

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.60107

# 食用酵素中肽含量的测定

刘泽亚<sup>1</sup> 赵冉<sup>1</sup> 李敏霞<sup>1</sup> 张洪臣<sup>2</sup> 康晓静<sup>3</sup> 戴军<sup>4</sup>

(1. 山东天衡检测有限公司, 山东 菏泽 274000; 2. 山东天欣生物科技有限公司, 山东 菏泽 274000; 3. 菏泽市生态环境局定陶区分局, 山东 菏泽 274000; 4. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** [目的] 准确测定食用酵素中的肽含量。[方法] 将样品首先用一定浓度的三氯乙酸(TCA)沉淀去除蛋白质大分子后,再参考GB 5009.124—2016和GB/T 30987—2020关于氨基酸测定的方法,应用氨基酸分析仪分别测定样品中总的水解氨基酸含量和游离氨基酸含量,由两者之差计得肽的含量。对于原料中含有胶原蛋白的阿胶松花粉酵素复合饮料样品,参考GB/T 30987—2020第一法,即以磺酸型阳离子交换柱和相应的流动相梯度洗脱等色谱条件,测定样品中包括羟脯氨酸的17种水解氨基酸含量和游离氨基酸含量。[结果] 在0.005~0.250 μmol/mL范围内,17种氨基酸的峰面积与其相应氨基酸浓度的线性相关系数( $r$ )均大于0.999,所有水解氨基酸和游离氨基酸含量测定的加标回收率均在95.1%~102.2%范围内,相对标准偏差(RSD)均小于5.39%。[结论] 该方法较简便且准确、重复性好,可以克服现有方法易受基质影响的问题,适用于食用酵素中肽含量的测定。

**关键词:** 食用酵素; 肽含量; 游离氨基酸; 水解氨基酸; 羟脯氨酸

## Determination of protein peptide content in edible Jiaosu

LIU Zeya<sup>1</sup> ZHAO Ran<sup>1</sup> LI Minxia<sup>1</sup> ZHANG Hongchen<sup>2</sup> KANG Xiaojing<sup>3</sup> DAI Jun<sup>4</sup>

(1. Shandong Tianheng Testing Co., Ltd., Heze, Shandong 274000, China; 2. Shandong Tianxin Biotechnology Co., Ltd., Heze, Shandong 274000, China; 3. Heze City Ecological Environment Bureau Dingtao District Branch, Heze, Shandong 274000, China; 4. Jiangnan University State Key Laboratory of Food Science and Resources, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to establish a method to determine the content of peptides in edible Jiaosu accurately. [Methods] After the sample was precipitated with a certain concentration of trichloroacetic acid (TCA) to remove protein macromolecules, the total hydrolyzed amino acid content and free amino acid content in the sample were determined by amino acid analyzer according to the two national standards GB 5009.124—2016 and GB/T 30987—2020 respectively. The peptide content is calculated by the difference between the two. For samples containing collagen protein in raw materials, refer to the first method of GB/T 30987, that is, the sulfonic acid type cation exchange lithium column and the corresponding mobile phase gradient and other chromatological conditions, to determine the 17 hydrolyzed amino acid content and free amino acid content including hydroxyproline and their total content in the sample. [Results] In the range of 0.005~0.250 μmol/mL, the linear correlation coefficients ( $r$ ) between the peak areas of 17 amino acids and their corresponding amino acid concentrations were greater than 0.999. The recoveries of all hydrolyzed amino acids and free amino acids were in the range of 95.1%~102.2%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 5.39%. [Conclusion] The method is simple, accurate and reproducible, and is suitable for the determination of peptide content in edible Jiaosu samples.

**Keywords:** edible Jiaosu; peptide content; free amino acid; hydrolyzed amino acid; hydroxyproline

食用酵素是以动物、植物、食用菌等为原料,添加或不添加辅料,经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分可供人类食用的产品<sup>[1]</sup>。食用酵素中对人体健康有益的生物活性物质主要有多酚<sup>[2-3]</sup>、黄酮类<sup>[4]</sup>、短链脂肪酸和低聚糖<sup>[5]</sup>、氨基酸和肽类<sup>[4-6]</sup>、益生菌及其代谢产物<sup>[6-9]</sup>等。由于生产食用酵素的原料中普遍含有一定量的植物源或

基金项目:国家十四五重点研发计划项目(编号:2022YFD2101504)

通信作者:戴军(1957—),男,江南大学研究员,博士。E-mail:daihplc@163.com

收稿日期:2023-10-11 改回日期:2024-04-07

动物源的蛋白质,故酵素产品中大多会含有蛋白质经发酵或酶解而产生的一定量的易被人体吸收利用且具有一定生物活性的肽类物质。为了研发具有较高生物活性的食用酵素产品,有效实施质量监控,有必要对产品中肽类等生物活性成分的含量进行定量分析和研究。目前关于食用酵素中肽类物质含量测定方法的研究尚未见报道,仅有肽类食品原料相关标准<sup>[10-11]</sup>中关于肽含量测定的方法,且均规定肽含量等于酸溶蛋白含量减去游离氨基酸含量。但酵素样品中酸溶蛋白测定易受到非蛋白氮的影响,而游离氨基酸含量检测则受到肽组分的干扰,故肽类食品原料相关标准中肽含量测定方法不适用于食用酵素中肽含量的测定。研究拟提出一种检测食用酵素产品中肽含量的新方法,并探讨生产酵素的原料对其产品中肽含量的影响,旨在为食用酵素产品的质量控制和提升及新产品的开发提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

7种食用酵素样品(样品1主要原料为阿胶蛋白、松花粉、蔬菜、水果、坚果、低聚果糖等,其他样品主要原料均为蔬菜、水果、坚果、益生元等);市售;

乙醇、盐酸、三氯醋酸、氢氧化钠、柠檬酸钠、柠檬酸锂;分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

茚三酮;西宝生物科技(上海)股份有限公司;

羟脯氨酸标品:含量99%,上海安谱瑾世标准技术服务有限公司;

天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸等16种氨基酸混标:浓度2.5 μmol/mL,西宝生物科技(上海)股份有限公司;

冷冻剂( $m_{\text{食盐}}:m_{\text{水}}=1:3$ ):自制。

### 1.2 主要仪器和设备

电子天平:AB104-N型,上海第二天平仪器厂;

电子天平:BT125D型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

全自动氨基酸分析仪:L-8900型,日本日立高新技术集团;

高速冷冻离心机:GL-20G II型,上海安亭科学仪器厂;

电热鼓风干燥箱:GZX-9246MBE型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

循环水式多用真空泵:SHZ-D(III)型,山东鼎科仪器仪表有限公司;

匀浆机:FJ200-SH型,上海标本模型厂。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:日立公司氨基酸分析专用磺酸型阳离子交换树脂柱(Na柱,参照GB 5009.124—2016分析17种氨基酸;Li柱,参照GB/T 30987—2020分析羟脯氨酸;均为

4.6 mm ID×60 mm);检测波长570,440 nm。

### 1.4 样品处理及仪器检测

首先参考文献<sup>[11]</sup>沉淀蛋白:液体样品视含量高低,准确称取2~3 g,用20%的三氯醋酸稀释至3~4倍体积;粉状样品则称取1 g左右,用5%的三氯醋酸定容至25 mL,再离心(6 000 r/min, 5 min)过滤后取滤液。再加入等体积的浓盐酸(使样液中盐酸浓度为6 mol/L),参照GB 5009.124—2016进行水解等处理,用全自动氨基酸分析仪测定水解氨基酸含量。游离氨基酸含量参照GB/T 30987—2020第一法测定。

然后参考文献<sup>[12-13]</sup>,取水解氨基酸和游离氨基酸两者含量之差作为肽含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 现有肽含量测定方法的比较和选择

现有肽类食品原料相关国家标准或行业标准<sup>[10-11]</sup>所规定的肽含量测定方法,是用酸溶蛋白含量减去游离氨基酸含量。对于酵素这类样品,因其原料主要为植物(包括食用菌)或可食动物源原料,含有一定量的非蛋白氮(如核苷酸等成分中的氮),因而由凯氏定氮法测得的酸溶蛋白含量结果势必偏高。

此外,有不少学者<sup>[14-16]</sup>采用双缩脲法测定蛋白水解物中的肽含量。该方法可测定样品中二肽以上的蛋白水解物和大分子蛋白的总量。为了消除大分子蛋白质的干扰,一般使用5~10 g/100 mL的TCA沉淀的方法进行样品前处理。酵素成分复杂,大多含有黄酮、类胡萝卜素、花色苷等成分,在双缩脲法测定波长(540 nm左右或310~330 nm)范围内,这些非蛋白类成分均有较强的吸收干扰<sup>[17]</sup>,故该方法也难以准确测定酵素类产品中的肽含量。

基于以上因素,考虑到酵素样品基质的复杂性,参考相关文献<sup>[12-13]</sup>,按照1.4所述方法分别测定样品的水解氨基酸和游离氨基酸含量,由两者之差获取肽含量。

### 2.2 标准曲线及其线性范围

采用外标法考察氨基酸的标准曲线,即配制不同浓度的氨基酸混合标准溶液(0.005, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.250 μmol/mL),按1.3色谱条件进行试验,以氨基酸峰面积作为纵坐标 $y$ ,相应氨基酸的浓度为横坐标 $x$ 绘制标准曲线,结果显示,每个标准曲线的线性回归方程的相关系数( $r$ )均大于0.999,每种氨基酸的峰面积与其浓度在0.005~0.250 μmol/mL范围内均显示良好的线性关系(见表1)。

### 2.3 不同方法测定结果的比较

由表2和表3可知,按照现有肽类产品标准中规定的方法测定的肽含量(表3)明显高于研究所提方法结果(表2),说明采用现有肽类产品国家标准或行业标准规定

表 1 6 种氨基酸的标准曲线

Table 1 Standard curves of 16 kinds of amino acids

名称	浓度范围/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	线性方程	<i>r</i>
天门冬氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x+58\ 680$	0.999 7
苏氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+106\ 268$	0.999 7
丝氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+195\ 015$	0.999 8
谷氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+247\ 602$	0.999 8
甘氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+18\ 293$	0.999 7
丙氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x-56\ 707$	0.999 7
缬氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+164\ 750$	0.999 8
蛋氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+127\ 961$	0.999 8
异亮氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x+20\ 988$	0.999 7
亮氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x+19\ 831$	0.999 7
酪氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x-144\ 655$	0.999 6
苯丙氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x-65\ 174$	0.999 7
赖氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+181\ 072$	0.999 6
组氨酸	0.005~0.250	$y=4\times 10^7x+166\ 112$	0.999 9
精氨酸	0.005~0.250	$y=3\times 10^7x+428.53$	0.999 8
脯氨酸	0.005~0.250	$y=8\times 10^6x+161\ 769$	0.999 6

的凯氏定氮法测定的酸溶蛋白含量结果确实受到非蛋白氮的较大影响。酵素类样品的基质成分较复杂,大多会含有来自少量叶绿素或核酸等成分的非蛋白氮(如图 1 和图 2)。另一方面,由上述凯氏定氮法测定的氮含量换算成蛋白质含量时,肽类产品标准统一规定乘以 6.24,实际上研究检测的酵素原料主要是蔬菜、水果、小麦及坚果等(样品 1 还含阿胶,其换算系数为 5.55),这些原料中的蛋白质换算系数大多小于 6.24。因此,以上两方面因素均将导致按照现有标准方法所测的肽含量结果偏高,研究所建立的肽含量测定方法相对较科学合理。

此外,由表 2 可知,样品 1 肽含量远大于其他样品,这是由于该样品中含有较高含量的阿胶蛋白肽,来自该产品原料阿胶蛋白的发酵和酶解。

2.4 加标回收试验及其精密度

根据表 2 中益生菌果蔬酵素粉样品的水解氨基酸和游离氨基酸含量,分别以此含量的不同比例即按照高(120%)、中(100%)、低(80%)3 个浓度加入氨基酸混标溶液,制备游离氨基酸和水解氨基酸的加标试样,每个浓度各 3 份,分别上氨基酸自动分析仪测定,由结果分别计算加标回收率。由表 4 可知,水解氨基酸和游离氨基酸测定中 17 种氨基酸的加标回收率均在 89.9%~103.1% 范围内,相对标准偏差(RSD)均小于 5.1%,表明该方法回收率及其精密度均符合定量测定要求。

表 2 研究所提方法测定酵素样品中肽含量

Table 2 Determination result of peptide content in Jiaosu samples (*n*=3)

样品	水解氨基酸		游离氨基酸		肽含量
	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	RSD/ %	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	RSD/ %	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
样品 1	2.44	2.21	0.082 8	3.97	2.36
样品 2	0.16	1.29	0.095 3	2.85	0.07
样品 3	0.04	3.24	0.007 0	4.57	0.03
样品 4	0.13	2.52	0.029 0	3.28	0.10
样品 5	0.04	5.35	0.008 3	3.90	0.03
样品 6	0.15	2.70	0.027 6	3.63	0.12
样品 7	0.09	4.58	0.019 4	3.76	0.07

表 3 参照现有肽原料产品标准测定肽含量

Table 3 Determination result of peptide content based on existing peptide raw material product standards (*n*=3)

样品	酸溶蛋白		游离氨基酸		肽含量
	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	RSD/ %	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	RSD/ %	平均值/ ( $10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
样品 1	3.28	1.92	0.082 8	3.97	3.20
样品 2	0.24	2.36	0.095 3	2.85	0.15
样品 3	0.05	3.75	0.007 0	4.57	0.04
样品 4	0.45	2.20	0.029 0	3.28	0.42
样品 5	0.05	3.93	0.008 3	3.90	0.04
样品 6	0.21	3.07	0.027 6	3.63	0.18
样品 7	0.13	3.55	0.019 4	3.76	0.11

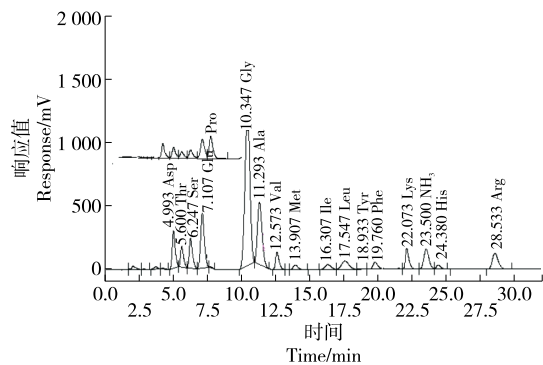


图 1 样品 4 中水解氨基酸色谱分离图谱

Figure 1 Chromatogram of hydrolyzed amino acids in sample 4

2.5 羟脯氨酸的测定

GB 5009.124—2016 规定的方法适用于食品中 16 种氨基酸的测定,其中不包括羟脯氨酸。对于样品 1,因其

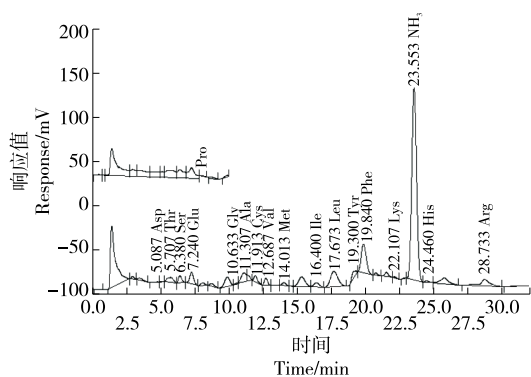


图2 样品4中游离氨基酸色谱分离图谱

Figure 2 Chromatogram of free amino acids in sample 4

原料中含有阿胶,故该样品所含的蛋白肽中会有一些的羟脯氨酸。若仍采用GB 5009.124—2016规定的色谱条件,在440 nm波长检测条件下,羟脯氨酸与其他氨基酸重叠而不能分离。因此,参照GB/T 30987—2020的色谱条件,在440 nm下用锂柱分离测定该样品中游离态和水解后的羟脯氨酸含量,其羟脯氨酸与其他成分可完全分离(如图3所示)。结果表明:样品1水解后的羟脯氨酸

含量为310.01 mg/100 g,游离的羟脯氨酸未检出,其水解后羟脯氨酸含量也计入表2中该样品的肽含量结果。其羟脯氨酸加标回收率及其重复性(RSD)列于表4中。

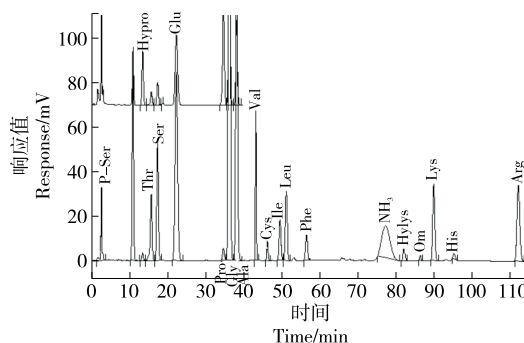


图3 样品1水解氨基酸色谱分离图谱

Figure 3 Chromatogram of hydrolyzed amino acids in sample 1

### 3 结论

研究建立了测定食用酵素样品中肽含量的新方法。结果表明:该方法与现有肽类标准中规定的肽含量测定

表4 食用酵素样品的水解和游离氨基酸含量测定的加标回收率及其相对标准偏差<sup>†</sup>

Table 4 Recoveries and precision experiment of hydrolysis and free amino acid content determination of edible Jiaosu samples with spiked standards

氨基酸	游离氨基酸						水解氨基酸					
	低		中		高		低		中		高	
	回收率	RSD值	回收率	RSD值	回收率	RSD值	回收率	RSD值	回收率	RSD值	回收率	RSD值
天门冬氨酸	101.2	2.9	98.1	3.3	96.5	2.4	97.6	0.9	96.8	4.5	95.6	1.0
苏氨酸	99.2	3.2	97.5	2.9	94.7	2.3	97.2	1.3	96.5	0.6	94.6	1.4
丝氨酸	97.2	3.5	96.3	3.6	94.0	1.7	96.4	1.0	95.1	2.1	95.6	0.7
谷氨酸	99.8	2.5	99.4	3.7	99.2	0.3	99.9	2.8	99.2	3.1	95.7	2.3
甘氨酸	98.1	2.2	98.0	2.8	96.3	1.0	97.7	2.6	97.0	3.6	95.9	0.9
丙氨酸	99.5	2.9	99.4	3.9	98.7	0.4	99.6	2.4	96.2	2.7	95.3	2.3
缬氨酸	101.3	4.2	101.6	2.1	101.9	0.3	100.5	0.9	98.5	2.6	95.9	2.4
蛋氨酸	99.0	2.8	97.9	2.9	96.2	1.4	99.2	1.3	96.2	1.5	89.9	5.0
异亮氨酸	101.0	3.2	101.4	4.1	100.3	0.5	98.2	1.7	97.8	1.6	96.2	1.1
亮氨酸	102.6	3.4	100.7	2.2	100.8	1.1	98.6	3.3	98.3	1.4	97.2	0.8
酪氨酸	99.8	3.9	99.8	3.7	97.0	1.6	97.6	2.6	95.7	0.8	94.5	1.6
苯丙氨酸	99.9	4.1	99.9	2.5	97.2	1.6	98.7	2.5	97.2	1.6	93.9	2.5
赖氨酸	101.4	2.6	100.9	3.8	100.1	0.7	99.7	1.7	98.1	0.9	95.5	2.2
组氨酸	99.9	4.7	98.2	1.1	93.7	3.3	98.2	2.0	96.7	1.3	94.7	1.8
精氨酸	103.1	2.2	104.0	3.1	99.5	2.3	99.8	3.1	99.1	0.9	96.6	1.7
脯氨酸	100.1	3.5	99.4	2.5	96.1	2.2	99.0	2.9	98.4	1.5	94.2	2.7
羟脯氨酸							98.0	3.3	96.9	3.4	95.6	1.2

<sup>†</sup> 羟脯氨酸的水解氨基酸回收率及其相对标准偏差(RSD)是针对样品1进行检测的结果,该样品中游离态羟脯氨酸未检出;其他水解和游离氨基酸的回收率及其RSD均是对益生菌果蔬酵素样品进行检测的结果。

方法比较,可以避免非蛋白氮的干扰,防止肽对游离氨基酸分离测定的影响,且能有效分离检测酵素样品中胶原蛋白肽的羟脯氨酸含量,较准确地测定酵素这类基质较复杂的样品中的肽含量。方法加标回收率和定量重复性均较好,符合定量测定要求,可以推广应用到酵素类及其他以肽类为标志性成分之一的功能食品的检测质控中。

### 参考文献

- [1] 中国轻工业联合会. 酵素产品分类导则: QB/T 5324—2018 [S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2018.  
China National Light Industry Federation. Guidelines for classification of enzyme products: QB/T 5324—2018[S]. Beijing: China Light Industry Press, 2018.
- [2] 贺娜, 徐田, 耿树香, 等. 几种自制植物酵素功能性成分测定及感官评价[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(1): 208-210.  
HE N, XU T, GENG S X, et al. Determination of functional components of several homemade plant enzymes and sensory evaluation[J]. Anhui Agric Sci, 2020, 48(1): 208-210.
- [3] 靳素媛, 耿燕, 周琦, 等. 24 种食用植物酵素功能成分分析与生物活性初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(8): 62-67.  
JIN S Y, GENG Y, ZHOU Q, et al. Analysis of functional components of 24 fermented juice of edible plant and preliminary study on their biological activities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 42(8): 62-67.
- [4] 杨成玮, 袁斌, 杨权, 等. 食用酵素的功能活性及应用研究进展[J]. 现代食品, 2019(9): 70-76.  
YANG C W, YUAN B, YANG Q, et al. Progress in functional activities and applications of edible enzymes[J]. Modern Food, 2019(9): 70-76.
- [5] 白浩, 文佳嘉, 费爽雯, 等. 酵素的功能与综合应用研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(6): 270-272.  
BAI H, WEN J J, FEI S W, et al. Function and integrated application of the enzyme[J]. Food Industry, 2017, 38(6): 270-272.
- [6] GUN H N, KYUNG J J, YE S P, et al. Bacillus/Trapa Japonica fruit extract ferment filtrate enhances human hair follicle dermal papilla cell proliferation via the Akt/ERK/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019, 104(19): 1-11.
- [7] DEVAKI C S, PREMAVALLI K S. Fermented beverages[M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019: 321-367.
- [8] KANCABAS A, KARAKAYA S. Angiotensin-converting enzyme (ACE) -inhibitory activity of boza, a traditional fermented beverage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(3): 641-645.
- [9] WANG Y, JI B P, WU W, et al. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(2): 265-272.
- [10] 全国食品工业标准化技术委员会. 海洋鱼低聚肽粉: GB/T 22729—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
National Technical Committee for Standardization of Food Industry. Marine fish oligopeptide powder: GB/T 22729—2008 [S]. Beijing: China Light Industry Press, 2008.
- [11] 中国轻工业联合会. 小麦低聚肽粉: QB/T 5298—2018[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2018.  
China Light Industry Federation. Wheat oligopeptide powder: QB/T 5298—2018[S]. Beijing: China Light Industry Press, 2018.
- [12] 戴军, 陈尚卫, 谢广发, 等. 绍兴黄酒中 ACE 活性抑制肽的分离分析[J]. 分析测试学报, 2006, 25(4): 74-77.  
DAI J, CHEN S W, XIE G F, et al. Isolation and sequence analysis of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides in Chinese rice wine[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2006, 25(4): 74-77.
- [13] 张苏闽, 汤晓枢, 周媛媛. 脑蛋白水解物原料肽含量测定方法的改进[J]. 上海医药, 2015, 36(13): 74-79.  
ZHANG S M, TANG X S, ZHOU Y Y. Optimization of a method for the determination of peptide content in cerebroprotein hydrolysate[J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal, 2015, 36(13): 74-79.
- [14] 萧能庚, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 2 版. 北京: 北京大学出版社, 2005: 232-235.  
XIAO N G, YU R Y, YUAN M X, et al. Experimental principles and methods of biochemistry[M]. 2nd ed. Beijing: Peking University Press, 2005: 232-235.
- [15] 张玲, 石彩文, 肖凯军, 等. 双缩脲法测定罗非鱼源胶原蛋白肽含量的改良及应用评价[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 234-240.  
ZHANG L, SHI C W, XIAO K J, et al. Improvement and application of biuret method for determination of collagen peptide from tilapia[J]. Food Science, 2019, 40(20): 234-240.
- [16] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.  
LU W, REN G P, SONG J M. Determination of content of peptides in protein hydrolysates[J]. Food Science, 2005, 26(7): 169-171.
- [17] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 285-293.  
WANG Z, XU S Y, TANG J. Food chemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 285-293.