

## 响应面法优化方格星虫多肽-钙螯合物的制备工艺

李康<sup>1</sup>, 戚怡<sup>1,2</sup>, 蔡程锋<sup>1</sup>, 简玮<sup>1</sup>, 梁靖岚<sup>1</sup>, 蒋雨薇<sup>1</sup>, 陈锦灿<sup>1,2</sup>, 罗辉<sup>1,2</sup>, 欧阳茜茜<sup>1,2\*</sup>  
(1. 广东医科大学海洋医药研究院, 广东湛江 524023; 2. 广东湛江海洋医药研究院, 广东湛江 524000)

**摘要:** 目的 探究方格星虫多肽-钙螯合物的最佳制备工艺。方法 通过单因素试验探究螯合反应中肽钙质量比及反应时间、温度、pH对螯合率的影响。通过Box-Behnken响应面法试验探究螯合反应的最佳工艺。结果 经过Box-Behnken响应面法试验的优选, 方格星虫多肽-钙螯合物的最佳制备工艺条件为: 肽钙质量比5:1、反应时间30 min、反应温度60 °C、反应pH 7.0, 经验证试验后方格星虫肽钙螯合率可达68.32%。结论 响应面法优化的方格星虫多肽-钙螯合物的制备工艺简单、高效。

**关键词:** 方格星虫; 多肽; 螯合钙; 响应面法

中图分类号: TS 254.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 04-0383-06

## Preparation of *Sipunculus nudus* peptide-calcium chelate by response surface method

LI Kang<sup>1</sup>, QI Yi<sup>1,2</sup>, CAI Cheng-feng<sup>1</sup>, JIAN Wei<sup>1</sup>, LIANG Jing-lan<sup>1</sup>, JIANG Yu-wei<sup>1</sup>, CHEN Jin-can<sup>1,2</sup>, LUO Hui<sup>1,2</sup>, OUYANG Qian-qian<sup>1,2\*</sup> (1. Marine Biomedical Research Institution, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Zhanjiang Marine Biomedical Research Institute of Guangdong province, Zhanjiang 524000, China)

**Abstract:** Objective To study the optimal preparation technique for *Sipunculus nudus* peptide-calcium chelate (Sn-PCC). Methods The effects of peptide-calcium mass ratio and reaction time, temperature and pH on chelation rate were assessed by single factor experiments. The optimal process for chelation reaction was evaluated by Box-Behnken response surface method. Results After the optimization of Box-Behnken response surface method, the optimal preparation parameters for Sn-PCC were 5:1 of peptide-calcium mass ratio, 30 min, 60 °C, and pH 7.0. The calcium chelation rate of Sn peptide was 68.32% using verification test. Conclusion The preparation process of Sn-PCC optimized by response surface method is simple and efficient.

**Key words:** *Sipunculus nudus*; peptide; chelated calcium; response surface method

方格星虫是一种星虫动物门的海洋生物, 俗称沙虫。方格星虫味道鲜美, 营养丰富, 富含蛋白质、氨基酸和微量元素<sup>[1]</sup>。中医认为, 方格星虫滋阴降火, 主治阴虚盗汗、骨蒸潮热、肺癆咳嗽、夜尿等症状<sup>[2]</sup>。现代药理学研究证实方格星虫的提取物具有抗炎镇痛<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>、抗辐射<sup>[5]</sup>、抗血栓<sup>[6]</sup>等作用。钙是维持人体健康的重要元素, 在骨骼和牙齿的形成、神经递质释放、肌肉组成及心脏搏动调节等生理活动中发挥着重要作用。钙缺乏会导致软骨病、骨质疏松症, 严重影响人体健康<sup>[7]</sup>。当前, 钙缺乏症是一个全球性的公共卫生问题, 在中国约90%的居民严重缺钙, 人均摄入钙量仅

为国际推荐标准的50%<sup>[8]</sup>。近年来, 越来越多的研究集中在食源性蛋白肽的钙螯合物上<sup>[9]</sup>。食源性蛋白肽具有良好的溶解性, 可以防止钙沉淀, 同时食源性蛋白肽吸收率更高, 载体不易饱和, 能有效增加钙吸收并促进钙利用<sup>[10]</sup>。课题组前期研究显示, 方格星虫多肽具有促进斑马鱼骨发育的作用<sup>[11]</sup>。本研究以方格星虫多肽及氯化钙为原料, 通过单因素试验和响应面法试验探究反应温度、反应时间、反应pH、多肽与氯化钙反应质量比等不同因素对产物螯合率的影响, 优化生产工艺, 以期对方格星虫多肽的深度利用提供理论基础, 为新型补钙制剂的研发提供新思路。

收稿日期: 2023-04-25

基金项目: 广东医科大学博士科研启动基金(4SG21243G), 广东省中医药局科研项目(20232095), 广东省水产品加工与安全重点实验室开放基金课题(GDPKLAPPS2206), 广东省药品监督管理局科技创新项目(2023TDZ12)

作者简介: 李康(2000-), 男, 在读硕士研究生, E-mail: 18072152749@163.com

通信作者: 欧阳茜茜(1988-), 女, 博士, 讲师, E-mail: oyqq617@gdmu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

方格星虫:湛江市东风批发市场;胰蛋白酶:北京索莱宝科技有限公司;无水氯化钙:广州化学试剂厂;无水乙醇:广东光华科技股份有限公司;乙二胺四乙酸二钠:天津市大茂化学试剂厂;氯化铵:广州化学试剂厂;浓氨水:汕头市西陇化工厂有限公司;铬黑T:上海麦克林生化科技股份有限公司。所用试剂皆为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

集热式恒温加热磁力搅拌器DF-101S:巩义市予华仪器有限责任公司;电子分析天平ME203E:梅特勒-托利多国际有限公司;循环水式多用真空泵Vacuum Pump V-100:瑞士步琦有限公司;旋转蒸发器Rotavapor R-300:瑞士步琦有限公司;高速冷冻离心机3H16R1:湖南赫西仪器装备有限公司;冷冻干燥机Lyovapor L-200:瑞士步琦有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 方格星虫多肽的制备 取市售的新鲜方格星虫,高速粉碎机粉碎后,溶解于蒸馏水。调节pH至9.0,按酶和底物质量比1:10加入胰蛋白酶,42℃恒温水浴反应4h。4h后,100℃水浴10min灭酶,4℃、10000r/min离心10min,取上清液。用超滤膜将上清液分离,截留分子量<5000Da的肽段(超滤器压力80000Pa、温度8℃、超滤流速55L/h)。冷冻干燥即得方格星虫多肽冻干粉<sup>[11]</sup>。

1.3.2 方格星虫多肽-钙螯合物的制备 取方格星虫多肽冻干粉,溶解于蒸馏水,按照反应要求,添加无水氯化钙并调节pH,在适当温度下反应一定时间。反应结束后,取2mL测定溶液中总钙的量。按反应液和无水乙醇体积比1:10加入无水乙醇,放置过夜。取上清液测定游离钙的量,取沉淀冷冻干燥,即得方格星虫多肽-钙螯合物<sup>[12]</sup>。

1.3.3 肽钙螯合率的测定 钙含量的测定方法:EDTA滴定法。取待测液,依次加入5mL氨水-氯化铵缓冲液(pH=10.0)、5滴0.5%铬黑T溶液,立即用0.05mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>滴定,直至溶液从紫红色变为天蓝色,平行滴定3次,记录所用滴定液的体积。螯合率计算公式如下:螯合率(%)=(M-m)/M×100%,其中M为总钙的量,m为游离钙的量。

1.3.4 单因素试验 (1)肽钙质量比对产物螯合率的影响。固定反应时间为30min,反应温度为50℃,反应pH为6.0,控制肽钙反应质量比为3:1、4:1、

5:1、6:1、7:1,比较不同肽钙质量比对螯合率的影响。(2)反应时间对产物螯合率的影响。固定肽钙质量比为5:1,反应温度为50℃,反应pH为6.0,控制反应时间为10、20、30、40、50min,比较不同反应时间对螯合率的影响。(3)反应温度对产物螯合率的影响。固定肽钙质量比为5:1,反应时间为30min,反应pH为6.0,控制反应温度为20、30、40、50、60℃,比较不同反应温度对螯合率的影响。(4)反应pH对产物螯合率的影响。固定肽钙质量比为5:1,反应时间为30min,反应温度为50℃,控制反应pH为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,比较不同反应pH对螯合率的影响。

1.3.5 Box-Behnken 响应面试验 在单因素试验的基础上,以肽钙质量比、反应时间、反应温度、反应pH为因素,螯合率为指标,运用计算机软件Design-Expert 8.0.6,按照4因素3水平设计响应面试验,探究方格星虫多肽螯合钙的最佳制备工艺。因素水平表如表1所示。

表1 Box-Behnken 响应曲面试验因素水平表

水平	因素			
	A 肽钙质量比	B 反应时间/min	C 反应温度/℃	D 反应pH
-1	4:1	20	50	6.0
0	5:1	30	60	7.0
1	6:1	40	70	8.0

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 22软件进行方差和回归分析;采用Design-Expert 8.0.6进行响应面试验的设计、优化分析;采用Origin 2021对试验数据进行图像绘制。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 单因素试验结果

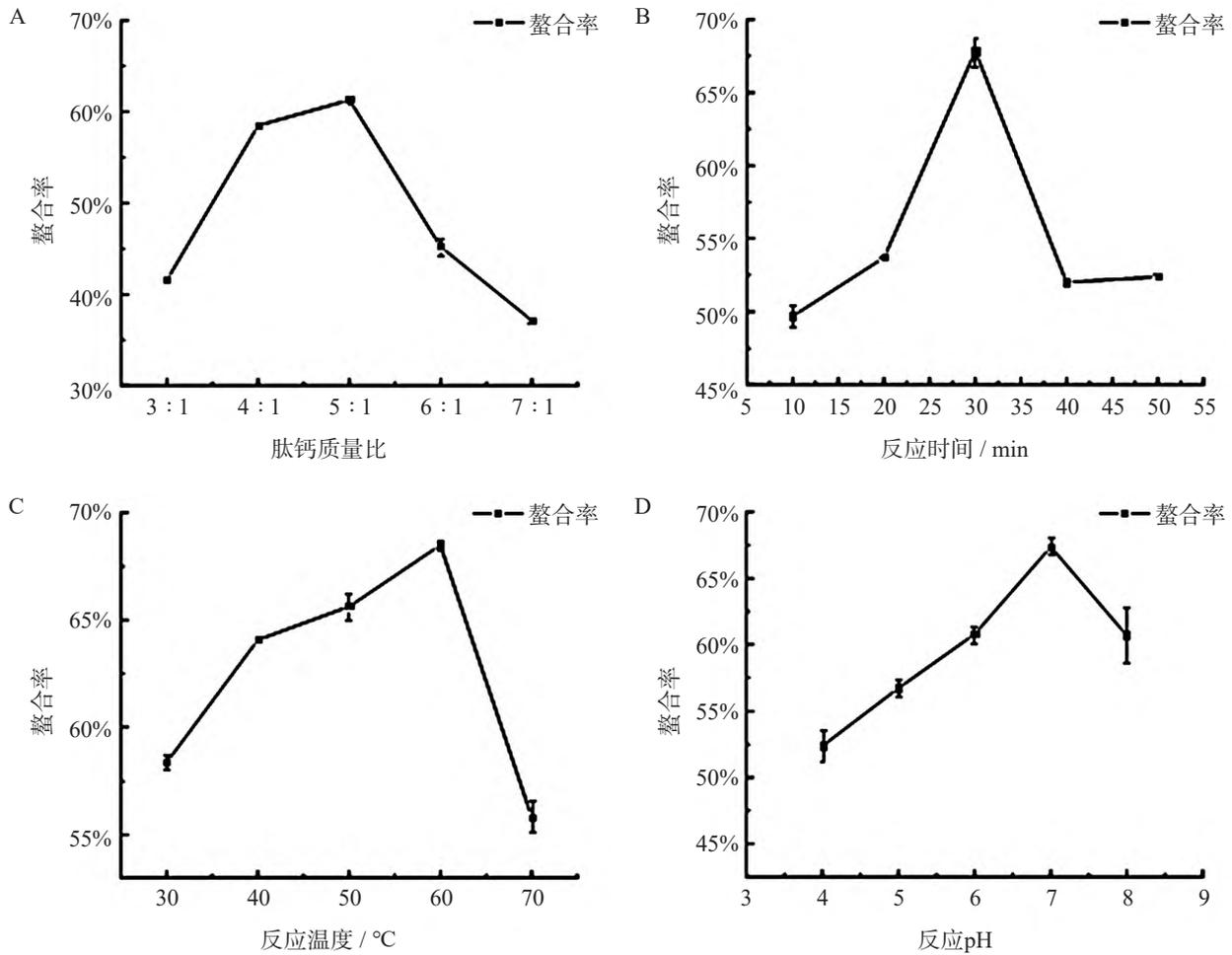
如图1所示,肽钙质量比单因素试验中,最佳肽钙质量比为5:1,最佳反应时间为30min,最佳反应温度为60℃,最佳反应pH为7.0。

### 2.2 Box-Behnken 响应面试验结果

2.2.1 Box-Behnken 响应面模型的建立与方差分析 如表2所示,响应试验的回归方程为: $Y=-255.86+46.23A+0.69B+3.76C+22.91D-0.18AB-0.05AC-0.95AD+0.01BC-0.01BD-0.07CD-3.06A^2-0.01B^2-0.03C^2-0.91D^2$ 。对试验结果进行方差分析,一次项A、D,交互项AB、BC,二次项A<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup>对螯合率的影响差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $0.05$ )。由表3可知,模型项P值<0.0001,说明本回归模型拟合精度高;失拟

项 $P$ 值=0.4102,说明模型稳定,试验数据可靠。由表4可知,该模型的相关系数>0.9,说明该模型的预测可以

较好地体现实际情况;变异系数<10%,说明模型可信度较高。



A. 不同肽钙反应质量比对螯合率的影响; B. 不同反应时间对螯合率的影响; C. 不同反应温度对螯合率的影响; D. 不同反应pH对螯合率的影响

图1 单因素试验结果

表2 响应面试验结果

试验号	A	B	C	D	螯合率/%	试验号	A	B	C	D	螯合率/%
1	4:1	20	60	7.0	60.42	16	5:1	40	70	7.0	66.00
2	6:1	20	60	7.0	66.35	17	4:1	30	50	7.0	60.00
3	4:1	40	60	7.0	63.15	18	6:1	30	50	7.0	63.03
4	6:1	40	60	7.0	62.08	19	4:1	30	70	7.0	60.71
5	5:1	30	50	6.0	62.11	20	6:1	30	70	7.0	61.84
6	5:1	30	70	6.0	62.66	21	5:1	20	60	6.0	65.00
7	5:1	30	50	8.0	64.76	22	5:1	40	60	6.0	65.97
8	5:1	30	70	8.0	62.34	23	5:1	20	60	8.0	65.71
9	4:1	30	60	6.0	61.20	24	5:1	40	60	8.0	66.23
10	6:1	30	60	6.0	63.72	25	5:1	30	60	7.0	66.30
11	4:1	30	60	8.0	65.00	26	5:1	30	60	7.0	66.51
12	6:1	30	60	8.0	63.72	27	5:1	30	60	7.0	68.32
13	5:1	20	50	7.0	64.17	28	5:1	30	60	7.0	66.94
14	5:1	40	50	7.0	63.75	29	5:1	30	60	7.0	67.45
15	5:1	20	70	7.0	62.00						

A. 肽钙质量比; B. 反应时间/min; C. 反应温度/°C; D. 反应pH

表3 回归模型的方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型项	132.90	14	9.49	11.48	<0.001	CD	2.21	1	2.21	2.67	0.125
A	8.77	1	8.77	10.61	0.006	A <sup>2</sup>	60.85	1	60.85	73.61	<0.001
B	1.04	1	1.04	1.26	0.281	B <sup>2</sup>	2.43	1	2.43	2.93	0.109
C	0.43	1	0.43	0.52	0.483	C <sup>2</sup>	50.64	1	50.64	61.26	<0.001
D	4.20	1	4.20	5.08	0.041	D <sup>2</sup>	5.40	1	5.40	6.54	0.023
AB	12.25	1	12.25	14.82	0.002	残差	11.57	14	0.83	-	-
AC	0.90	1	0.90	1.09	0.314	失拟项	8.95	10	0.89	1.36	0.410
AD	3.61	1	3.61	4.37	0.055	误差项	2.62	4	0.66	-	-
BC	4.88	1	4.88	5.91	0.029	总变异	144.47	28	-	-	-
BD	0.05	1	0.05	0.06	0.808						

表4 回归模型的误差分析表

统计项目	统计值	统计项目	统计值
标准差	0.91	相关系数	0.9199
平均数	64.05	校正相关系数	0.8398
变异系数	1.42	预测相关系数	0.6148
残差预测平方和	55.65	精密度	10.702

2.2.2 Box-Behnken 响应面图与等高线图 肽钙质量比-反应时间及反应时间-反应温度对螯合率的交互作用极其显著( $P < 0.01$  或  $0.05$ )。固定其他因素而单独考虑肽钙质量比和反应时间对螯合率的交互影响,当反应时间为 26.31~36.90 min,肽钙质量比为 4.62~5.63 时,螯合率相对较高,为 66.34%~67.21%。固定其他因素而单独考虑反应时间和反应温度对螯合率的交互影

响,当反应温度为 54.82~64.43 °C,反应时间为 26.31~36.90 min 时,螯合率相对较高,为 66.50%~67.21%。见图 2~4。

2.2.3 Box-Behnken 响应曲面模型的验证 通过对响应曲面模型的分析,确定最佳反应条件为:螯合温度 60 °C、反应时间 30 min、pH7.0、方格星虫多肽与氯化钙质量比为 5 : 1,此条件下的螯合率为 68.32%。

### 3 讨论

方格星虫在两广地区广泛种植,味道鲜美,营养丰富,富含蛋白质、氨基酸和微量元素。前期研究证实,方格星虫多肽具有促进斑马鱼骨发育的作用<sup>[11]</sup>。肽钙螯合物作为新型的补钙剂,能显著促进机体对钙

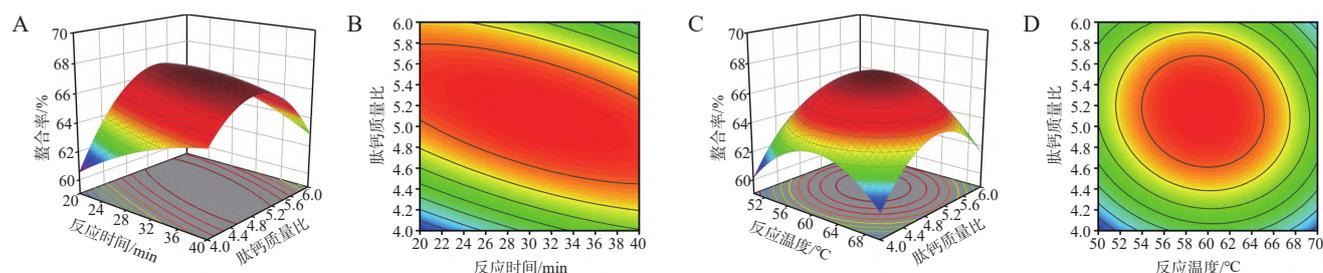


图2 肽钙质量比和反应时间交互项、肽钙质量比和反应温度交互项对螯合率的影响

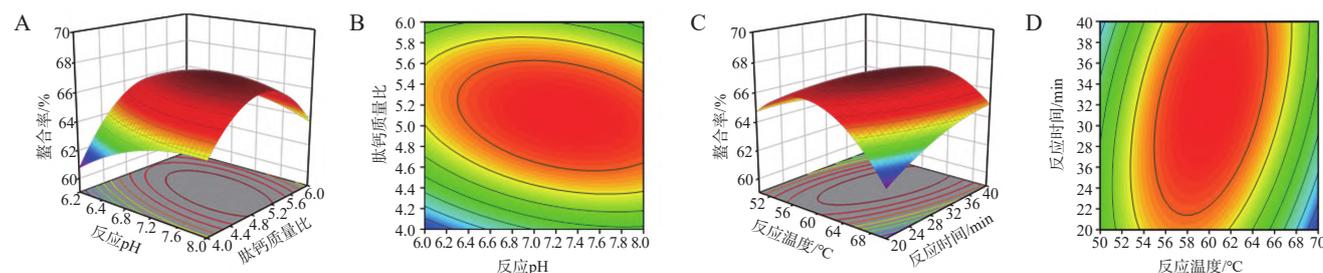


图3 肽钙质量比和反应pH交互项、反应时间和反应温度交互项对螯合率的影响

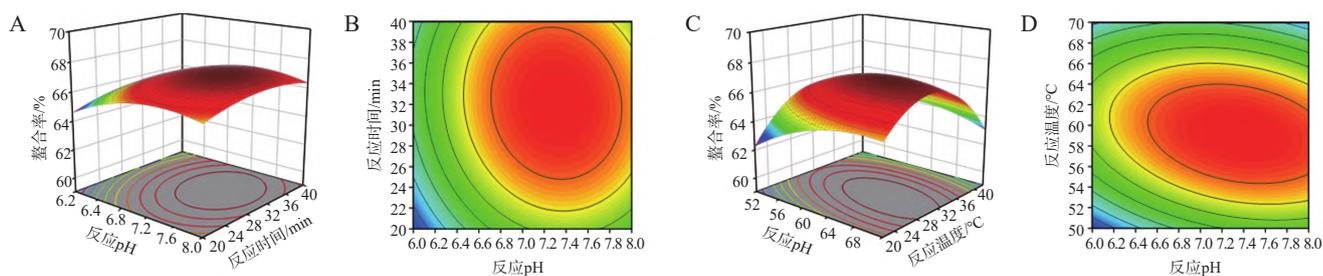


图4 反应时间和反应pH交互项、反应温度和反应pH交互项对螯合率的影响

图4 反应时间和反应pH交互项、反应温度和反应pH交互项对螯合率的影响

的吸收利用,有较大的经济实用价值。本实验以胰蛋白酶水解得到的方格星虫多肽为原料,通过单因素试验和响应面试验,探讨方格星虫多肽的最佳工艺。当多肽与氯化钙反应质量比为3:1~5:1时,质量比越高,螯合率越高,这是因为质量比小时,氯化钙未反应完全,而当多肽与钙质量比为5:1时,氯化钙反应完毕,螯合率达最高值,后续增加多肽的量亦不能提高螯合率,反而会造成资源的浪费。故选取肽钙质量比为5:1较为合适。随着反应时间的增加,螯合率呈先增加后降低的趋势,原因在于反应时间短时,螯合反应不彻底,而当反应时间为30 min时,可能由于参与反应的供电子基团或离子达到饱和,故螯合率最高<sup>[13]</sup>。螯合时间过长,螯合物可能发生解离,同时产生不利于螯合的副反应,螯合率反而下降,故选取反应时间为30 min较为合适。随着反应温度的增加,螯合率呈先增加后降低的趋势。肽钙螯合反应为吸热反应,适当提高温度有利于正向反应的进行。而当温度过高时,多肽可能发生羧基反应,生成肽-M形式的产物,Ca<sup>2+</sup>螯合位点减少,螯合率反而降低<sup>[14]</sup>,故选取反应温度为60℃较为合适。当pH为4.0~7.0时,pH越低,H<sup>+</sup>则越多,H<sup>+</sup>会与Ca<sup>2+</sup>竞争供电子基团-COO<sup>-</sup>,故不利于螯合物的生成。当pH=8.0时,OH<sup>-</sup>易与Ca<sup>2+</sup>生成沉淀,也不利于螯合物的生成;当pH=7.0时,Ca<sup>2+</sup>受H<sup>+</sup>和OH<sup>-</sup>的影响较小,充足的供电子基团与Ca<sup>2+</sup>螯合,螯合率达最高值<sup>[15]</sup>,故选取反应pH为7.0较为合适。

响应面可以判断某两个实验因素对响应值的交互影响。曲面越陡峭,说明该因素对响应值的影响越显著,等高线越趋近于椭圆,表明该两因素的交互作用越强。6组响应面图和等高线图均出现最大值,表明最优试验条件包含在本次响应面试验。通过响应面试验得出以下最佳螯合工艺:螯合温度60℃、反应时间30 min、pH 7.0、方格星虫多肽与氯化钙质量比为5:1,螯合率达68.32%。张玲<sup>[12]</sup>经过响应面试验优化后得到罗非鱼皮胶原蛋白肽-钙螯合物,其最佳工艺条件

为pH7.0、温度40℃、肽钙质量比7:1、时间30 min,最佳产物的螯合率为39.5%。李军<sup>[16]</sup>分离纯化后的鲑鱼骨胶原多肽中的组分F<sub>3</sub>螯合率最高,达到50.10%。相较而言,本试验的螯合条件更加便捷,产物的螯合率更高。

综上所述,本研究以响应面法优化的方格星虫多肽-钙螯合物的制备工艺简单、高效,为补钙剂的生产应用奠定了基础,具有较高的经济实用价值。

#### 参考文献:

- [1]曹玉坡. 方格星虫(*Sipunculus nudus*)蛋白特性及其糖蛋白免疫调节活性研究[D]. 福建: 福建农林大学, 2022.
- [2]中国人民解放军海军后勤部卫生部. 中国药用海洋生物[M]. 中国药用海洋生物, 1977.
- [3]ZHANG C X, DAI Z R, CAI Q X. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(3): 1177-1182.
- [4]SU J, JIANG L, WU J, et al. Anti-tumor and anti-virus activity of polysaccharides extracted from *Sipunculus nudus*(SNP) on Hepg2.2.15[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 87: 597-602.
- [5]LI N, SHEN X, LIU Y, et al. Isolation, characterization, and radiation protection of *Sipunculus nudus* L. polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 288-296.
- [6]GE Y H, CHEN Y Y, ZHOU G S, et al. A novel antithrombotic protease from marine worm *Sipunculus nudus*[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3023.
- [7]SHLISKY J, MANDLIK R, ASKARI S, et al. Calcium deficiency worldwide: Prevalence of inadequate intakes and associated health outcomes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2022, 1512(1): 10-28.
- [8]BALK E M, ADAM G P, LANGBERG V N, et al. Global dietary calcium intake among adults: A systematic review[J]. Osteoporos Int, 2017, 28(12): 3315-3324.
- [9]胡冠华, 王德宝, 苏琳, 等. 食源性钙螯合肽的研究概况[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 224-229.
- [10]叶剑, 徐仰丽, 张井, 等. 海洋生物钙的开发利用研究进

(下转第394页)

- miltiorrhizae injection on N(G)-nitro-D-arginine induced nitric oxide deficient and oxidative damage in rat kidney[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(5): 453-458.
- [12] LI Y, GUO Y, CHEN Y, et al. Establishment of an interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation-activated endothelial cell-smooth muscle cell-mononuclear cell co-culture model and evaluation of the anti-inflammatory effects of tanshinone IIA on atherosclerosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1665-1676.
- [13] CHEN Y, WU X, YU S, et al. Neuroprotection of tanshinone IIA against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibition of macrophage migration inhibitory factor in rats[J]. *Plos One*, 2012, 7(6): e40165.
- [14] GAO H, SUN W, ZHAO J, et al. Tanshinones and diethyl blechnics with anti-inflammatory and anti-cancer activities from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (*Danshen*)[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33720.
- [15] XU F, KANG Y, ZHANG H, et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection[J]. *J Infect Dis*, 2013, 208(3): 528-538.
- [16] SAFDARPOUR S, EFTEKHARI Z, EIDI A, et al. Encapsulated saponin by ferritin nanoparticles attenuates the murine pneumococcal pneumonia[J]. *Microb Pathog*, 2022, 172: 105731.
- [17] LI R, WU K, LI Y, et al. Revealing the targets and mechanisms of vitamin A in the treatment of COVID-19[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(15): 15784-15796.
- [18] CHOI W I, JEONG J, LEE C W. Association between EGFR mutation and ageing, history of pneumonia and gastroesophageal reflux disease among patients with advanced lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2019, 122: 101-108.
- [19] SU S, HUA D, LI J P, et al. Modulation of innate immune response to viruses including SARS-CoV-2 by progesterone[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 137.
- [20] WYPYCH T P, PATTARONI C, PERDIJK O, et al. Microbial metabolism of L-tyrosine protects against allergic airway inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(3): 279-286.
- [21] KALINOWSKI A, UEKI I, MIN-OO G, et al. EGFR activation suppresses respiratory virus-induced IRF1-dependent CXCL10 production[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(2): L186-L196.
- [22] SAKIA S, BORDOLOI M. Molecular docking: Challenges, advances and its use in drug discovery perspective[J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(5): 501-521.
- [23] LOHNING A E, LEVONIS S M, WILLIAMS-NOONAN B, et al. A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists[J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(18): 2023-2040.
- [24] MORRIS G M, LIM-WILBY M. Molecular docking[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 443: 365-382.
- [25] 李安安, 姜涛, 詹敏, 等. 参苓白术散治疗膝关节关节炎作用机制的网络药理学和分子对接技术分析[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(2): 197-204.

~~~~~

(上接第 387 页)

- 展[J]. *中国海洋药物*, 2021, 40(5): 71-78.
- [11] 刘珍, 唐晓宁, 吴科锋, 等. 方格星虫低聚肽的分离、鉴定及其促骨发育作用评价[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(20): 334-341.
- [12] 张玲. 罗非鱼皮胶原降解反应行为及肽钙螯合物制备研究[D]. 广东: 华南理工大学, 2020.
- [13] WANG L, DING Y, ZHANG X, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination[J]. *Food Chem*, 2018, 239: 416-426.
- [14] ZHANG X, JIA Q, LI M, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from phosvitin hydrolysates and the study of its calcium chelation mechanism[J]. *Food Res Int*, 2021, 141: 110169.
- [15] ZHAO L, HUANG Q, HUANG S, et al. Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(42): 10274-10282.
- [16] 李军. 鲢鱼骨胶原多肽的制备及其抗氧化、钙螯合活性的研究[D]. 江西: 江西师范大学, 2020.