

河蚬抗氧化肽—锌螯合物的制备及结构表征

Preparation and structural characterization of Zinc-binding antioxidant peptides from *Corbicula fluminea* hydrolysate

刘晶晶

徐蕴桃

朱晨慧

黄倩倩

LIU Jing-jing

XU Yun-tao

ZHU Chen-hui

HUANG Qian-qian

韩曜平

王雪峰

张 然

戴阳军

HAN Yao-ping

WANG Xue-feng

ZHANG Ran

DAI Yang-jun

(常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

(Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500, China)

摘要:以河蚬肉为蛋白源,添加中性蛋白酶进行酶解,采用葡聚糖凝胶 G-50 分离纯化得抗氧化肽,根据螯合最佳工艺制备抗氧化肽—锌螯合物,采用茚三酮法和硫化钠法对螯合产物进行定性分析,并通过紫外、红外、荧光光谱、X 射线衍射和扫描电镜对产物结构进行分析。结果表明:所得螯合产物是一种抗氧化肽—锌螯合物;抗氧化肽中的羧基、氨基及酰胺键均参与了螯合反应,反应前后肽结构发生了显著变化;根据已得图谱分析可初步预测河蚬抗氧化肽—锌螯合物的结构。

关键词:河蚬;抗氧化肽;锌;制备;结构表征

Abstract: Using clam meat as protein source, the hydrolysate was obtained by enzymehydrolysis with neutral protease. Antioxidant peptides were then separated and purified from the enzymatic-hydrolysate of *Corbicula fluminea* by using glucose gel G-50. Zinc-binding antioxidant peptides were prepared according to optimal process. Qualitative analysis of chelate products was carried out by ninhydrin method and sodium sulfide method. Ultraviolet spectra, Fourier infrared and fluorescent light spectra, X-radiation diffraction and scanning electron microscopy were applied to predict the structure of the chelate products. The results showed that the product powder is a kind of polypeptide zinc chelate. The carboxyl, amino and amide bonds of the polypeptide all participate in the chelation reaction, and the structure of the peptide changed significantly after the reaction. The structure of the

antioxidant peptide-zinc chelate from *Corbicula fluminea* can be deduced preliminarily by analysis data.

Keywords: *Corbicula fluminea*; antioxidant peptide; Zinc; preparation; structure characterization

河蚬(*Corbicula fluminea*),一种常见的软体动物,别名黄蚬、沙蚬等,原产于亚洲,主要栖居于淡水(或咸淡水)河、湖和入海口处。河蚬营养价值高,干样粗蛋白高达 60% 左右,粗脂肪约为 10.91%^[1],其中糖蛋白、金属硫蛋白等具有预防肿瘤、氧化和调节免疫等功能;含有 17 种氨基酸,其中必需氨基酸占总氨基酸的 39%;此外,还富含 EPA、DHA 及大量活性多糖物质,能有效对抗心血管疾病、增强机体免疫^[2],为保健类产品的优质原材料,其药用和食疗价值引起了越来越多国内外学者的关注。

锌作为一种人体必不可少的微量元素,与动物的感官功能和记忆有关,全球约 25% 的人存在缺锌问题^[3-4]。研究^[5]表明,多肽—锌螯合物可经肽消化吸收通路将锌元素输往血液,更利于机体利用,可弥补传统锌制剂利用率低和生物毒性高的不足,与氨基酸锌相比,其吸收更快,能耗更少。

近年来,有关抗氧化肽金属螯合物方面的研究多集中于螯合工艺条件优化及抗氧化性测定,关于螯合产物结构的研究相对较少,相关的研究^[6-7]缺少对螯合原料多肽的纯化,无法确保螯合原料的纯度,对螯合产物的结构分析也不够全面。试验拟以河蚬为原料,制备抗氧化肽—锌螯合物,采用多种光谱分析河蚬抗氧化肽螯合锌的结构性质,为抗氧化肽金属螯合物的构效关系及实际应用提供依据。

基金项目:江苏省苏州市应用基础研究计划项目(编号: SNG2017043)

作者简介:刘晶晶(1978—),女,常熟理工学院副教授,硕士。

E-mail: lj@csit.edu.cn。

收稿日期:2019-06-10

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

速冻河蚬肉:江苏省宿迁楠景水产品有限公司;
中性蛋白酶:分析纯,上海蓝季生物有限公司;
葡聚糖凝胶 G-50:上海蓝季科技发展有限公司;
双硫脲、三氯乙酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

七水合硫酸锌、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水合茚三酮:分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司;

三氯化铁、硫化钠、铁氰化钾:分析纯,天津致远化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

分析天平:EL104 型,梅特勒—托利多仪器制造有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-2 型,金坛市杰瑞尔电器有限公司;

高速组织捣碎机:上海市比朗仪器制造有限公司;

超低温冰箱:BCD-216TDXZA 型,青岛市海尔电器股份有限公司;

台式冷冻干燥机:Alpha 1-2 LDplus 型,博励行仪器有限公司;

高速台式冷冻离心机:TGL-16M 型,长沙市湘仪有限责任公司;

数字 pH 计:pHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

集热式恒温磁力搅拌器:DF-101B 型,金坛市医疗仪器厂;

自动部分收集器:BSZ-30 型,上海沪西分析仪器厂;

紫外分光光度计:UV-754 型,上海市精密科学仪器制造有限责任公司;

紫外—可见分光光度计:Cary300 型,美国安捷伦公司;

傅立叶红外光谱仪:Nicolet iS10 型,美国赛默飞世尔科技公司;

荧光分光光度计:F-7000 型,日本日立公司;

X 射线衍射仪:D/max-2200/pc 型,日本理学公司;

热场发射电镜扫描仪:ZEISS SIGMA 型,德国卡尔蔡司。

1.2 试验方法

1.2.1 河蚬抗氧化肽的制备

(1) 河蚬肉酶解液粉末的制备:将速冻河蚬肉解冻清洗,挤干称重,加入 2 倍质量的蒸馏水,捣碎搅匀。按河蚬肉质量的 3.76% 添加中性蛋白酶,55.36 °C 酶解 4 h^[8],100 °C 水浴灭酶 20 min,冷却后,4 000 r/min 离心 30 min,取上层清液,冷冻干燥,粉碎,冷藏待用。

(2) 河蚬抗氧化肽的分离纯化:根据文献[9]的方法稍作修改。取适量河蚬肉酶解液粉末,配成浓度为 50 mg/mL 样液,4 000 r/min 离心 30 min,采用葡聚糖凝胶 G-50 对上清液进行分离。上样量 2 mL,蒸馏水作洗脱液,由自动收集器每 5 min 收集一管,样品流速 0.5 mL/min,共集 400 管,测定收集液的吸光度值。根据吸光度值合并相同分离峰的洗脱液,干燥成粉末,冷藏待测。

(3) 各组分总抗氧化性的测定:称取分离后各个分离峰的酶解液粉末,分别配成 50 mg/mL 的溶液。量取 1 mL 各样液于试管中,分别加入 0.2 mol/L (pH=6.6) PBS 溶液和 1% 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液各 1 mL,于 50 °C 水浴 20 min,添加质量分数 10% 的三氯乙酸溶液 1 mL,1 000 r/min 离心 4 min。取上清液 1 mL,分别加入蒸馏水 1 mL 和 0.1% 的三氯化铁溶液 0.2 mL,振荡摇匀,50 °C 水浴 10 min,溶液渐渐由黄变蓝^[10-11],于 700 nm 处测定其吸光值。蒸馏水代替样品作空白组。

1.2.2 河蚬抗氧化肽—锌螯合物的制备 称取一定量的抗氧化肽冻干粉末,配成 20 mg/mL 的溶液,充分搅匀,按肽锌质量比 2.18:1 加入一定量的硫酸锌溶液,调节 pH 至 5.07,52.65 °C 下反应 46.50 min^[12],冷却,4 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,用 80% 乙醇进行洗涤再离心,反复数次,上清液中分别加入双硫脲和水合茚三酮(检测溶液中的游离锌离子和抗氧化肽)直至不变色。沉淀冷冻干燥备用。

1.2.3 河蚬抗氧化肽—锌螯合物的定性检测 根据文献[13]略作修改。称取少量反应产物冻干粉,蒸馏水溶解,滴入 5 滴茚三酮指示剂,加热煮沸 3 min,观察是否发生颜色变化。取适量反应产物冻干粉配成溶液,添加过量的硫化钠粉末,放置 5 min,若有沉淀生成,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,滴 5 滴水合茚三酮指示剂,沸腾 3 min,观察是否出现颜色变化。

1.2.4 河蚬抗氧化肽—锌螯合物的结构表征 根据文献[6,14]的方法并稍作修改。

(1) 紫外—可见光光谱分析:将制备好的抗氧化肽—锌螯合物配制成 0.1 mg/mL 溶液,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液放入扫描室,设置波长 190~400 nm 进行扫描分析。并在相同条件下对参加反应的抗氧化肽进行处理,作为对照组。

(2) 红外光谱分析:称取螯合物粉末 2 mg,加入适量的色谱级 KBr,研磨,烘干。取少量研磨后的粉末进行压片并置于样品槽中,4 000~500 cm^{-1} 内扫描。并在相同条件下对参与螯合反应的抗氧化肽进行处理,作为对照组。

(3) 荧光光谱分析:分别称取适量的抗氧化肽与抗氧化肽—锌螯合物,配制成 1 mg/mL 的溶液,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液用于检测。蒸馏水作对照,设激发波长 280 nm,室温条件下测定两种样品在 320~520 nm 处的发射光谱。

(4) X 射线衍射分析:取适量抗氧化肽—锌螯合物研磨至直径 $<10\ \mu\text{m}$,填入样品槽中,铺压成平整试片,设置仪器参数为加速电压 40 kV,扫描范围 $(2\theta)5^\circ\sim 90^\circ$,扫描速度 $4^\circ/\text{min}$ 。并在相同条件下对参与螯合反应的抗氧化肽粉末进行预处理并扫描。

(5) 扫描电镜分析:用牙签挑取少量抗氧化肽和抗氧化肽—锌螯合物粉末,均匀涂至贴有黑色双面胶的载样板上,再于喷金装置内喷金。将预处理好的样品进行扫描,扫描电镜工作电压 5 kV,3 000 $\times$ 获得图像。

1.3 数据处理

采用 Excel 记录和汇总试验数据,采用 Excel 和 Origin 7.0 软件进行制图分析。

2 结果与分析

2.1 河蚬抗氧化肽的分离纯化

2.1.1 葡聚糖凝胶 G-50 分离河蚬肉酶解液 由图 1 可知,河蚬肉酶解液经分离后共得到 5 个清晰的洗脱峰,按洗脱液出峰的顺序分别将其命名为 F1、F2、F3、F4、F5。

2.1.2 河蚬肉酶解液中抗氧化肽的总抗氧化性 由图 2 可知,5 个组分均具有抗氧化活性,组分 F2、F3 的总抗氧化性能高于其他 3 个组分的,700 nm 处的吸光值分别为 2.03,1.79。鲍鱼下脚料抗氧化肽最高抗氧化活性 $A_{700\text{ nm}}$

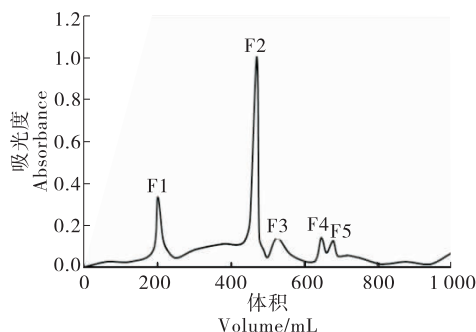


图 1 河蚬肉酶解液的 Sephadex G-50 洗脱曲线

Figure 1 Elution profile of enzymatic hydrolysates of *Corbicula fluminea* by Sephadex G-50 column

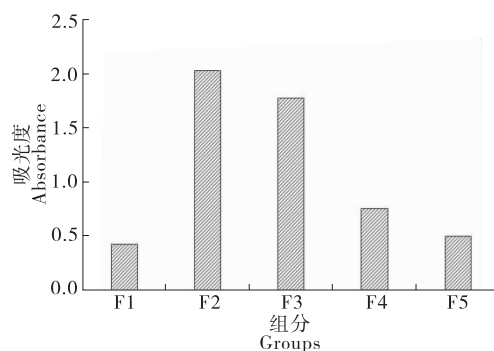


图 2 河蚬肉酶解液中抗氧化肽的总抗氧化活性

Figure 2 Antioxidant activity of *Corbicula fluminea* on enzymatic hydrolysates

为 $(0.598\pm 0.050)^{[15]}$,蟹抗氧化肽最高抗氧化活性 $A_{700\text{ nm}}$ 为 0.841^[16],说明河蚬肉酶解液抗氧化肽具有较高的研究价值。

2.2 抗氧化肽—锌螯合物的定性分析

研究^[17]表明,金属硫化物在一般情况下的稳定常数大于抗氧化肽金属螯合物的,当加入硫化钠时,常温下就可将抗氧化肽—锌螯合物中的锌离子置换,生成更稳定的硫化锌沉淀,原反应物中的抗氧化肽变成游离态。通过试验可知,抗氧化肽与锌的反应产物经水合茚三酮指示剂在煮沸情况下检测后未变色,无多余的游离抗氧化肽原料,说明螯合产物有一定的纯度。当添加过量的硫化钠粉末后,产生了沉淀,离心后上清液中滴加茚三酮试剂发生变色,表明上清液存在游离抗氧化肽,说明抗氧化肽与锌发生了螯合反应。综上,抗氧化肽与锌发生螯合且螯合反应得到了有一定纯度的螯合物粉末。

2.3 抗氧化肽—锌螯合物的结构表征

2.3.1 紫外光谱分析 由图 3 可知,抗氧化肽溶液最大吸光度对应的波长为 194.02 nm,属于抗氧化肽羰基和肽键的特征吸收峰。加入锌螯合后,抗氧化肽—锌螯合物吸收峰发生了变化,最大吸收峰接近 190 nm,与螯合前的差距 $>4\text{ nm}$,可能是锌离子与抗氧化肽螯合后改变了原有的基团结构,基团原子的价电子发生跃迁,最大吸光度对应的波长产生移动^[18],说明抗氧化肽与锌发生了螯合。

2.3.2 红外光谱分析 由图 4 可知,抗氧化肽的 $-\text{NH}_2$ 的吸收峰为 $3\ 386.34\text{ cm}^{-1}$,酰胺 I 带 $\text{C}=\text{O}$ 的特征峰为 $1\ 654.24\text{ cm}^{-1}$ ^[19], $-\text{COO}^-$ 的吸收峰为 $1\ 390.99\text{ cm}^{-1}$;与锌反应后, $-\text{NH}_2$ 的吸收峰为 $3\ 395.40\text{ cm}^{-1}$,酰胺 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰为 $1\ 654.94\text{ cm}^{-1}$, $-\text{COO}^-$ 的吸收峰为 $1\ 379.80\text{ cm}^{-1}$ 。氨基、羰基、羧基的特征峰发生了显著位移,说明肽链上的这些基团都参与了螯合反应,与锌离子发生了结合。

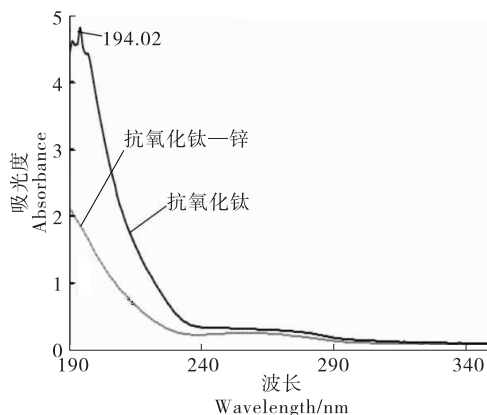


图 3 抗氧化肽—锌螯合物与抗氧化肽的紫外光谱

Figure 3 Comparative analysis of ultraviolet spectra of antioxidant peptide-Zinc chelate and antioxidant peptide

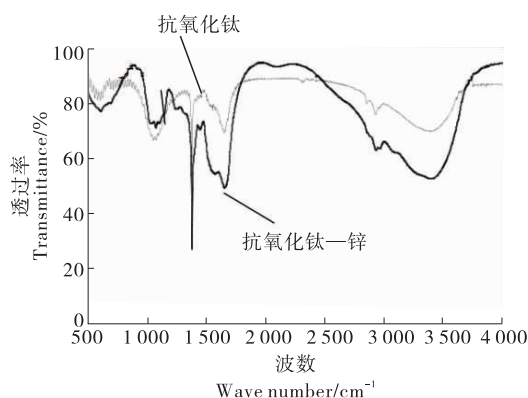


图4 抗氧化肽—锌螯合物与抗氧化肽的红外光谱

Figure 4 Comparative analysis of IR spectra of antioxidant peptide-Zinc chelate and antioxidant peptide

2.3.3 荧光光谱分析 由图5可知,河蚬抗氧化肽与锌螯合前后的荧光强度存在显著差异($P < 0.05$),螯合后的抗氧化肽分子中的荧光生色基团发生了结构上的变化,抗氧化肽中加入锌离子后图谱由1个强峰变为1个弱峰,说明锌离子与抗氧化肽发生了螯合反应,改变了原有结构。

2.3.4 X射线衍射光谱分析 由图6可知,抗氧化肽与抗

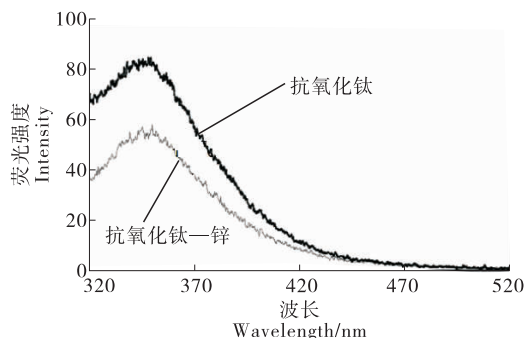


图5 抗氧化肽—锌螯合物与抗氧化肽的荧光光谱

Figure 5 Comparison of fluorescence spectra of antioxidant peptide-Zinc chelate and antioxidant peptide

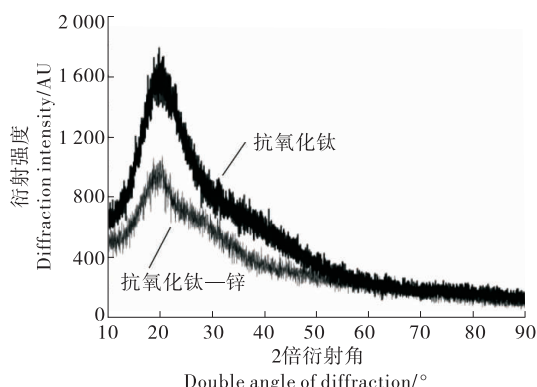
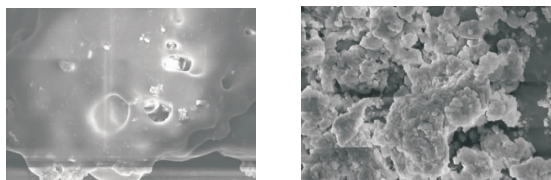


图6 抗氧化肽—锌螯合物与抗氧化肽的X射线衍射光谱

Figure 6 Comparative analysis of X-ray diffraction spectra of antioxidant peptide-Zinc chelate and antioxidant peptide

氧化肽螯合锌的衍射强度峰存在显著差异($P < 0.05$)表明抗氧化肽在螯合锌离子后,自身结构发生了一定改变。

2.3.5 电镜扫描结构分析 由图7可知,抗氧化肽表面更光滑且存在空洞,可能是抗氧化肽经冷冻干燥后留下的亲水区痕迹;抗氧化肽—锌螯合物表面更粗糙,存在许多颗粒结构物质(锌晶体)^[20],这些颗粒经电镜扫描电击后仍牢牢覆盖于肽表面,使原本光滑的肽面凹凸不平,说明锌与肽发生了相互作用且结合紧密,结构也变得更加复杂。



(a) 抗氧化肽

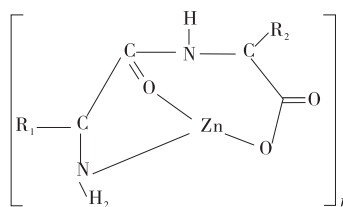
(b) 抗氧化肽—锌螯合物

图7 扫描电镜图

Figure 7 Scanning electron micrograph

3 结论

通过分离纯化和定性分析试验得到了有一定纯度的抗氧化肽—锌螯合物。螯合后的特征峰发生了显著的位移,说明抗氧化肽中的肽键参与了螯合;氨基($-NH_2$)、羧基($-COO^-$)和酰胺键(酰胺I带 $C=O$)的吸收峰发生了显著的位移,说明这3个基团都参与了螯合反应。荧光光谱图和X射线衍射图谱表明,抗氧化肽与锌螯合前后差异较大,说明螯合后的肽结构发生了变化。抗氧化肽—锌螯合物表面更粗糙,说明锌离子紧密结合到了抗氧化肽上。综上,初步预测抗氧化肽—锌螯合物的结构通式为:



由于制备的抗氧化肽—锌螯合物结构较为复杂,其具体结构及一些生物活性机理有待进一步探究,锌离子与各基团连接键的类型也有待进一步研究。

参考文献

- [1] 韩鹏,王勤,陈清西.河蚬软体部分营养成分分析及评价[J].厦门大学学报(自然科学版),2007(1):115-117.
- [2] 王宇,刘东红.河蚬功能性成分的研究现状与展望[J].食品与发酵工业,2010,36(6):122-124.
- [3] 葛淑华,刁岫,栾俊,等.蛋白质螯合金属研究进展及应用[J].皮革与化工,2018,35(2):21-25.

(下转第48页)

1%。藜麦水分检测的相对误差(绝对值)最小为 0.02%，最大为 14.58%，平均相对误差为 4.17%，测量时间小于 2 s。在检测高含水率样品时的部分结果误差很大，可能是由于温度从 5℃ 升至 40℃ 过程中水分蒸发以及检测模块杂散电容的干扰等因素导致。

5 结论

使用 LCR 仪研究了温度(5~40℃)、含水率(10.14%~29.55%)、测量频率(1~100 kHz)对藜麦电容的影响,建立了藜麦水分与电容、温度的多元回归模型,并以此为依据设计了藜麦水分快速检测仪。对设计的检测仪进行了性能评估试验,结果表明,检测值与标准值的平均相对误差为 4.17%,测量时间小于 2 s,检测仪具有一定的应用价值。为了提高仪器的检测精度及便携性,后续可采用铜箔作为电极材料。同时,还可增加屏蔽罩等屏蔽装置以增强仪器检测抗干扰能力,进一步完善检测仪。

参考文献

- [1] 魏爱春, 杨修仕, 么杨, 等. 藜麦营养成分及生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 272-276.
- [2] 张伟, 杨刚, 雷军波, 等. 基于微波反射法的谷物含水率在线检测装置研制[J]. 农业工程学报, 2019, 35(23): 21-28.
- [3] 黄操军, 田芳明. 粮食水分检测技术及发展趋势[J]. 农机化研究, 2006(12): 44-47.
- [4] 王兆华, 高敬阳, 董永贵. 一种基于有源电桥的电容式粮食水分传感器[J]. 传感器技术, 2005(11): 55-57.
- [5] 王婧. 小杂粮的介电特性与主要影响因素的关系研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012: 64-65.
- [6] 郭文川, 赵志翔, 杨沉陈. 基于介电特性的小杂粮含水率检测仪设计与试验[J]. 农业机械学报, 2013, 44(5): 188-193.
- [7] NOREÑA C P Z, LESCANO-ANADÓN E. Dielectric properties of importance in operations of post-harvest of sorghum[J]. International Journal of Food Engineering, 2017, 13(4): 369-375.
- [8] TANG Ju-ming. Dielectric properties of foods[J]. Microwave Processing of Foods, 2005, 3: 22-40.
- [9] 赵志翔. 基于介电特性的小杂粮含水率检测仪设计[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012: 37-38.
- [10] 胡佳, 李臻, 潘笑俊. 弥散场电容粮食水分传感器及其在储粮中的应用[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(11): 108-111.
- [11] 郭文川, 王婧, 朱新华. 基于介电特性的燕麦含水率预测[J]. 农业工程学报, 2012, 28(24): 272-279.
- [12] 郭文川, 王婧, 刘驰. 基于介电特性的薏米含水率检测方法[J]. 农业机械学报, 2012, 43(3): 113-117.
- [13] 张本华, 钱长钱, 焦晋康, 等. 基于介电特性与 SPA-SVR 算法的水稻含水率检测方法[J]. 农业工程学报, 2019, 35(18): 237-244.
- [14] LAWRENCE K C, NELSON S O. Radio-frequency density-independent moisture determination in wheat[J]. Transactions of the ASAE, 1993, 36(2): 477-483.
- [15] GUO Wen-chuan, TIWARI G, TANG Ju-ming, et al. Frequency, moisture and temperature-dependent dielectric properties of chickpea flour[J]. Biosystems Engineering, 2008, 101(2): 217-224.
- [16] 廖爱民. 根-土系统中水分动态监测的电容法研究[D]. 南京: 南京大学, 2015: 63-64.
- [17] 宋琦. 基于电阻抗谱分析的稻谷水分传感器设计[D]. 镇江: 江苏大学, 2017: 23.
- (上接第 31 页)
- [4] 鲍羽. 微量元素与人的健康[J]. 邵阳师范高等专科学校学报, 2015, 35(6): 16-19.
- [5] 王子怀, 胡晓, 李来好, 等. 肽-金属离子螯合物的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(8): 359-362.
- [6] 曾庆瑞, 钱文举, 王梦瑶, 等. 宽体金线蛭多肽-锌螯合物的制备及其结构表征[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 11-15.
- [7] 赵梓月, 王思远, 廖森泰, 等. 蚕蛹多肽螯合钙的制备工艺优化及结构表征[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 20-26.
- [8] 刘晶晶, 金林烽, 韩曜平, 等. 可控酶法制备河蚬抗氧化肽工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 222-225, 255.
- [9] 范建凤, 王泽南, 杨柯, 等. 蟹抗氧化肽的分离纯化及活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 48-51.
- [10] 刘杰, 万细妹, 徐明生. 河蚬酶解液体外抗氧化作用的研究[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1 093-1 096.
- [11] 吴燕燕, 尚军, 李来好, 等. 合浦珠母贝肉短肽的分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 123-126.
- [12] 刘晶晶, 徐蕴桃, 林秋逸, 等. 锌离子螯合修饰河蚬抗氧化肽的工艺研究[J]. 食品工业, 2019, 40(5): 148-152.
- [13] 俞园园. 类人胶原蛋白-铜螯合物的制备及相关性质研究[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(7): 29-32.
- [14] 高敏, 汪建明, 甄灵慧, 等. 牛骨多肽螯合物的制备及结构表征[J/OL]. 食品科学. [2019-12-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190311.1015.032.html>.
- [15] 梁杰, 赵晓旭, 汪秀妹, 等. 鲍鱼内脏蛋白的提取及水解肽的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 136-144.
- [16] 范建, 王泽南, 杨柯, 等. 蟹抗氧化肽的分离纯化及活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 48-51.
- [17] 刘丽莉. 牛骨降解菌的筛选及其发酵制备胶原多肽螯合钙的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 169.
- [18] YU Yuan-yuan, FAN Dai-di. Characterization of the complex of humanlike collagen with calcium[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 145(1): 33-38.
- [19] 肖珊, 黄立新, 赵璧秋. 乳清多肽螯合钙的制备与结构表征[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 253-257.
- [20] 付文雯. 牛骨胶原多肽螯合钙的制备及其结构表征[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 68-69.