

9 种市售阿胶蛋白质特性比较分析

Comparison and analysis of the protein characteristics in 9 kinds of commercial Asini Corii Collas

常冰玉¹ 陈茂深¹ 郝向慧^{2,3}

CHANG Bing-yu¹ CHEN Mao-shen¹ HAO Xiang-hui^{2,3}
郭尚伟^{2,3} 麻建国¹ 钟芳¹

GUO Shang-wei^{2,3} MA Jian-guo¹ ZHONG Fang¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 东阿阿胶股份有限公司, 山东 聊城 252201;
3. 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252201)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2. Dong'e E-jiao Co., LTD, Liaocheng, Shandong 252201, China;
3. National Engineering Research Center for Gelatine TCM, Liaocheng, Shandong 252201, China)

摘要:对 9 种市售阿胶(E1~E9)进行蛋白质特性分析比较, 包括氨基酸组成、等电点、二级结构和分子量分布。结果表明, 9 种市售阿胶的蛋白质等电点均在 4.38~4.88, 无明显差异; 圆二色谱表明所有样品中蛋白质的三螺旋结构均被破坏, 呈无规则卷曲状态; 氨基酸组成大致相似, 而亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)组成有一定差异, E2、E3、E4、E9 的亚氨基酸含量较低, 小于 23.8%, 其余 5 种样品的含量较高, 大于 25.0%; 蛋白质分子量分布有较大差异, E2、E4、E7、E8 的阿胶蛋白质分布更分散, 含有较多的高分子蛋白(占比>4.46%), 且主要蛋白质的重均分子量较大, 为 120~132 kD, 而其余 5 种样品的分子量分布较集中, 高分子蛋白占比小于 1.16%, 且主要蛋白质的重均分子量较小, 为 36~42 kD。市售阿胶的蛋白质差异主要是蛋白质的降解程度不同造成的。阿胶差异化评价的蛋白质特性评价, 为进一步考察工艺对蛋白质特性的影响提供依据。

关键词: 阿胶; 氨基酸; 分子量分布; 蛋白质特性

Abstract: The protein characteristics of 9 kinds of commercial Asini Corri Collas (ACC, E1—E9) were compared, including amino acid composition, pI, secondary structure and molecular weight distribution. The differences of pI were negligible and all samples showed a range of 4.38—4.88. Circular dichroism results indicated that only random coil configurations was observed of all ACC samples due to

the damage of triple helix structures. The amino acid composition was similar other than some differences in imino acid (Pro and Hyp) composition. E2, E3, E4 and E9 showed lower imino acid content (<23.80%) than that of others (>25.0%). Significant differences in the molecular weight distribution were observed. E2, E4, E7 and E8 appeared to be in a wider distribution containing more high molecular weight (>4.46%) and the major MW fraction was located in the range of 120—132 kD. The other 5 samples, however, showed a narrower distribution (high molecular weight protein <1.16%) and the major MW fraction was located in the range of 36—42 kD. The difference in protein characteristics of commercial ACC attributed to the differences in degradation degree of protein. This study would improve the protein characteristics evaluation system of ACC and lay a foundation to further study the effect of processing on protein characteristics.

Keywords: Asini Corri Collas; amino acid; molecular weight distribution; protein characteristics

阿胶(Asini Corri Collas, ACC)与人参、鹿茸并称“中药三宝”, 是中国传统名贵中药, 有滋阴补血、润燥止血的功效^[1]。针对阿胶的药理作用机制, 研究人员作了很多研究。通过分析阿胶的主要成分发现其中含有丰富的氨基酸和微量元素^[2], 为人体提供必要的营养物质; 还有研究发现阿胶中含有较多的羧基、硫酸酯基、硫酸基等负电荷, 可形成聚负离子基结构, 电泳时偏向阳极^[3], 每个分子可形成一个稳定的大分子晶体结构, 使其不必进入细胞内部, 仅通过细胞外间质的代谢来调节细胞功能, 参与生理与病理过程^[4]。

作者简介: 常冰玉, 女, 江南大学在读硕士研究生。
通讯作者: 钟芳(1972—), 女, 江南大学教授, 博士生导师。
E-mail: fzhong@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-03-15

阿胶的主要成分有蛋白质、氨基酸及微量元素,还有硫酸皮肤素等多糖类物质。其中,蛋白质类含量约为 60%~85%,是阿胶的主要成分^[5]。多肽和氨基酸主要是在制胶过程中胶原蛋白部分肽键断裂所形成的一系列降解产物^[6]。阿胶补血补益作用的物质基础与阿胶中蛋白质类物质有密切关系,研究阿胶中蛋白质、多肽的特性和结构尤为重要。如今,对阿胶蛋白质的特性已有一定的研究,李峰等^[7]对阿胶和其它动物胶进行了 SDS-PAGE 分析,得出了阿胶蛋白质各电泳谱带的泳动率 Rf 值;陈振江等^[8]采用 IFE 法测定出阿胶及其伪品中几种主要蛋白质的等电点在 4.15~4.80。这些研究多侧重于真伪鉴别和阿胶与其它动物胶的对比,没有对阿胶蛋白质的特性进行系统的研究,同时,尚未有对市售阿胶中蛋白质特性差异进行研究。

本研究从市场上收集了具有代表性的 9 种阿胶样品,拟对其蛋白质特性如氨基酸组成、等电点、二级结构和分子量分布进行详细的分析对比,从而揭示不同厂家所产阿胶的内在差别所在,对生产优质阿胶有一定的指导意义,补充完善现有的阿胶评价中蛋白质特性评价部分,并为下一步研究加工工艺对蛋白质特性的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样品 E1~E9:9 种市售某品牌阿胶;
牛血清白蛋白、叠氮化钠、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯;
高效液相色谱仪:Agilent1260 型,美国安捷伦公司;
多角度激光散射凝胶色谱仪:DAWN HELEOS II 型,美国怀雅特技术公司;
圆二色光谱仪:MOS-450 型,法国 Biologic 公司;
Zeta 电位及纳米粒度分析仪:ZetaPALS 型,美国布鲁克海文仪器公司;
电子天平:AL204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 成分测定

- (1) 水分含量:直接干燥法^[9]。
- (2) 蛋白质含量:凯氏定氮法^[10]。

1.3 阿胶蛋白质的提纯

称取适量阿胶于热水中充分溶解,4 000 r/min 离心 10 min,加入预冷的无水乙醇至乙醇终浓度为 75%,4 ℃保存 1 h 后,于 4 ℃,5 000 r/min 条件下冷冻离心 15 min。去上清液,加入 25 mL 预冷的 75%乙醇,4 ℃保存 30 min,冷冻离心,去上清液,反复洗涤 3 次。沉淀物于通风橱挥尽酒精味后,水洗至培养皿中,冷冻干燥得蛋白提纯物^[11]。提纯后的阿胶蛋白中,蛋白含量均大于 94%,糖含量均小于 0.82%。该方法的蛋白提取率高于 85.31%,糖去除率高于 91.20%,提取出的蛋白可以代表阿胶中的主要蛋白。

1.4 阿胶蛋白的氨基酸组成分析

精密称取提纯物放入水解管中,加入 8 mL 盐酸溶液(6 mol/L)和 2 滴辛醇,将水解管抽真空密封,于 110 ℃烘箱

中水解 21 h。取出冷却后定容至 25 mL,过滤。吸取 1 mL 滤液放入烧杯中,置于含有氢氧化钠的干燥器中 50 ℃保温过夜。加入 1 mL 盐酸溶液(0.02 mol/L),混匀,离心,将上清液转移至样品瓶中待测^[12]。

采用 OPA-PMOC 柱前衍生化分析方法。色谱条件:色谱柱 250 mm×4.6 mm,5 μm;柱温:40 ℃;流动相:A 相,称取 8.0 g 结晶乙酸钠于 1 000 mL 烧杯中,加入 1 000 mL 开水搅拌至所有结晶溶解,再加 225 μL 三乙胺,搅拌并加 5%的醋酸,调 pH 7.2,加入 5 mL 四氢呋喃,混合后备用;B 相,称取 8.0 g 结晶乙酸钠于 800 mL 烧杯中,加入 400 mL 开水搅拌至所有结晶溶解,滴加 2%的醋酸,pH 调至 7.2,将此溶液加入 800 mL 乙腈和 800 mL 甲醇备用;流速:1.0 mL/min;紫外检测器:262 nm(脯氨酸和羟脯氨酸),338 nm(其余氨基酸);梯度洗脱^[13]。

1.5 阿胶蛋白的等电点分析

阿胶蛋白质等电点的测定根据 Nalinanon 等^[14]的方法修改如下:称取提纯物加水溶解后配制成 0.4 mg/mL 溶液,用 0.02 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节 pH,每隔 0.5 个 pH 取样,测定其 Zeta 电位。

1.6 阿胶蛋白的二级结构分析

采用圆二色光谱仪对样品进行圆二色谱分析。称取提纯物加水溶解后配制成 1 mg/mL 的溶液,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液供试。样品吸收池光程为 0.01 cm,谱带宽度:1 nm;测定范围:180~300 nm;扫描波长间隔:0.1 nm;每点响应时间:1 s;每个供试品重复测定 3 次;测定温度:室温。

1.7 阿胶蛋白的分子量分析

采用多角度激光光散射凝胶色谱系统(HPSEC-RI-MALLS)测定阿胶蛋白质分子量分布。流动相采用含 0.15 mol/L 氯化钠的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0,含 0.02%叠氮化钠);流速为 0.35 mL/min,紫外检测器波长选用 220 nm。用牛血清白蛋白($M_w=77$ kDa)校准仪器。

称取适量提纯物粉溶解于流动相,配制成 1 mg/mL 的样品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜后进行 HPSEC-RI-MALLS 分析。采用 ASTRA 软件进行数据处理。 dn/dc 值取 0.185^[15]。

1.8 数据分析

使用 SPSS 19.0 和 Origin 8.5 软件进行数据分析,显著性分析采用最小显著差法(LSD)检验, $P\leq 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 阿胶蛋白质含量分析对比

阿胶的蛋白质含量可由氮含量乘以换算系数而计算出,驴皮的换算系数取 5.55。市售阿胶的蛋白质含量见表 1。9 种阿胶的蛋白质含量在 72.15%~89.44%,含量很高,与赵曦等^[16]的研究结果类似。

2.2 阿胶蛋白的氨基酸组成分析

对提取后的阿胶蛋白质的氨基酸组成进行分析,结果见表 2。共检测出阿胶蛋白质中含有 17 种氨基酸,含 7 种必需

表 1 不同阿胶蛋白质含量
Table 1 Protein cotent of ACC

样品	蛋白质/%	样品	蛋白质/%
E1	77.82±0.15	E6	89.44±0.65
E2	72.15±0.09	E7	82.80±0.32
E3	75.74±0.15	E8	80.55±1.11
E4	82.50±1.65	E9	82.83±0.53
E5	85.34±2.04		

表 2 不同阿胶氨基酸组成[†]
Table 2 The acid amino composition of ACC

氨基酸	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
天冬氨酸	57	57	58	59	56	55	59	55	59
谷氨酸	112	115	114	122	113	114	116	131	116
丝氨酸	27	31	31	29	27	27	28	31	31
组氨酸	7	8	7	8	6	4	8	6	7
甘氨酸	216	224	225	223	217	222	217	216	215
苏氨酸	19	20	20	19	16	13	19	16	20
精氨酸	72	75	79	69	74	75	70	64	77
丙氨酸	86	88	88	89	86	87	88	85	85
酪氨酸	7	7	7	9	9	8	9	8	8
缬氨酸	25	27	27	26	24	23	25	26	27
甲硫氨酸	9	8	8	10	9	10	10	8	8
苯丙氨酸	21	21	22	22	22	20	21	21	22
异亮氨酸	16	16	16	18	17	16	17	16	16
亮氨酸	31	32	33	35	34	33	33	34	34
赖氨酸	33	35	39	32	34	34	33	31	38
脯氨酸	143	110	110	109	134	127	124	138	126
羟脯氨酸	118	127	116	121	121	131	122	113	112
亚氨基酸	261	237	226	230	255	258	246	251	238

[†] 每 1 000 个氨基酸残基含有的氨基酸残基数;亚氨基酸为脯氨酸和羟脯氨酸之和。

氨基酸。阿胶属于胶原蛋白水解产物,不含色氨酸、半胱氨酸。所有样品中,以甘氨酸含量最高,占总氨基酸含量的 21.5%~22.5%,其次为谷氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、丙氨酸和精氨酸,以上 6 种氨基酸为阿胶中主要氨基酸,占氨基酸总量的 70%以上,与已有的报道^[17]一致。分析对比 9 种阿胶蛋白质的氨基酸组成差异,可以发现大多数阿胶蛋白质的组成非常接近,但亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)的组成有一定的差异。据报道^[18],亚氨基酸是胶原蛋白中起到稳定三螺旋结构的重要氨基酸,而降解程度过大会导致亚氨基酸较多地释放。因此,亚氨基酸含量较低的样品可能与驴皮中胶原蛋白的降解程度有关。

2.3 阿胶蛋白的等电点分析

Zeta 电位是描述胶粒表面电荷性质的一个物理量,它是距离胶粒表面一定距离处的电位。若胶粒表面带有某种电荷,其表面就会吸附相反符号的电荷,构成双电层^[19]。在滑动面处产生的动电电位叫做 Zeta 电位。在溶液 pH<等电点(pI)时,由于可电离氨基酸的增加,胶粒表现为带正电荷;

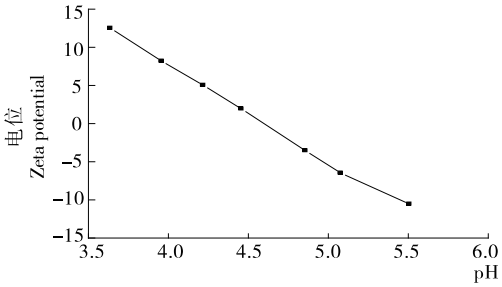


图 1 阿胶蛋白溶液(E9)在不同 pH 下的 Zeta 电位
Figure 1 Zeta potential of the ACC protein solution (E9) at different pH values

pH>pI 时,胶粒表面所带电荷为负;当 pH=pI 时,胶粒表面上的正电荷数与固定层吸附的负离子数相等,Zeta 电位为零,可以求得此时溶液的 pH 值,即为溶液的 pI。

阿胶蛋白溶液在不同 pH 下的 Zeta 电位曲线见图 1(以 E9 为例),可以求得其 Zeta 电位为零时的 pI 值。各样品的等电点值见表 3。

表 3 不同阿胶蛋白溶液的等电点
Figure 3 Isoelectric point of ACC protein

样品	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
pI	4.46	4.88	4.54	4.38	4.43	4.51	4.64	4.52	4.61

结果表明,所有样品的 pI 在 4.38~4.88。由于胶原蛋白的 pI 在 4.8 左右,水解的进行使酰胺键断裂,羧基释放,从而使阿胶的 pI 略微下降^[20]。但是由于阿胶的制作工艺均是胶原蛋白的热裂解,因此所有样品的 pI 相差很小,仅相差 0.5,与安广杰等^[21]的研究结果类似。

2.4 阿胶蛋白的二级结构分析

圆二色谱(CD)通常被用来研究蛋白分子的空间构象。一般分为远紫外区(190~250 nm)与近紫外区(250~500 nm),远紫外区反映的是主链构象,属于肽键的吸收,常被用来表征蛋白的二级结构信息;而近紫外区则主要反映蛋白的三级结构信息^[22]。

阿胶蛋白质的远紫外区圆二色谱图见图 2(以 E1 为例),其余样品的圆二色谱图与 E1 相似,均在 190 nm 左右有一大的负峰,在 220 nm 左右处几乎无峰或仅有微弱的小峰。天然胶原蛋白具有三螺旋结构,其圆二色谱特征是在 190~200 nm 左右有一个强的负吸收峰,在 210~230 nm 时有一个弱的正吸收峰。而所有阿胶蛋白样品的圆二色谱图在 220 nm 左右处几乎无峰或仅有微弱的小峰。阿胶中蛋白质经过工艺中的化皮、熬煮处理,其三螺旋结构已被破坏或仅有极少量的三螺旋结构,表明市售阿胶中的蛋白质构象无差异,均呈现无规则卷曲的状态。

2.5 阿胶蛋白的分子量分布

各个样品的分子量分布见图 3。由图 3 可知,各个样品的分子量分布曲线有较大差异,为方便对比样品,将洗脱曲线分为三部分,分别为 20~25 min 高分子量区域,25~32 min 中分子量区域和 32~37 min 低分子量区域,并用 AS-

TRA 软件计算出各区域的重均分子量和所占比例,见表 4。由图 3 中各样品的流出曲线可知,阿胶中的蛋白质分子量为连续分布,集中在中分子量区域(占比为 82.37%~98.02%),各样品的重均分子量为 37~132 kDa。各样品的蛋白质重均分子量和分子量分布有较大差异。

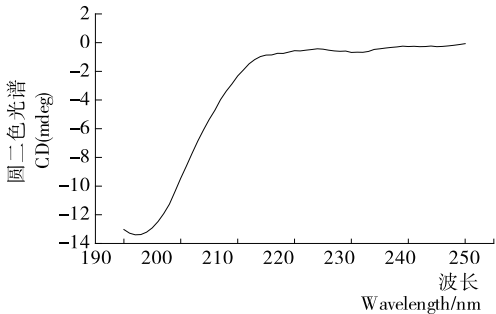


图 2 阿胶蛋白质(E1)的圆二色谱图

Figure 2 CD spectra of ACC protein (E1)

表 4 不同阿胶蛋白质各区域相对分子质量及所占比例

Table 4 The molecular weight and the proportion of each region

样品名	高分子量区域		中分子量区域		低分子量区域	
	Mw/kD	占比/%	Mw/kD	占比/%	Mw/kD	占比/%
E1	2 137	0.82	42	96.08	36	3.10
E2	4 705	5.14	128	82.37	61	12.50
E3	3 942	0.25	38	91.42	46	8.32
E4	4 260	7.45	132	87.01	89	5.54
E5	3 299	1.16	37	87.50	22	11.34
E6	4 772	0.49	36	94.16	29	5.35
E7	3 070	4.46	120	85.15	33	10.39
E8	4 169	5.56	130	90.85	173	3.59
E9	7 815	0.16	36	98.02	33	1.82

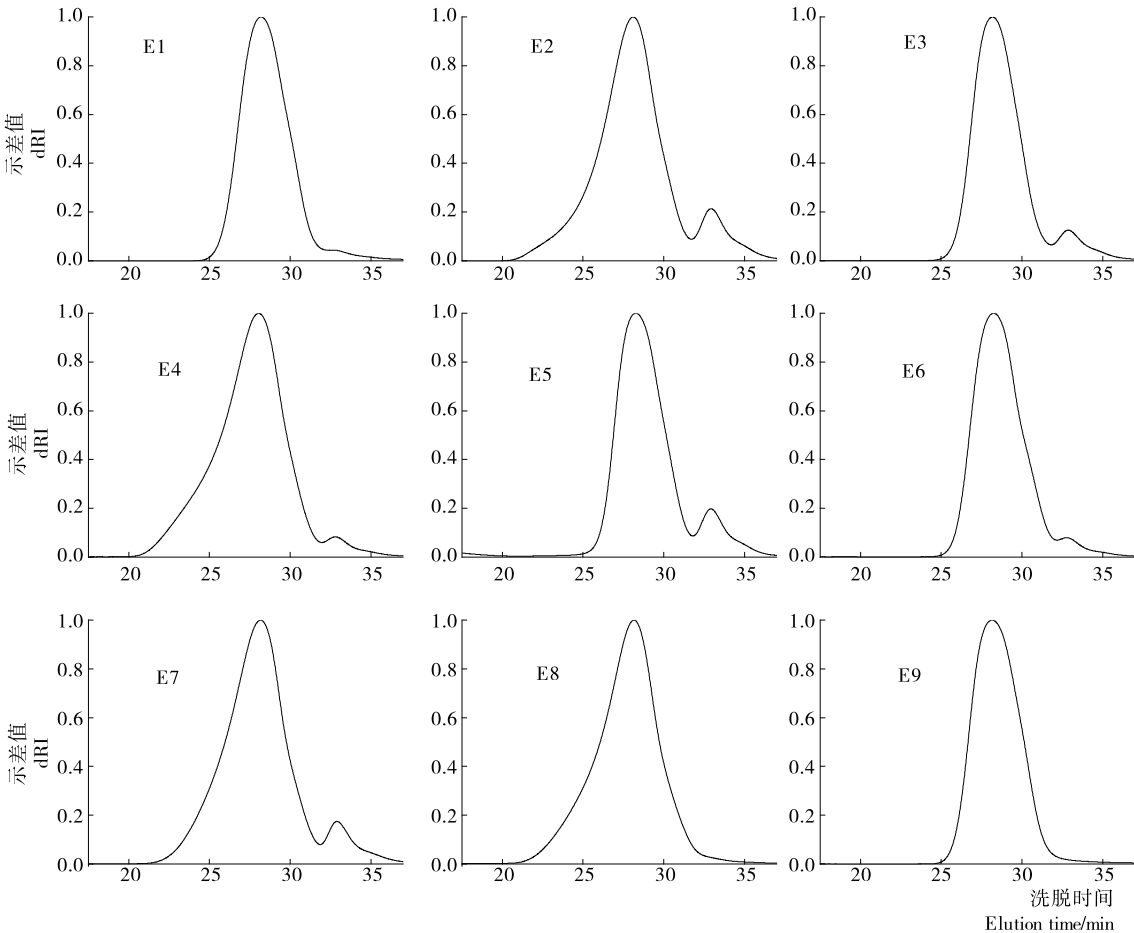


图 3 不同阿胶蛋白质分子量分布

Figure 3 Distribution of molecular weight of ACC protein

由表 4 可以得出,各样品的中分子量区域的重均分子量有较大差异,其中,E2、E4、E7、E8 的重均分子量较大(为 120~132 kDa),其余样品的重均分子量较小(为 37~42 kDa)。

由图 3 可以看出,各样品的分子量分布有较大差异。可

以将所有样品分为 4 类,第一类为 E1、E9,仅中分子量区域有一个较窄的大峰,表明这类样品的蛋白质分子量分布很集中,集中在中分子量区域,占比达 96%以上;第二类为 E3、E5、E6,这类样品的分子量分布曲线除了有一个中分子量区域的较窄大峰外,在低分子量区域还有一个小峰,其蛋白质

在高分子量区域分布很少,在低分子量区域的分布较多(占比为 5.35%~11.34%);第三类为 E8,分子量分布曲线为一个较宽的大峰,呈现出明显的前沿峰,分子量分布较分散,蛋白质在分子量区域有分布(占比为 5.56%);第四类为 E2、E4、E7,这类样品的分子量分布曲线除了有一个较宽的大峰之外,在小分子量区域还有一个小峰,分子量分布较分散,这类样品在分子量区域有少量分布(占比为 4.46%~7.45%),在低分子区域也有分布(占比为 5.54%~12.50%)。

阿胶生产过程是胶原降解的过程,降解条件的强弱和时间长短直接影响了阿胶分子量分布^[23]。降解不充分可能导致高分子量蛋白的残留,而降解程度过大可能导致产生较多的低分子量蛋白。第二类样品在大峰之后又出现一个小峰,存在少部分低分子量蛋白质,可能是降解程度较大导致的,第三类样品呈现出前沿峰,存在大分子量蛋白质,可能是降解程度小导致的。第四类样品有前沿峰,且在大峰后出现一个小峰,表明同时存在大分子量和低分子量蛋白,则可能是降解条件较为剧烈,产生了较多的低分子量蛋白,但作用时间又较短,使得大分子量蛋白质有一定的残留。第一类样品的分子量分布集中,可能与其降解条件适中有关。合适的降解程度是生产高质量阿胶的重要保证,降解驴皮的程度和条件是未来阿胶研究的重要方向。

3 结论

对市售的 9 种阿胶进行蛋白质特性分析。通过测定 Zeta 电位计算出阿胶蛋白的等电点,发现 9 种市售阿胶的蛋白质等电点无明显差异。圆二色谱图显示 9 种阿胶蛋白的二级结构均呈现无规则卷曲状态,在加工过程中蛋白质的三螺旋结构被破坏。氨基酸结果显示,共检测到 17 种氨基酸,其中 15 种氨基酸组成接近,而亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)的组成上有一定的差异,这与加工过程中的过度降解有关。HPSEC-RI-MALLS 结果表明,蛋白质分子量大小和分子量分布有较大差异,有 4 种阿胶的蛋白质分布较为分散,呈现出明显的前沿峰,存在较多的高分子蛋白质,可能与降解不充分有关。因此,市售阿胶的蛋白质差异主要是驴皮中蛋白质降解程度的不同造成的。本研究补充完善了现有的阿胶差异化鉴别的蛋白质特性部分,可为进一步考察工艺条件对蛋白质降解程度的影响提供依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

[2] 王京娥, 杨福安. 阿胶作用机理的研究[J]. 中医药学报, 1991(1): 43-46.

[3] 王龙, 张晓华, 吴祖道. 六种补胶的比较研究[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(1): 46.

[4] IVATT R. The biology of glycoproteins[M]. Philadelphia: Plenum Press, 2013: 211.

[5] 刘更生. 阿胶与阿胶文化[C]// 王群. 第十二届全国中医药文化学术研讨会论文集. 庐山: 中医药文化, 2009: 50-51.

[6] 祁天寿, 刘丹卓. 阿胶近十年药理研究进展[C]// 张柏礼. 第十

一次全国中医妇科学术大会论文集. 郑州: 中医杂志, 2011: 359-361.

[7] 李峰, 韩家珩. 阿胶的凝胶电泳鉴别[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(5): 346-347.

[8] 陈振江, 刘静芬. 阿胶及其伪品的 IFE 研究[J]. 中成药, 1998, 20(12): 31-32.

[9] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.3—2010 食品中水分含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[10] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[11] 周国海, 张泳, 赵力超, 等. 蛹虫草多糖提取纯化工艺研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 220-224.

[12] 商文慧, 朱祉默, 孙世广, 等. 海参体壁胶原纤维简化制备方法及其特性分析[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 41-44.

[13] 李超. 犬粮诱食剂的制备及其应用效果评价[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 26.

[14] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 500-507.

[15] CORREDIG M, WICKER L. Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(1): 17-23.

[16] 赵曦, 仲平. 30 种商品阿胶的质量比较[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(10): 690-692.

[17] 霍光华. 阿胶氨基酸矿物成分分析与评价[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(4): 22-24.

[18] MOURAD Jridi, RIM Nasri, IMEN Lassoued, et al. Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 881-889.

[19] 沈钟, 赵振国, 王果庭. 胶体与表面化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991: 57.

[20] DE MORAES MC, CUNHA RL. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values[J]. Food Research International, 2013, 50(1): 213-223.

[21] 安广杰, 胡加松, 王章存, 等. 双酶法制备水解明胶[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 209-213.

[22] PELTON JT, MCLEAN LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure [J]. Analytical Biochemistry, 2000, 277(2): 167-176.

[23] 张贵锋, 刘涛, 王前. 阿胶生产工艺中胶原蛋白降解过程研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1 211-1 215.