

新型速溶型钙增强剂的制备和稳定性研究

胡锦涛^{1,4}, 陆计萍¹, 文丽杰¹, 周玥¹, 周鹏^{*1,2,3}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 4. 聚合物分子工程国家重点实验室, 复旦大学, 上海 200433)

摘要: 研究了一种由浓缩乳蛋白粉(Milk Protein Concentration Powders, MPC Powders)和难溶性钙盐制备得到的新型钙增强剂(Ca-MPC), 通过激光共聚焦扫描显微镜、 ζ -电位等表征手段证实了此钙增强剂是蛋白质和难溶性钙盐通过分子间弱相互作用形成的复合物, 并进一步分析了蛋白质的不同组分与钙盐之间相互作用的差异性。另外, 对此类钙增强剂在纯水和蛋白溶液中的分散稳定性进行了考察, 结果表明, 该钙增强剂在水溶液和蛋白溶液中的悬浮稳定性都有所改善, 可作为良好的食品外源性钙补充剂。

关键词: 浓缩乳蛋白; 碳酸钙; 羟基磷灰石; 磷酸三钙; 分子间相互作用

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1174—08

Preparation and Suspension Stability of a New Calcium-Fortifier

HU Jinhua^{1,4}, LU Jiping¹, WEN Lijie¹, ZHOU Yue¹, ZHOU Peng^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: A new calcium-fortifier (Ca-MPC) prepared from milk protein concentration (MPC) powders and insoluble calcium salts was characterized by confocal laser scanning microscopes and ζ -potential. It was confirmed as the complex of protein and calcium particles. The formation of Ca-MPC was driven by the weak molecular interactions. The differential interaction between protein and calcium particles was further investigated. An improvement on the suspension stability of Ca-MPC was observed when dispersed either in DI-water or protein solution, implying the industrial application as a good resource of calcium-fortifier.

Keywords: milk protein concentration, calcium carbonate, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, molecular interaction

收稿日期: 2015-02-01

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20150150); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(1024130201150130); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-201602); 聚合物分子工程教育部重点实验室(复旦大学)开放课题基金项目(K2015-20)。

作者简介: 胡锦涛(1982—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品科学研究。E-mail: hujinhua@jiangnan.edu.cn

***通信作者:** 周鹏(1975—), 男, 山东青岛人, 哲学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品科学研究。E-mail: zhoupeng@jiangnan.edu.cn

高钙乳制品不仅含有人体必须的多种营养素^[1-2],还能提供更多有益于人体的钙质。外源性钙强化剂主要分为可溶性钙和难溶性钙两类,两者应用于乳制品生产中时各有利弊。可溶性钙由于和酪蛋白之间强烈的相互作用,会造成酪蛋白的桥连絮凝,进而引起乳制品的热不稳定性。难溶性钙虽不会造成乳蛋白在热力学上的不稳定,但其悬浮稳定性差,容易在乳制品中产生沉淀。

人体近 50%的骨组织为蛋白质,另外 50%为矿物质。大量研究表明钙与蛋白质对骨骼健康都十分重要。一方面,骨骼需要不断吸收新的蛋白质来完成生长和重建;另一方面,钙作为骨骼组成的重要元素,与蛋白质对骨骼健康有协同作用。乳清蛋白能够明显增加成骨细胞的增值^[3],酪蛋白水解物能够增强成骨细胞的基因表达,从而有利于骨骼生长^[4]。Hughes 和 Harris 发现在补钙的同时增加蛋白质的摄入量会对骨组织生长起到正相关作用,骨骼状况随着摄入蛋白质的增加呈线性改善,但蛋白摄入量很低时,反而会造成骨损失^[5]。因此,当蛋白摄入量不足时,钙不足以保护骨骼,补钙的同时摄入充足的蛋白质才能对骨骼状况起到最好的改善效果。

在食品工业中,通常认为蛋白和难溶性钙盐之间不存在相互作用,但是生物材料学领域的研究却已揭示了难溶性钙盐和蛋白质之间存在较为强烈的相互作用^[6-7]。作者基于蛋白与难溶性钙盐之间的相互作用研究了一种新型钙增强剂,通过激光共聚焦扫描显微镜、 ζ -电位等手段表征了该钙增强剂,并考察了该钙增强剂的分散稳定性。结果表明,此钙增强剂在水溶液和蛋白溶液中的稳定性都有所改善,可用于速溶型高钙乳粉的生产。

1 材料与方法

1.1 材料

浓缩乳蛋白 (Milk Protein Concentration 485): 新西兰恒天然集团产品; 碳酸钙 (CaCO_3): 日本 Maruo 公司产品; 羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA)、磷酸三钙 (tricalcium phosphate, TCP): 德国 Budenheim 化学公司产品; 异硫氰酸荧光素 (FITC): 美国 Sigma 公司产品; 考马斯亮蓝 R-250: 国药集团化学试剂有限公司产品; 其它试剂均分析纯; 实验用水为超纯水。

1.2 主要仪器设备

激光粒度分析仪 S3500: 美国麦奇克有限公司产品; 激光共聚焦显微镜 TCS SP8: 德国莱卡公司产品; 激光粒度仪 Zetasizer Nano-ZS: 英国马尔文仪器有限公司产品; 可见分光光度计 UV-1200: 上海美谱达仪器有限公司产品。

Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra 小型电泳槽: 美国 Bio-Rad 公司产品; Gel Doc EZ 凝胶成像仪: 美国 Bio-Rad 公司产品; QB-128 旋转培养器: 其林贝尔仪器制造有限公司产品; SevenEasy 实验室 pH 计: 梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 新型钙增强剂的制备 配制浓缩乳蛋白 (Milk Protein Concentration, MPC) 的水溶液 (质量浓度为 40 mg/mL), 搅拌 4 h 后在 4 °C 下过夜, 使蛋白完全水合。通过稀释一定量的 MPC 原始溶液来获得不同质量浓度的蛋白溶液 (1~30 mg/mL), 搅拌至少 1 h 后待用。在 1.5 mL 的离心管中加入 20 mg 的难溶性钙粉末, 再加入 0.5 mL 超纯水, 超声 10 min 后, 分别在离心管中加入 0.5 mL 不同质量浓度的蛋白溶液。将所得到的溶液在室温下 (约 20 °C) 旋转孵育 2.5 h 后经 7 000 r/min 的速度离心 15 min 将被蛋白包覆的难溶性钙粉分离出来, 用超纯水漂洗所得沉淀 1 次, 去除表面松散附着的蛋白, 即为制得的钙增强剂 (Ca-MPC)。

1.3.2 钙增强剂的表面形貌观察 通过 TCS-SP8 激光共聚焦显微镜对钙增强剂进行成像分析进一步验证蛋白质在钙盐表面的吸附^[8-9]。用异硫氰酸荧光素 (FITC) 对实验组和对照组分别染色后进行观察, 对照组为没有和 MPC 蛋白溶液混合的难溶性钙的水分散液。

1.3.3 钙增强剂的 ζ -电位分析 将制得的钙增强剂重新分散在超纯水中 (质量分数 0.05%), 用超声波处理使其尽可能分散均匀。用马尔文 Zetasizer Nano-ZS 对再分散液进行 ζ -电位的检测, 采用 Smoluchowski 模型近似处理^[10-11]。

1.3.4 钙增强剂的表面蛋白质量浓度分析 CaCO_3 吸附蛋白质 (初始质量浓度 < 1 mg/mL) 后, 在纯水中再分散, 用 Lowry 法^[12-13]分析离心所得的上清液。HA 和 TCP 吸附蛋白后, 在纯水中再分散, 用 Biuret 法^[14-15]分析离心所得的上清液。检测样品为离心后所得上清液和漂洗沉淀所得漂洗液的混合液, 被吸附到

钙盐上的蛋白量为混合液中蛋白含量与初始蛋白含量的差值。通过被吸附的蛋白量与钙盐颗粒的总表面积可以计算得到表面蛋白质量浓度。所有实验至少平行两次。

1.3.5 钙增强剂的表面蛋白组分分析 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[16-17]对离心所得的样品的上清液进行研究,分析 MPC 中不同的蛋白组分与难溶性钙表面相互作用的差异性,上样量为 20 μ L,分离胶的质量浓度为 12 g/dL,浓缩胶的质量浓度为 4 g/dL,用考马斯亮蓝 R-250 溶液对胶板染色,脱色处理后通过凝胶成像仪及 Image Lab 3.0 软件定量分析各蛋白条带亮度。不同实验条件下,上清液中的残余蛋白的差异以上清液中的蛋白余量与初始蛋白总量的比值表示,至少平行两次。

1.3.6 钙增强剂对 MPC 热稳定性的影响 实验对 4 组不同的钙盐样品进行研究,包括:(1)新型钙增强剂;(2)难溶性钙:碳酸钙、羟基磷灰石和磷酸三钙;(3)可溶性钙盐:氯化钙和乳酸钙;(4)空白组:不添加钙的蛋白溶液。

进行 3 种不同质量浓度钙盐的添加,考察不同钙盐对乳蛋白热稳定性的影响。将 3 组钙盐样品分别加入到 20 mL, 10 mg/mL 的蛋白质溶液中,用 0.1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 对各个样品进行 pH 值的调节,使得 pH 值为 7.0 ± 0.1 ,每一个样品都充分搅拌,均匀混合。取 6 mL 样品于玻璃试管中,编号后用相机拍照记录。另外,将所有样品放入 80 $^{\circ}$ C 的恒温水浴锅中加热 15 min。水浴加热后,再一次观察每一根试管中蛋白质的表观变化,并用相机拍照记录。

1.3.7 钙增强剂的悬浮稳定性 分别考察了钙增强剂在纯水体系和蛋白溶液中的悬浮稳定性。

1)钙增强剂在纯水体系的悬浮稳定性:将钙增强剂重新分散到超纯水中,超声处理使其分散均

匀,以 900 nm 波长作为入射光,记录 120 min 内再分散液的浊度的变化^[18-19],至少平行两次。通过(1)式得到溶液吸光度值随时间的减少率:

$$\text{吸光度值减少率}(\%) = (A_t/A_0) \times 100\% \quad (1)$$

A_t 为 t 时间再分散液的吸光度值, A_0 为起始吸光度值。

2)蛋白溶液中的稳定性:实验组将在 5 mg/mL MPC 溶液中制备得到的难溶钙-蛋白复合物添加到相应 5 mg/mL MPC 溶液中,对照组为难溶性钙本身添加到 5 mg/mL MPC 溶液中,混合后静置 10 h 拍照。

2 结果与讨论

2.1 钙增强剂的表面形貌观察

通过激光共聚焦显微镜成像(CLSM)观察制备得到的钙增强剂的表面形貌。采用 FITC 染色对蛋白进行染色(FITC 不能对钙盐染色)^[20]。图 1 是染色后的钙增强剂的 CLSM 图像,在黑色的、近似球状的中心(钙盐颗粒)表面存在绿色圆环(染色后的蛋白层),表明制备得到的钙增强剂是一种钙剂吸附蛋白后的复合物。

2.2 钙增强剂的 ζ -电位分析

ζ -电位是表征胶体或悬浮物体系稳定性的重要指标,也常用来分析带电粒子之间的静电相互作用。图 2 显示了不同的钙剂和 MPC 复合后,颗粒 ζ -电位的变化。

图 2 (a) 显示 CaCO_3 在水中带正电荷,当与 MPC 混合后, CaCO_3 的 ζ -电位突跃为负值, ζ -电位的变化与混合时初始蛋白质质量浓度变化相关。随着混合时初始蛋白质质量浓度的增加,离心后再分散液的 ζ -电位的绝对值逐渐增加;当蛋白质质量浓度增大到一定程度后, ζ -电位绝对值不再有明显变化,吸附蛋白后 CaCO_3 的 ζ -电位开始达到平衡峰

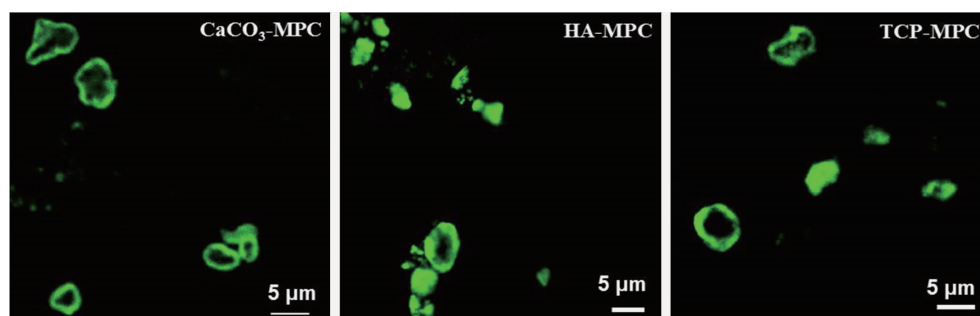


图 1 钙增强剂(由 MPC 和 CaCO_3 , HA 和 TCP 制备得到)激光共聚焦图像

Fig. 1 Confocal micrographs of the calcium-fortifiers prepared from MPC with CaCO_3 , HA and TCP

值,此时初始 MPC 质量浓度约为0.5 mg/mL。在该实验条件下,MPC 自身带负电荷, CaCO_3 的 ζ -电位从正值突变为负值并且绝对值随蛋白质质量浓度增加而增加,这说明蛋白质已经吸附到钙盐颗粒表面,形成了复合物; ζ -电位达到最大值,则说明 CaCO_3 对 MPC 的吸附达到了饱和。

图 2(b)和 2(c)分别为 HA 和 TCP 的 ζ -电位随初始蛋白浓度的变化情况。HA 和 TCP 在水中略带负电荷,与 MPC 的混合反应后,HA 和 TCP 再分散液的 ζ -电位的绝对值与图 2(a)中 CaCO_3 的 ζ -电位变化一致,也是随着混合时初始蛋白质质量浓度的增加逐渐增大,直到达到吸附饱和, ζ -电位不再变化。使 HA 和 TCP 开始达到饱和吸附的初始 MPC 质量浓度均为 5 mg/mL 左右。

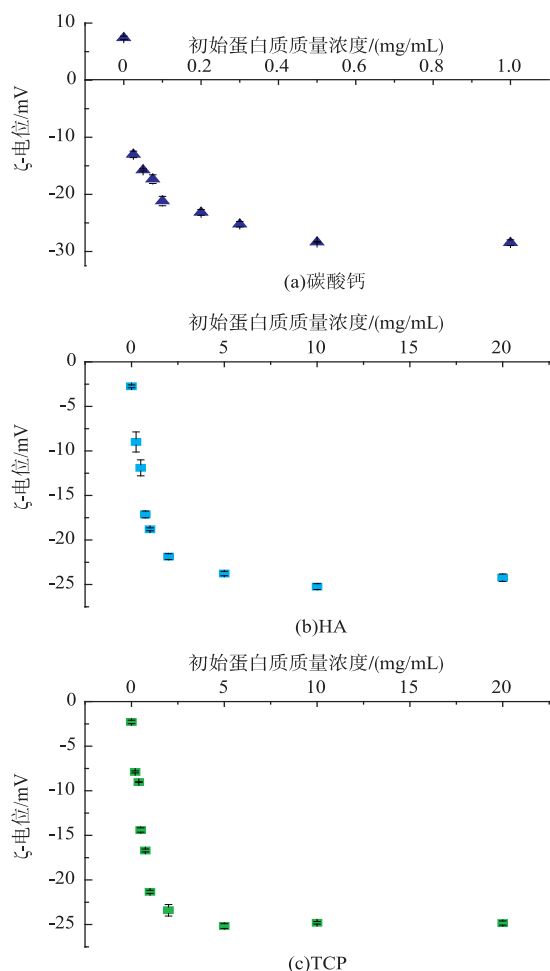


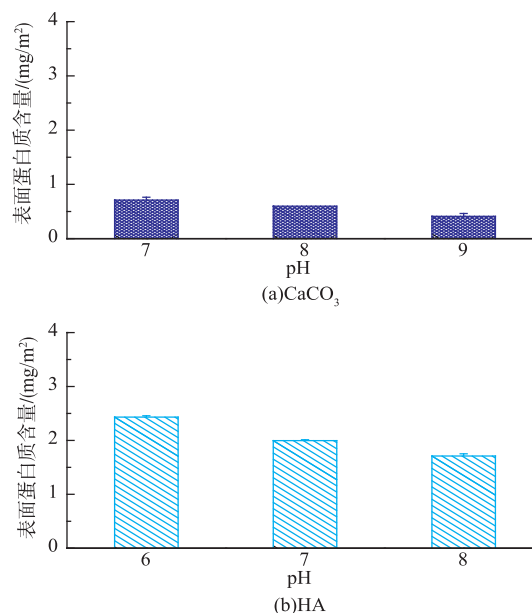
图 2 初始 MPC 蛋白质质量浓度对不同钙剂 ζ -电位的影响
Fig. 2 Zeta-potential of calcium particles isolated from the protein solutions and re-dispersed in Milli-Q water after adsorbing protein in MPC solution with different concentrations

2.3 pH 值对钙增强剂表面蛋白量的影响

图 3 所示为 3 种难溶性钙对 MPC 吸附量随 pH 值的变化。由于 CaCO_3 在 pH 接近 6 时已发生部分溶解,所以该增强剂的 pH 讨论范围为 pH 7~9,而 HA 和 TCP 的讨论范围为 pH 6~8。

实验中,3 种难溶性钙对 MPC 的吸附量随着初始溶液 pH 值的增加而减少。这是由于当 pH 降低时, CaCO_3 上的碳酸根离子以及 HA 和 TCP 上的磷酸根离子质子化,它们的负电荷减少,因此带负电荷的蛋白与钙盐上带负电荷的基团之间静电排斥力减小,更多的蛋白能够吸附在钙盐的 Ca^{2+} 位点上。

此外,比较图 3(b)和 3(c)后发现同属于磷酸钙类的 HA 和 TCP 吸附 MPC 的量不同。3 种钙剂平均粒径 d_{50} 经激光粒度分析仪测定得到: CaCO_3 为 1.3 μm ;羟基磷灰石为 2.1 μm ;TCP 为 1.9 μm 。通过 BET 比表面积检测法得到 CaCO_3 比表面积为 13.8 m^2/g ;羟基磷灰石比表面积为 88.6 m^2/g ;TCP 的比表面积为 67.2 m^2/g 。当溶液 pH 值相同时,虽然 TCP 的比表面积略小于 HA,但是 TCP 能够吸附比 HA 更多的 MPC。不同的磷酸钙晶体结构可能造成吸附蛋白质的差异性。郭灵虹^[21]研究建立的 HA 和 TCP 的晶胞模型认为,HA 和 TCP 晶胞中 Ca 与磷酸基团的距离不同,HA 中比较小。因此,从晶体结构上分析,两种磷酸钙的 Ca 和磷酸基团的反应活性不同,HA 的反应活性可能比较小。另外,HA 晶胞单位面积内 Ca 和 O 的数目明显小于 TCP 中的数目^[21],这也会造成两种钙增强剂表面蛋白质含量的差异。



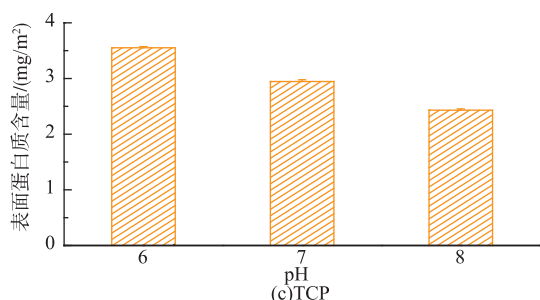


图3 pH值对MPC在CaCO₃、HA和TCP上吸附的影响
Fig. 3 Effect of pH on the adsorption of MPC on CaCO₃, HA and TCP particles

2.4 MPC中不同的蛋白组分与不同钙剂相互作用的差异性分析

图4所示为MPC与不同钙剂旋转培养后的上清液中蛋白组分的SDS-PAGE凝胶电泳图及相应的α-酪蛋白和β-酪蛋白条带的定量分析。

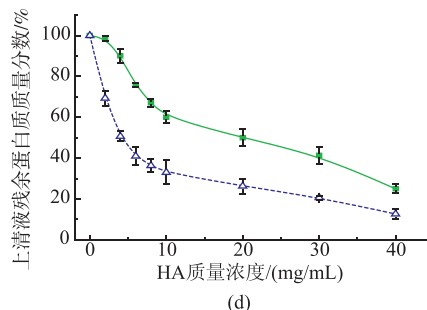
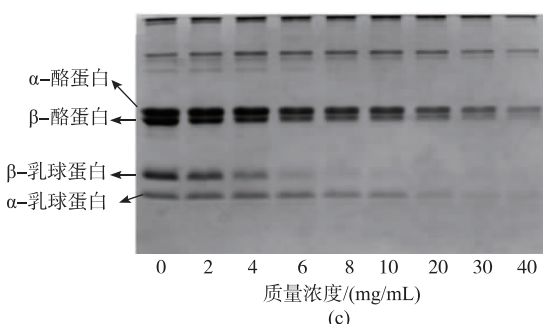
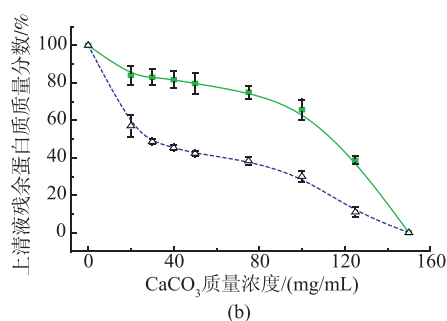
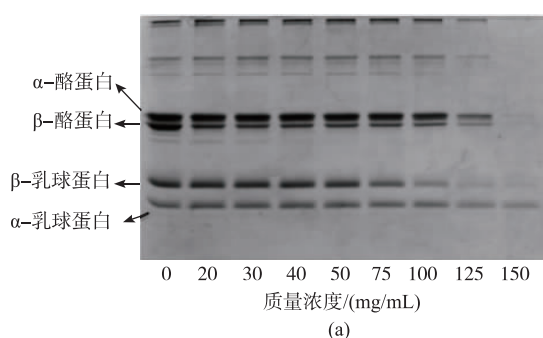
从图4可以看出,MPC中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白在不同钙剂上的吸附优势始终保持为β-乳球蛋白>α-乳白蛋白。MPC中α-酪蛋白和β-酪蛋白在不同钙剂上的吸附优先性则表现为β-酪蛋白>α-酪蛋白。在MPC中,乳清蛋白以单体或较小的4级结构存在,而酪蛋白是以较大的胶态聚合物形式存在,即酪蛋白胶束。研究^[20,22]指出,当HA颗粒加入脱脂乳中会造成酪蛋白胶束的解离,随后以单一酪蛋白形式(α-酪蛋白和β-酪蛋白)结合到颗粒

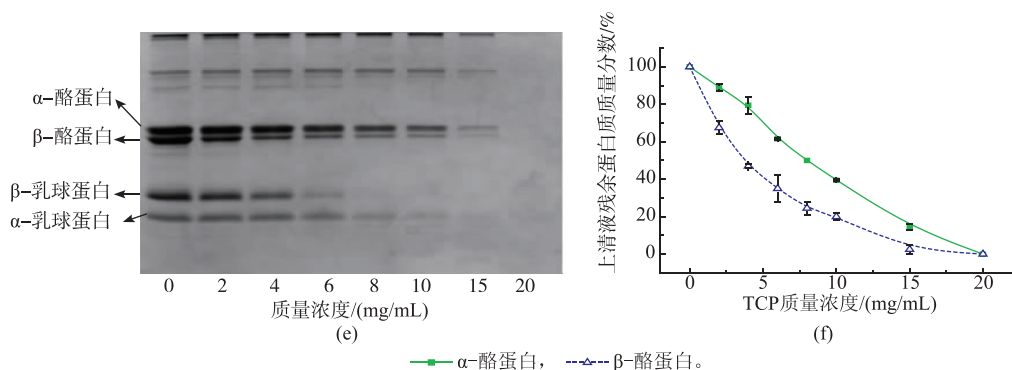
表面。这种酪蛋白胶束的裂解是因为乳清中存在的钙离子,磷酸根离子和可能存在的柠檬酸根离子结合到HA颗粒表面上,从而打破了MPC中的矿物平衡^[22],使得酪蛋白胶束内部的胶体磷酸钙进入溶液,酪蛋白胶束裂解。在钙盐吸附MPC时,单体酪蛋白需要经过酪蛋白胶束的裂解而释放,而乳清蛋白则可直接被吸附到颗粒表面,特别是电荷集中分布的β-乳球蛋白。胶束裂解后,已有部分的β-乳球蛋白占据了钙盐颗粒的吸附位点,此时,钙盐颗粒都带上了更多的负电荷,在随后α-酪蛋白和β-酪蛋白的吸附过程中,β-酪蛋白比α-酪蛋白所带的净负电荷略少,另外β-酪蛋白电荷集中分布的优势也占据了主导,这就使得MPC中酪蛋白在3种钙盐上的吸附优先性都为β-酪蛋白>α-酪蛋白。

为了更好地全面了解这种吸附优先性的相互作用机制,仍需要对这些蛋白质中的单一组分与不同钙盐的相互作用进行深入的研究探讨,因为其他因素也会对蛋白质和钙盐颗粒之间的相互作用产生影响,包括颗粒的性质(如表面组成和结构)以及发生吸附后可能产生的蛋白质与蛋白质、蛋白质与颗粒之间的协同相互作用等^[23-26]。

2.5 钙增强剂对MPC热稳定性的影响

根据我国GB 14880-2012《食品营养强化剂使用卫生标准》中规定钙强化的调制乳粉中,钙的使用量为3.0~7.2 g/kg,其中可以使用的钙剂有碳酸





注:(a,c,e)为上清液残留 MPC 组分的 SDS-PAGE 凝胶电泳;(b,d,f)为其中 α -酪蛋白和 β -酪蛋白对应的条带定量分析;电泳图下的数字表示难溶性钙的浓度(mg/mL)

图 4 MPC 中不同的蛋白组分与 CaCO_3 , TCP 和 HA 相互作用的差异性分析

Fig. 4 Number below each band in SDS-PAGE gels represents the concentration (mg/mL) of insoluble calcium salt in suspension

钙、葡萄糖酸钙、柠檬酸钙、乳酸钙、氯化钙、乙酸钙、氧化钙、甘氨酸钙、磷酸三钙等。这些外源性钙强化剂,可归于分子钙和离子钙两类,市场上的高钙乳制品通常采用分子钙。通过实验比较了不同钙剂对牛乳蛋白热稳定性的影响,包括钙增强剂、分子钙和离子钙。

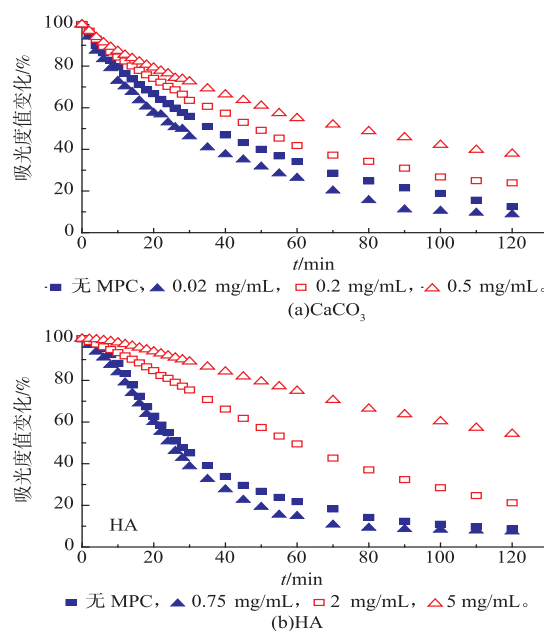
水浴前各样品差异不明显,但加热后,添加可溶性钙的 MPC 出现了明显的絮凝沉淀。MPC 中既有酪蛋白,也有乳清蛋白,以 4:1 的比例存在于其中。与酪蛋白酸钠中的酪蛋白不同的是,MPC 中的酪蛋白是以胶束形式存在的,胶束的外表覆盖着 κ -酪蛋白“毛发层”,起到稳定胶束结构的作用。与其他种类的酪蛋白相比, κ -酪蛋白的磷酸化程度最低,对钙离子最不敏感。有研究表明,高温短时的巴氏杀菌(72 $^{\circ}\text{C}$, 15 s)处理对酪蛋白胶束结构几乎没有影响,但是更高的处理温度会造成乳清蛋白变性,使得乳清蛋白通过巯基-二硫键交换反应与酪蛋白胶束发生作用,特别是 β -乳球蛋白和 κ -酪蛋白间的相互作用^[27]。因此, Ca^{2+} 的存在一方面促进了 β -乳蛋白的热变性以及其与 κ -酪蛋白的二硫键交联,另一方面降低了酪蛋白胶束的静电排斥作用,并在酪蛋白分子间形成钙桥,从而导致了絮凝。

通过钙增强剂、分子钙和离子钙对牛乳蛋白热稳定性影响的比较,显示了作者制备的钙增强剂,不会对乳蛋白的热稳定造成不良的影响,可以作为强化剂添加到牛乳蛋白中。

2.6 钙增强剂的悬浮稳定性考察

2.6.1 钙增强剂在纯水相中的悬浮稳定性 图 5

为钙增强剂的悬浮液吸光度随时间的变化情况。达到吸附饱和以后,MPC 对 HA 和 TCP 悬浮液分散稳定性的改善效果明显优于对 CaCO_3 分散稳定性的改善效果。对 CaCO_3 来说稳定性由原先的~10%提高到~40%,对 HA 和 TCP 来说,稳定性由~10%提高为~60%。从悬浮液在室温下静置 10 h 后的照片,可以明显看出钙增强剂悬浮稳定性的改善效果。另外在图 6 中观察到了少量 MPC 的吸附对 3 种钙盐悬浮液稳定性的负作用,即吸附少量 MPC 后,颗粒的悬浮液稳定性相比没有蛋白吸附的钙盐本身(对照组样品)更低,这说明钙增强剂制备时的蛋白溶液需要达到一定的浓度。



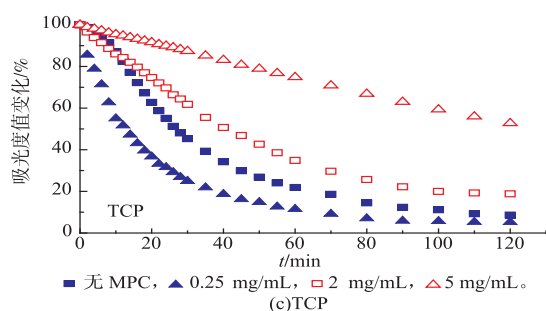


图5 不同质量浓度 MPC 钙增强剂再分散液的吸光度随时间的变化

Fig. 5 Absorbance as a function of time for Ca-MPC complex suspensions made from solutions of different MPC concentrations

通过钙增强剂和难溶性钙在水相中悬浮液分散稳定性的对比说明钙增强剂的悬浮稳定性得到了提高。

2.6.2 钙增强剂在 MPC 蛋白溶液中的悬浮稳定性
难溶性钙或钙增强剂添加到 MPC 蛋白溶液中,分散液的悬浮稳定性在静置 10 h 后进行对比,钙增强剂分散在蛋白溶液中时,其分散稳定性更好,10 h 后大部分的纯钙盐已经沉降到了小瓶底部,而大部分的复合物仍然分散在蛋白溶液中。

3 结语

基于难溶性钙和食源性蛋白制备了一种复合物,可作为新型钙增强剂使用。通过 CLSM 观测其形貌,并通过 ζ -电位、溶液浊度等考察了钙增强剂的悬浮稳定性,结果表明其在纯水分散液和蛋白溶液中的分散稳定性都有所提高。与传统的难溶性钙盐相比,新型钙增强剂能改善产品的稳定性,可被应用于速溶型高钙乳粉的生产,也可用于其他蛋白液态、蛋白粉体或蛋白棒等高钙蛋白制品的生产中。

参考文献:

- [1] 夏文水, Sindayikengera Séverin. 食品中乳蛋白的重要作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 100-105.
XIA Wenshui, SINDAYIKENGERA Séverin. Study on the rheological properties of whey protein [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6): 100-105. (in Chinese)
- [2] 和占星, 王向东, 黄梅芬, 等. 中甸牦牛、迪庆黄牛和犏牛的乳的主要营养成分比较[J]. 食品与生物技术学报, 2015(12).
HE Zhanxing, WANG Xiangdong, HUANG Meifen, et al. Comparison of the major nutritional components of milk from Zhongdian yak, Diqing Yellow Cattle and Cattle-Yak [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(12): 1294-1301. (in Chinese)
- [3] XU R. Effect of whey protein on the proliferation and differentiation of osteoblasts [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(7): 3014-3018.
- [4] BEHERA P, KUMAR R, SANDEEP I V R, et al. Casein hydrolysates enhance osteoblast proliferation and differentiation in mouse bone marrow culture[J]. *Food Bioscience*, 2013, 2: 24-30.
- [5] DAWSON-HUGHES B, HARRIS S S. Calcium intake influences the association of protein intake with rates of bone loss in elderly men and women[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 75(4): 773-779.
- [6] POKROVSKY O S, MIELCZARSKI J A, BARRES O, et al. Surface speciation models of calcite and dolomite/aqueous solution interfaces and their spectroscopic evaluation[J]. *Langmuir*, 2000, 16(6): 2677-2688.
- [7] LUO Q L, ANDRADE J D. Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 200(1): 104-113.
- [8] LU N, ZHANG L, ZHANG X, et al. Molecular migration in high-protein intermediate-moisture foods during the early stage of storage: Variations between dairy and soy proteins and effects on texture[J]. *Food Research International*, 2016, 82: 34-43.
- [9] LIU C, XIE L, ZHANG R. Heterogeneous distribution of dye-labelled biomineralization proteins in calcite crystals [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5.
- [10] HAO H, MA Q, HE F, et al. Doxorubicin and Fe₃O₄ loaded albumin nanoparticles with folic acid modified dextran surface for tumor diagnosis and therapy[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(45): 7978-7987.

- [11] HU J H, YU S Y, YAO P. Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly [J]. **Langmuir**, 2007, 23(11): 6358-6364.
- [12] NAERY L, SUKJINukjin S, HYE Joo C, et al. Improved quantification of protein in vaccines containing aluminum hydroxide by simple modification of the Lowry method[J]. **Vaccine**, 2015, 33(39): 5031-5034.
- [13] PIRES-OLIVEIRA R, JOEKES I. UV-vis spectra as an alternative to the Lowry method for quantify hair damage induced by surfactants[J]. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, 2014, 123, 326-330.
- [14] JESPER Bjerg C, GIUSEPPE D, HANNE Damgaard P, et al. Effect of pH and recombinant barley (Hordeum vulgare L.) endoprotease B2 on degradation of proteins in soaked barley [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, 62(34): 8562-8570.
- [15] DRAHER J, POUND V, REDDY T M. Validation of a rapid method of analysis using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for nitrogen-rich adulterants in nutritional food ingredients [J]. **Journal of Chromatography A**, 2014, 1373: 106-113.
- [16] DING X Z, YAO P. Soy protein/soy polysaccharide complex nanogels: folic acid loading, protection, and controlled delivery[J]. **Langmuir**, 2013, 29(27): 8636-8644.
- [17] LIU D S, WANG Y Y, YU Y, et al. Effects of enzymatic dephosphorylation on infant in vitro gastrointestinal digestibility of milk protein concentrate[J]. **Food Chemistry**, 2016, 197(Part A): 891-9.
- [18] NI Y, WEN L, WANG L, et al. Effect of temperature, calcium and protein concentration on aggregation of whey protein isolate: Formation of gel-like micro-particles[J]. **International Dairy Journal**, 2015, 51(1): 8-15.
- [19] YANG Y, LIU L, HUANG X, et al. Temperature-induced vesicle to micelle transition in cationic/cationic mixed surfactant systems[J]. **Soft Matter**, 2015, 11(45): 8848-8855.
- [20] WEN L J, LIU D S, HU J H, et al. Variation of insoluble calcium salts in protein adsorption and suspension stability when dispersed in sodium caseinate solutions[J]. **Food Hydrocolloids**, 2016, 52, 311-316.
- [21] 郭灵虹. 体内及体外磷酸钙与蛋白质生物材料相互作用[D]. 成都: 四川大学, 2002.
- [22] TERCINIER L, YE A Q, ANEMA S G, et al. Interactions of casein micelles with calcium phosphate particles [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, 62(25): 5983-5992.
- [23] ZHU X D, FAN H S, XIAO Y M, et al. Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo[J]. **Acta Biomaterialia**, 2009, 5(4): 1311-8.
- [24] VERTEGEL A A, SIEGEL R W, DORDICK J S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme[J]. **Langmuir**, 2004, 20(16): 6800-6807.
- [25] PAUL R, DAVID F, PERRY C C. Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2006, 128(12): 3939-3945.
- [26] ARIMA Y, IWATA H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers[J]. **Biomaterials**, 2007, 28(20): 3074-82.
- [27] FOX P F, BRODKORB A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance [J]. **International Dairy Journal**, 2008, 18(7): 677-684.