, 吴艾纯, 等. 酶解豆粕制备多肽钙螯合物及其抗氧化性[J]. 江西化工, 2017(2): 61-66.
- [14] 陈新峰, 张治国, 王君虹, 等. 响应面法优化微波固相合成毛虾肽螯合钙工艺[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(8): 1473-1478.
- [15] 郭耀华. 酶解一发酵鲢鱼副产物制备多肽螯合钙工艺优化及螯合机理研究[D]. 天津: 天津农学院, 2016: 48-49.
- [16] 黄海. 鲤鱼卵钙离子结合活性肽的制备及钙结合机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 66-67.
- [17] WANG Xu, GAO Ang, CHEN Yue, et al. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 487-494.
- [18] ZHANG Kai, LI Jiang-wei, HOU Hu, et al. Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from Pacific cod (*Gadus Macrocephalus*) bone: Molecular properties and calcium chelating modes[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 670-679.

(上接第 19 页)

- [20] 杨小慧. 白酒窖池中益生性乳酸菌的分离筛选及其胞外多糖生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018: 13.
- [21] 雷霞. 伊敏河和海拉尔河两岸牧区乳及乳制品中益生乳酸菌的分离鉴定及其体外筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005: 15.
- [22] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 36.
- [23] SOLIERI L, BIANCHI A, MOTTOLESE G, et al. Tailor-

ing the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis[J]. Food Microbiology, 2014, 38(4): 240-249.

- [24] 迪娜热尔·迪力达西, 刘璐, 加勒哈斯别克·塞力克, 等. 新疆传统发酵乳品中乳酸菌与酵母菌的益生特性[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(1): 5-9, 13.
- [25] 邹婷婷. 具有潜在益生特性乳杆菌的筛选及鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 4-5.