

超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白及其结构表征

赵改名, 王壮壮, 祝超智, 余小领, 张秋会, 邱兴山

Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction and Structural Characterization of Cowhide Collagen

ZHAO Gaiming, WANG Zhuangzhuang, ZHU Chaozhi, YU Xiaoling, ZHANG Qiupei, and QI Xingshan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070219>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超声波辅助酶解提取鱼皮胶原蛋白的工艺优化

Optimization of Ultrasonic Assisted Enzymatic Extraction of Collagen from Fish Skin of *Lophiiformes*

食品工业科技. 2019, 40(1): 175-180 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.032>

浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征

Optimization of preparation process of *Enteromorpha prolifera* polysaccharide-iron and its structure characterization

食品工业科技. 2018, 39(5): 161-165, 170 <https://doi.org/>

超声辅助提取鲵皮胶原蛋白工艺优化及结构特征分析

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction and Structural Characteristics Analysis of Collagen from Chinese Giant Salamander(*Andrias davidianus*) Skin

食品工业科技. 2021, 42(22): 160-168 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020154>

复合酶辅助超声波提取菊苣根总黄酮的工艺优化及其抗氧化活性

Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from Roots of *Cichorium Intybus* L. by Ultrasonic Assisted with Complex Enzyme

食品工业科技. 2021, 42(8): 164-171 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060184>

超声波辅助提取紫槐花色素工艺优化

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Process of Pigment from Flowers of *Robinia pseudoacacia* L.

食品工业科技. 2020, 41(10): 157-162, 169 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.026>

超声波协同酶法提取菊苣根多糖工艺优化

Optimization of extraction technology of polysaccharide from roots of *Cichorium intybus* L. by ultrasound assisted with enzyme hydrolysis

食品工业科技. 2017(09): 168-173 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.024>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

赵改名, 王壮壮, 祝超智, 等. 超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白及其结构表征 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 190–199. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070219

ZHAO Gaiming, WANG Zhuangzhuang, ZHU Chaozhi, et al. Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction and Structural Characterization of Cowhide Collagen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 190–199. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070219

· 工艺技术 ·

超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白 及其结构表征

赵改名¹, 王壮壮¹, 祝超智^{1,*}, 余小领¹, 张秋会¹, 祁兴山²

(1.河南农业大学食品科学技术学院,河南郑州 450002;
2.恒都综合试验站,河南驻马店 463000)

摘要: 以牛皮为原料, 优化超声波辅助酶提取牛皮中胶原蛋白的工艺。在单因素实验的基础上设计响应面试验, 以牛皮胶原蛋白提取率为响应值, 优化得到胶原蛋白的最佳提取工艺, 并对其进行结构表征。结果表明: 牛皮中胶原蛋白的最佳提取工艺条件为超声波功率 161 W、超声波处理时间 64 min、胃蛋白酶添加量 109 U/g、料液比 1:16 g/mL, 在此条件下胶原蛋白的提取率为 63.77%。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、紫外光谱 (UV) 和傅立叶红外光谱 (FTIR) 分析表明, 超声波辅助酶提取的胶原蛋白符合 I 型胶原蛋白的特征, 保持了其完整的三螺旋结构, 氨基酸组成和扫描电镜 (SEM) 分析得到超声波辅助酶提取的胶原蛋白三螺旋稳定性略微下降。本研究为牛皮中胶原蛋白的提取优化了一种有效的工艺, 且很大程度上缩短了胶原蛋白的提取时间, 并且具有较高的应用价值。

关键词: 牛皮胶原蛋白, 超声波, 提取率, 工艺优化, 结构表征

中图分类号: TS251.92

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)09-0190-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070219

本文网刊:



Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction and Structural Characterization of Cowhide Collagen

ZHAO Gaiming¹, WANG Zhuangzhuang¹, ZHU Chaozhi^{1,*}, YU Xiaoling¹, ZHANG Qiuwei¹, QI Xingshan²

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Hengdu Comprehensive Experimental Station, Zhumadian 463000, China)

Abstract: Using cowhide as raw material, the process of ultrasonic-assisted enzyme extraction of collagen from cowhide was optimized. Based on the single factor experiment, a response surface test was designed, and the extraction rate of cowhide collagen was used as the response value to optimize the optimal extraction process of collagen, and its structure was characterized. The results showed that the optimal extraction conditions of collagen from cowhide were ultrasonic power 161 W, ultrasonic treatment time 64 min, pepsin addition 109 U/g, and solid-liquid ratio 1:16 g/mL. Under these conditions, the extraction rate of collagen was 63.77%. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), ultraviolet spectroscopy (UV) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis showed that the collagen extracted by ultrasonic-assisted enzyme was in line with the characteristics of type I collagen, maintaining its complete triple helix structure, amino acid composition and scanning electron microscope (SEM) analysis showed that the collagen triple helix extracted by ultrasonic assisted enzyme was relatively stable. In this study, an effective process is optimized for the extraction of collagen from cowhide, besides, the extraction time of collagen is greatly shortened and it has high utilization value.

收稿日期: 2022-07-19

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业 (肉牛牦牛) 产业技术体系建设专项 (CARS-37)。

作者简介: 赵改名 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肉类加工与产品质量安全控制, E-mail: gmzhao@126.com。

* 通信作者: 祝超智 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: zhuchaozhi66@163.com。

Key words: cowhide collagen; ultrasound; extraction rate; process optimization; structure characterization

胶原蛋白主要存在于动物体的软骨、皮肤、韧带和筋腱等组织中, 是动物结缔组织中的主要组成部分, 在器官支撑和机体保护方面发挥着重要作用。胶原蛋白是由两条 α_1 和一条 α_2 链组成的特殊的三螺旋空间结构, 因此, 胶原蛋白稳定的分子结构与其特殊的空间三螺旋结构密切相关^[1]。胶原蛋白具有低粘度、高生物相容性和低抗原性等功能特性, 因此胶原蛋白被广泛应用于生物医学、化妆品、食品加工和新型材料开发等领域范围^[2-4]。

我国是世界上最大的肉牛生产国和牛肉消费国之一, 其中 2021 年全年屠宰肉牛头数约 2920 万头, 继而产生大量牛副产物^[5]。皮作为其中一种副产物, 约占牛体重的 10% 左右^[6], 优质牛皮主要用于皮革制品的加工, 质量较差的牛皮常被弃用, 结果不仅未能充分发挥牛皮的价值, 并且皮革的加工容易污染环境^[7]。研究表明, 牛皮中富含 30%~35% 的蛋白质, 其中胶原蛋白成分约占总蛋白的 85%~90%^[8]。将牛皮中的胶原蛋白提取出来并加以利用, 可进一步挖掘皮副产物的潜在价值, 提高综合利用程度。

胶原蛋白的提取多采用酸法、碱法、盐法等常规方法, 环境污染严重, 酶法提取虽然效果较好, 但存在耗时长和效率低的弊端。近年来, 随着设备的创新和环保意识的增强, 低强度的超声波技术作为安全高效的辅助方式被广泛用于蛋白质的提取和改性中。与常规方法相比, 超声波辅助处理可以使气泡在微射流与激波相互作用中发生内爆, 能够产生高度显著的机械剪切力, 增加了蛋白质的溶解度, 使酶更容易与底物结合, 从而提高酶解过程的整体效率^[9-10], 已被广泛应用于羊脚^[11]、鱼皮^[12]、鸡肺^[13]等中胶原蛋白的提取。齐越^[14] 比较了几种不同方式对鹿皮胶原蛋白提取率的影响, 研究发现超声波辅助酶提取时效果最好, 提取率达 57.22%。目前, 水产动物胶原的提取利用成为国内专家学者关注的热点, 在牛皮胶原蛋白方面, 部分学者^[15-16] 比较不同常规方法对胶原蛋白提取率的影响, 多数专家学者^[17-18] 的研究主要集中于牛皮胶原蛋白提取后在不同领域的综合利用效果, 而对通过优化工艺以增加牛皮胶原蛋白提取率的探究则较少, 尤其采用低强度超声波辅助提高胶原提取率的研究鲜有报道^[19], 因此对于超声辅助酶提胶原蛋白最佳工艺条件有待深入研究分析。

本文是以牛皮为原料, 优化超声波辅助酶法从牛皮中提取胶原蛋白的工艺条件并研究了提取工艺对胶原蛋白提取率及胶原蛋白组成、结构和特性的影响。优化牛皮胶原蛋白的提取工艺, 不仅有利于牛皮胶原蛋白更多的溶出, 更进一步促进牛皮源胶原蛋白的工业化生产, 增加牛皮副产品的附加值和拓宽牛皮胶原蛋白的应用范围领域。以期为动物胶原蛋白资源的开发和副产物的综合利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验所用牛皮 购于河南恒都食品有限公司, 将 3 岁龄肉牛击晕后进行人工机械联合屠宰, 随机选取剥下的牛皮, 人工脱毛分割后低温真空运回实验室, 充分清洗后于 -40 ℃ 下保藏; 氢氧化钠、氯化钠、无水乙酸钠、正丙醇、异丙醇等均为国产分析纯 购于国药集团化学试剂有限公司; Na_2CO_3 、一水柠檬酸为食品级试剂 购于河南万邦化工科技有限公司; L-羟脯氨酸(L-Hydroxyproline)、胃蛋白酶(1:3000, 3500 U/g)、透析袋(宽度: 31 mm, 截留分子量: 100 kDa)

购于北京索莱宝科技有限公司; 氯氨 T、对二甲氨基苯甲醛 购于麦克林试剂有限公司; 试验用水均为去离子水。

UV2600 紫外分光光度计 岛津企业管理有限公司; Virtis 型冻干机 美国 SP Scientific; X-64R 高速冷冻台式离心机 美国贝克曼公司; 35172BRUZ 拍打均质机 法国 AES Chemunex 公司; BPG-9156A 鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; CU-420 (HZW21) 恒温水浴槽 上海一恒科学仪器有限公司; Ten Sor II 型傅里叶红外光谱仪 北京普析通用仪器有限责任公司; Waters2695 高效液相色谱仪(配有二极管检测器、717plus 自动进样器及数据分析工作站) 美国 Waters 公司; Quanta FEG 250 扫描电子显微镜 美国 FEI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牛皮胶原蛋白提取工艺研究 牛皮胶原蛋白提取工艺流程如下:

新鲜牛皮 → 去脂和杂蛋白 → 低温保藏 → 解冻 → 高速绞碎 → 预处理 → 超声波辅助酶解提取 → 盐析 → 透析 → 冷冻干燥 → 胶原蛋白

1.2.1.1 牛皮处理 新鲜牛皮低温真空运回实验室并清洗干净后, 使用手术刀清除毛屑后剔除残存的皮下肉和脂肪, 清水冲洗至表面洁净, 在 0~4 ℃ 条件下, 将牛皮切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 采用质量分数 5% 的 Na_2CO_3 溶液和 5% 的 NaCl 溶液分别浸泡 24 h, 料液比(牛皮与 Na_2CO_3 溶液/NaCl 溶液体积比, m:v)为 1:10, 除杂得到脱脂和脱杂蛋白的牛皮。最后用蒸馏水漂洗数次, 得到干净的牛皮颗粒, 真空袋装保藏于 -20 ℃ 备用。

1.2.1.2 单一酶解提取胶原蛋白(EEC) 取洁净牛皮颗粒解冻后, 加入 16 倍体积的 pH2.0 的一水柠檬酸溶液于 0~4 ℃ 环境中浸泡 24 h。隔日牛皮进行高速绞碎处理, 并取一定量的高速绞碎原料于锥形瓶中, 加入 105 U/g(以牛皮重量计) 胃蛋白酶, 将锥形瓶放置于 37 ℃ 环境下进行反应, 总时间控制在 8 h, 酶解结束后在 8000 r/min 的条件下离心 20 min, 保留上清液。

1.2.1.3 超声波辅助酶解提取胶原蛋白(UAECC)

取一定量的 1.2.1.2 中高速绞碎的原料于锥形瓶中, 加入 105 U/g(以胶原蛋白重量计)混合均匀后置于超声波中进行超声酶解, 超声结束后将锥形瓶放置于 37 ℃ 环境下进行反应, 总时间控制在 8 h, 酶解结束后在 8000 r/min 的条件下离心 20 min, 保留上清液。

1.2.1.4 盐析 准确量取酶解离心后的上清液于烧杯中, 加入氯化钠至浓度为 0.9 mol/L, 低温下静置过夜进行盐析, 盐析结束后在 8000 r/min 的条件下离心 20 min, 保留沉淀。

1.2.1.5 透析 准确称取盐析离心后的沉淀, 加入 0.5 mol/L 的柠檬酸溶液充分溶解, 溶液在柠檬酸溶液和蒸馏水中分别透析 24~48 h, 每 8 h 更换一次透析外液。

1.2.1.6 冷冻干燥 将透析结束后的溶液进行冷冻干燥(冷凝器的制冷温度为-65 ℃ 左右, 总时间为 48 h), 直至无水分成为表面疏松有孔的海绵状白色胶原蛋白, 置于干燥器中备用。

1.2.2 单因素实验 以胶原蛋白提取率为试验指标, 探究超声功率、超声时间、酶添加量和料液比对其影响。采用 1.2.1.3 的方法, 固定提取时间为 8 h, 温度控制在 37 ℃, 超声功率为 150 W, 超声波处理时间为 60 min, 加酶量 105 U/g, 料液比为 1:15 g/mL 进行实验。采用脉冲超声方式, 即超声 10 min 暂停 5 min。设定超声波功率为 60、90、120、150、180、210 W; 超声波处理时间为 10、20、40、60、80、100 min; 加酶量为 35、70、105、140、175、210 U/g, 料液比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL; 每组水平重复试验 3 次, 并取其平均值作为试验结果。

1.2.3 响应面试验 根据单因素实验结果和实验的可操作性, 以胶原蛋白提取率作为响应值, 设置四因素三水平响应面试验。通过 Design-Expert 8.0 软件进行试验数据回归分析, 优化得到牛皮中胶原蛋白提取的最优工艺参数。试验因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface experiment

水平	因素			
	A超声功率 (W)	B超声时间 (min)	C酶添加量 (U/g)	D料液比 (g/mL)
-1	120	50	87	1:10
0	150	60	105	1:15
1	180	70	123	1:20

1.2.4 牛皮胶原蛋白提取率的计算 移取反应结束后离心得到的酶解上清液 1 mL, 加入 3 mL 6 mol/L 盐酸在 110 ℃ 下完全水解 6 h, 酶解液中羟脯氨酸的含量通过分光光度法在波长为 560 nm 处测得, 根据羟脯氨酸标准曲线方程为 $y=0.2119x+0.0321$ ($R^2=0.9997$), 酶解液中羟脯氨酸含量乘以 7.1^[20] 即得到胶原蛋白含量。牛皮胶原蛋白提取率计算如下:

$$R = \left(\frac{c \times V \times 7.1 \times \text{稀释倍数}}{M} \right) \times 100$$

式中: R 为胶原蛋白提取率, %; c 为溶液中羟脯氨酸的含量, $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7.1 为羟脯氨酸换算成胶原的系数; V 为溶液体积, mL; M 为羟脯氨酸法测定牛皮中所含胶原蛋白的质量, μg 。

1.3 牛皮胶原蛋白结构表征

1.3.1 牛皮胶原蛋白的 SDS-PAGE 分析 参考 Sahni 等^[21] 的方法并略作修改, 配制成 4 mg/mL 的胶原溶液, 制备质量浓度为 8% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 样品与蛋白上样缓冲液混匀后于沸水浴中加热 5 min, 混合液冷却后进行上样。当样品跑到分离胶底端时, 关闭电源, 取出胶片进行染色和脱色, 最后凝胶成像仪观察分析。

1.3.2 紫外光谱分析(UV) 称取适量牛皮胶原蛋白样品溶于 pH2.0 的一水柠檬酸中, 使胶原蛋白溶液的最终浓度为 2 mg/mL, 采用紫外分光光度计进行测定, 光谱扫描范围为 190~400 nm, 间隔为 0.1 nm。

1.3.3 傅立叶红外光谱分析(FTIR) 参考 Zhu 等^[22] 的方法并修改, 使用 ATR 探头对样品进行测定, 设置傅立叶变换红外光谱仪的扫描范围为 400~4000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描 32 次, 得到吸收峰的变化情况。

1.3.4 氨基酸组成分析 按照国标 GB 5009.124-2016^[23] 中的方法, 准确称取 50 mg 的胶原蛋白样品于牛角水解试管中, 加入盐酸并氮吹 10 min 后灼烧密封管口, 于 110 ℃ 条件下充分反应 24 h, 取出将滤液 pH 调至 9, 并移液至 25 mL 容量瓶中。样液进行柱前衍生, 采用氨基酸自动分析仪将过 0.45 μm 滤膜的样液进行上机分析, 设置参数对样品进行检测。

1.3.5 扫描电镜分析(SEM) 使用双面胶将冷冻干燥后的胶原蛋白固定在清洁的样品台上, 使用离子溅射仪镀金膜, 在加速电压为 10 kV 的扫描电子显微镜条件下观察胶原蛋白微观结构的差异性^[24]。

1.4 数据处理

采用 SPSS 24 软件进行数据方差分析和显著性分析, 采用 PeakFit V4.12 软件对光谱图进行解析, 使用 Oirgin 2018 和 Design-Expert 8.05 进行作图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

从图 1a 中可以看出在其他因素不变的情况下, 胶原蛋白提取率在超声功率为 150 W 达到最高, 此时提取率 61.92%。当超声功率增大时, 改变了牛皮的结构, 超声波的空化效应使得牛皮内部结构变得松散, 暴露出更多酶的作用位点, 增加酶与底物的结合程度, 有利于胶原蛋白的溶出; 当超声功率超过 150 W 时, 提取率反而出现了降低, 这可能是因为高功率的超声波空化作用增强, 破坏了蛋白质的结构和酶结合位点, 导致蛋白水解程度降低^[25]。因此, 初步选择超声功率最佳水平范围为 120~180 W。

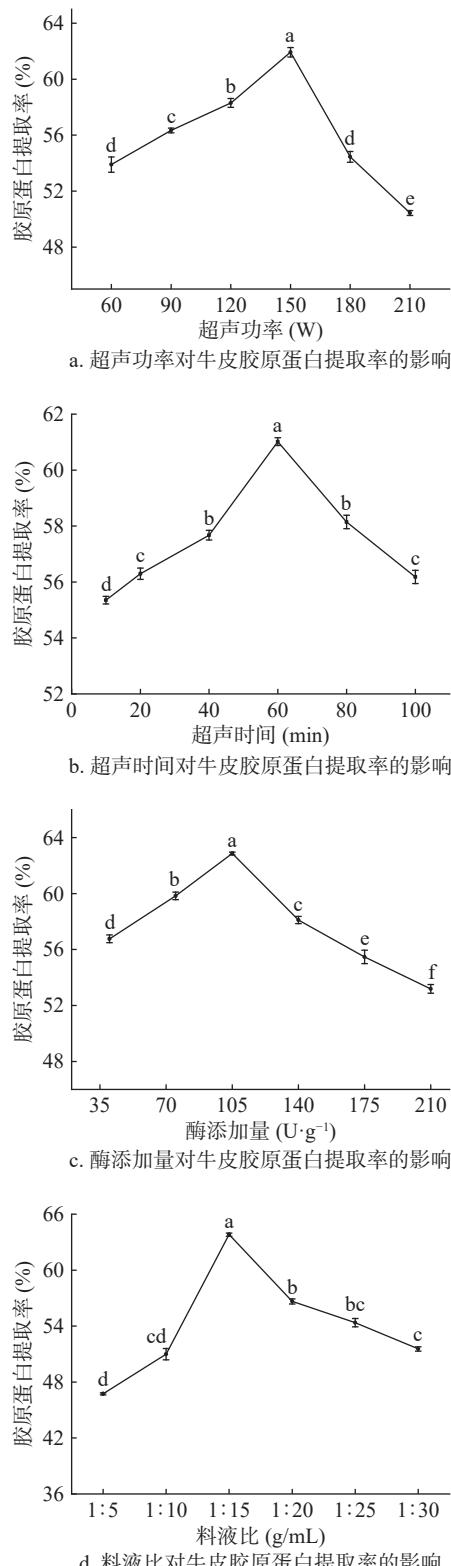


图 1 不同单因素对牛皮胶原蛋白提取率的影响

Fig.1 Effects of different single factors on the extraction rate of cowhide collagen

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

从图 1b 超声波处理时间对胶原蛋白提取率的影响中看出在一定的时间范围内, 胶原蛋白提取率随着超声时间的提高而增加, 当超声时间为 60 min 时, 胶原蛋白提取效果最佳, 此超声时间下提取率可达

到 61.02%, 超声波处理 40 和 80 min 胶原蛋白提取率相近; 当超声波处理时间继续增加时, 蛋白提取率因牛皮结构的松弛利于胶原蛋白溶出, 接着提取率开始下降, 这可能是由于超声波处理过程中体系会产生一定的热量, 当处理时间过长时, 体系因温度过高而导致酶的活性降低或破坏胶原蛋白的空间结构, 从而导致提取率下降^[26]。

如图 1c 所示, 酶添加量对蛋白提取率影响明显, 在酶添加量范围在 35~105 U/g 时, 胶原蛋白提取率随着酶添加量的增加而增大, 但是当酶添加量超过 105 U/g 时, 胶原蛋白与胃蛋白酶的结合已经趋于饱和, 当继续加入胃蛋白酶, 胃蛋白酶的过量会导致酶解处于饱和状态而不利于胶原蛋白的提取, 从而导致胶原蛋白提取率显著下降^[27]。因此酶添加量的初选最适添加范围为 70~140 U/g, 但是考虑到酶的成本较高, 此添加量范围较广, 因此在响应面水平中进一步缩小了范围。

图 1d 显示了料液比对蛋白提取率的影响。随着溶剂比例的增加, 牛皮胶原蛋白的提取率先呈现出上升趋势, 当料液比达到 1:15 g/mL 后提取率先显著下降后趋于稳定。低料液比时, 此时添加较少的一水柠檬酸溶液, 结果导致体系黏度较大, 酶与底物不能充分结合, 该条件下不利蛋白质的析出, 不能够使样品中胶原蛋白提取彻底。一水柠檬酸溶液体积的增加降低了体系黏度, 有利于超声波通过空化效应产生机械剪切力打破外壁, 促进酶与底物的充分结合, 有利于更多胶原蛋白的溶出, 从而使提取率增高, 同时, 继续增大料液比, 由于各组实验所添加的胃蛋白酶量相同, 料液比的增加使得酶的浓度降低, 导致蛋白的提取率降低^[28]。因此, 当料液比在 1:10~1:20 g/mL 范围内时, 其提取效果最好。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面优化试验结果 根据单因素实验结果, 以胶原蛋白提取率为响应值进行试验设计, 各组试验方案及结果如表 2 所示。

2.2.2 回归模型方差分析 使用 Design-Expert 8.05 软件得到胶原蛋白提取率响应值对自变量的二次回归方程, 胶原蛋白提取率回归方程为:

$$Y=62.65+1.98A+1.89B+2.68C+1.84D+1.74AB+0.26AC+0.64AD-0.63BC+2.35BD-1.94CD-3.89A^2-3.80B^2-4.30C^2-3.62D^2$$

回归模型方差分析如表 3 所示, 其模型的 P 值小于 0.0001, 因此模型均表现为极显著; 失拟项的 $P=0.0898$, 差异不显著, 回归模型中 A、B、C、D、AB、BD、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 均为显著($P<0.05$), 说明模型拟合程度良好, 各因素对胶原提取率的影响大小顺序为: 酶添加量>超声功率>超声时间>料液比。显著性分析发现模型调整后的 $R^2_{Adj}=0.89>0.85$, R^2 值越大, 越接近 1, 说明模型拟合效果越好; 因此, 可用该模型对胶原蛋白的提取率进行预测。

表2 Box-Behnken设计方案及结果

Table 2 Design scheme and results of Box-Behnken

试验号	A 超声功率	B 超声时间	C 酶添加量	D 料液比	Y 胶原蛋白提取率 (%)
1	-1	1	0	0	52.00
2	0	-1	-1	0	48.35
3	0	-1	1	0	54.40
4	-1	0	-1	0	50.03
5	0	0	0	0	63.24
6	0	0	-1	1	56.99
7	1	-1	0	0	55.43
8	0	0	1	-1	57.32
9	0	0	1	1	59.33
10	1	0	1	0	59.09
11	0	1	-1	0	55.32
12	0	-1	0	1	51.24
13	0	0	0	0	63.62
14	0	0	-1	-1	47.24
15	0	-1	0	-1	55.25
16	1	0	0	1	58.96
17	-1	-1	0	0	53.50
18	-1	0	1	0	54.60
19	0	0	0	0	62.83
20	0	1	1	0	58.85
21	1	0	0	-1	53.24
22	0	0	0	0	61.81
23	-1	0	0	1	55.14
24	0	0	0	0	61.77
25	-1	0	0	-1	51.96
26	1	0	-1	0	53.46
27	0	1	0	-1	54.21
28	0	1	0	1	59.59
29	1	1	0	0	60.87

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	520.11	11	47.28	22.42	<0.0001	**
A-超声功率	47.28	1	47.28	22.42	0.0005	**
B-超声时间	42.86	1	42.86	20.32	0.0007	**
C-酶添加量	86.45	1	86.45	40.99	<0.0001	**
D-料液比	40.45	1	40.45	19.18	0.0009	**
AB	12.06	1	12.06	5.72	0.0385	*
AC	0.28	1	0.28	0.12	0.7343	
AD	1.62	1	1.62	0.70	0.4170	
BC	1.59	1	1.59	0.69	0.4204	
BD	22.02	1	22.02	10.44	0.0081	**
CD	15	1	15	7.11	0.0232	*
A ²	98.07	1	98.07	46.5	<0.0001	**
B ²	93.59	1	93.59	44.37	<0.0001	**
C ²	120.08	1	120.08	56.93	<0.0001	**
D ²	84.89	1	84.89	40.25	<0.0001	**
残差	35.86	17	2.11			
失拟项	33.04	13	2.54	3.61	0.0898	不显著
纯误差	2.82	4	0.7			
总误差	555.97	28				
$R^2=0.93$ $R^2_{Adj}=0.89$ 变异系数=1.45						

注: **表示影响极显著, $P<0.01$; *表示影响显著, $P<0.05$ 。

2.2.3 交互模型分析及胶原蛋白提取工艺的确定
响应面坡度平缓和陡峭可较为直观和完整地反映两个因素交互作用对牛皮胶原蛋白提取率的影响。

3D图表面坡度越陡峭,说明该因素对试验结果影响越敏感;表面坡度越平缓,表明此因素对胶原蛋白提取率影响作用越小^[29-30]。由图2可知,各因素交互项3D图呈现凸面,且最高点落在选定区域,说明因素地选取是合理的。当超声功率(A)、超声时间(B)、酶添加量(C)、料液比(D)等因素两两交互作用时,对胶原蛋白提取率具有影响。与AB和CD交互作用相比, BD的交互作用响应面曲线斜率最陡,等高线椭圆程度较为明显,说明BD交互作用对胶原蛋白提取率影响更显著($P<0.05$); AC、AD和BC交互作用响应面曲线平缓,等高线趋向于圆形,表明胶原蛋白提取率与其交互作用相关性较小;这与方差显著性分析结果相一致。

2.2.4 最优提取条件的确定与验证 根据响应面优化预测模型,最佳酶解条件为:超声波功率160.54 W、超声时间为64.31 min、酶添加量109.28 U/g、料液比为1:16.65 g/mL。在此条件下,响应面优化预测模型的胶原蛋白提取率为64.03%,为了检验该方法的可靠性,结合操作的便利性和成本的节约性原则,并根据实验所得数据建立了一种预测该提取率变化规律的经验数学模型。调整工艺条件为:超声功率161 W、超声时间64 min、酶添加量109 U/g和料液比1:16 g/mL,修正试验条件后进行平行试验6次,结果显示平均胶原蛋白提取率为63.77%,结果为预测的99.5%,表明试验结果与模型具有较好的吻合度,与预测值基本一致,表明该模型有效,因此该模型可用于预测牛皮胶原蛋白提取率。

2.3 胶原蛋白结构表征

2.3.1 SDS-PAGE凝胶电泳分析 通过测定SDS-PAGE凝胶电泳可对胶原蛋白分子量和亚基组成进行分析。如图3所示,与Marker对比,两种处理提取的牛皮胶原蛋白均含有1条 β 链和2条 α 链,高于245 kDa的条带是I型胶原蛋白 α 链的三聚体,即 γ 链;200 kDa是 α 链二聚体,即 β 链;在135 kDa处为 α_1 链;约110 kDa处是 α_2 链,两种处理方式蛋白条带位置近乎相同,与史睿等^[31]的研究结果一致,说明超声处理未对胶原蛋白亚基造成显著变化。因此,通过SDS-PAGE凝胶电泳初步判断超声波辅助提取的胶原蛋白为结构较完整的I型胶原蛋白。

2.3.2 紫外吸收光谱分析(UV) 蛋白质中紫外生色基团是引起蛋白质紫外光谱吸收的主要原因。图4显示了胶原蛋白紫外吸收光谱。如图4所示,单一酶和超声波辅助酶提取的胶原蛋白的最大紫外吸收峰分别为231.7 nm和234.3 nm,均在230 nm附近,与单一酶提取相比,超声波辅助酶提取的胶原蛋白最大紫外吸收峰发生了红移,这可能是因为超声波作用下胶原蛋白分子基团变得疏松,内部基团暴露,使得C=O由n向 π^* 跃迁引起的^[9],符合胶原蛋白的吸收特性。两者在280 nm附近没有明显的吸收峰,说明芳香族氨基酸的含量较少,提取的胶原蛋白纯度较高。

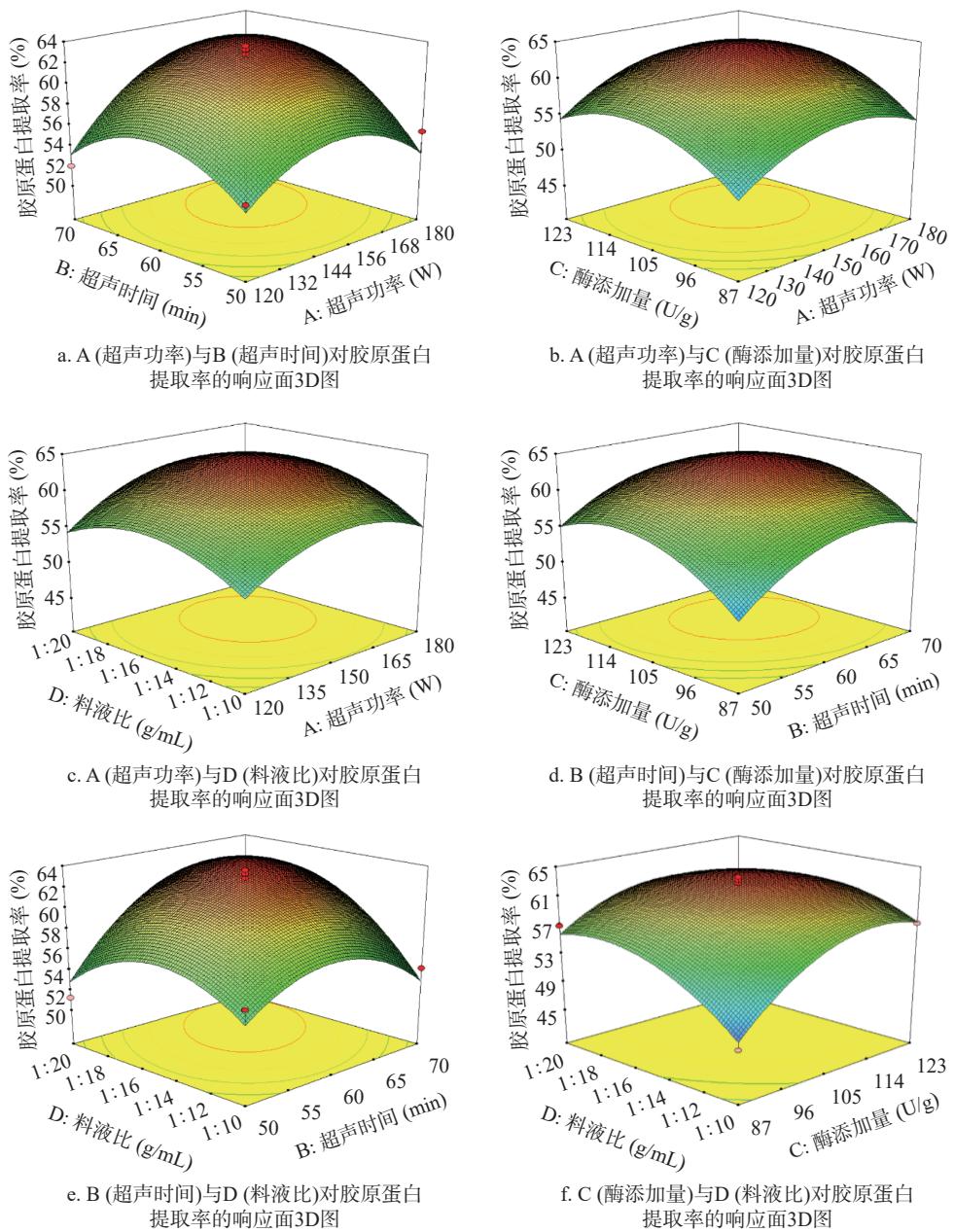


图 2 各因素交互作用对牛皮胶原蛋白提取率的影响

Fig.2 Effects of interaction of various factors on the extraction rate of cowhide collagen

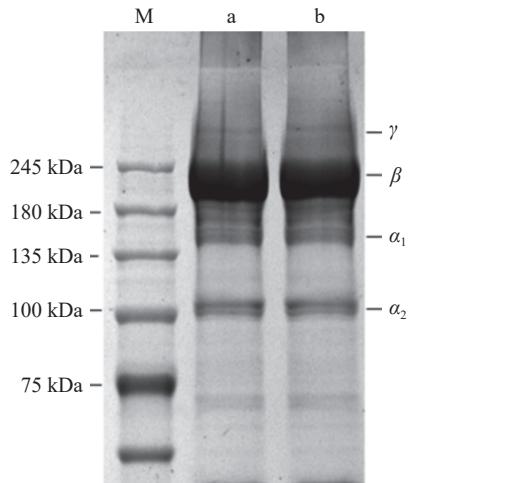


图 3 牛皮胶原蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.3 SDS-PAGE gel electrophoresis image of cowhide collagen
注: M 为 Marker; a 为单一酶法提取; b 为超声波辅助酶法提取。

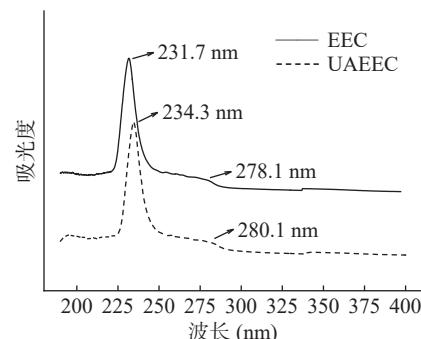


图 4 牛皮胶原蛋白的紫外吸收光谱图

Fig.4 UV absorption spectrum of cowhide collagen

2.3.3 傅立叶红外光谱分析(FTIR)

2.3.3.1 傅立叶红外光谱图分析 从图 5(红外图谱)可知, 两种处理提取的胶原蛋白均含有酰胺 A、B 和酰胺 I、II 和 III 等特征吸收峰。由表 4 可知, 酰胺 A

带的存在是引起 N—H 基团伸缩振动的主要原因, 参与氢键形成时, N—H 基团的伸缩振动会向低波数移动 100 cm⁻¹ 左右, EEC 和 UAEEC 酰胺 A 带的位置分别为 3308.22 cm⁻¹ 和 3305.34 cm⁻¹, 两种胶原蛋白中均有氢键生成; 酰胺 B 带与 CH₂ 基团的反对称收缩振动有关, EEC 和 UAEEC 在波长 3080~3100 cm⁻¹ 附近均具有吸收峰, 表明 CH₂ 基团的反对称收缩振动均存在两种不同方式提取的胶原蛋白之中; 在 1700~1200 cm⁻¹ 之间出现三个吸收峰, 即酰胺 I 带、II 带和 III 带, 用来直接反映多肽链的构象。酰胺 I 带常作为肽二级结构特征标记, 与 C=O 伸缩振动有关, EEC 和 UAEEC 的吸收峰分别 1638.37 cm⁻¹ 和 1634.07 cm⁻¹, 一般而言, 酰胺带吸收波数越小, 其蛋白质中氢键的作用越大。因此, 氢键在 UAEEC 中起着比较重要的作用。酰胺 II 带与蛋白质的 N—H 弯曲振动和 C—N 伸缩振动密切相关。两种胶原蛋白的吸收峰均在 1500~1600 cm⁻¹ 附近, 吸收峰分别为 1548.23 cm⁻¹ 和 1545.36 cm⁻¹, 说明两种胶原蛋白都存在 N—H 弯曲振动和 C—N 伸缩振动。酰胺 III 带具有多种形变和振动模式, 由于侧链基团的影响, 两种处理产生的胶原蛋白吸收峰均位于由 N—H 形变和振动引起的酰胺 III 带的吸收峰处。由红外图谱所述, 超声辅助处理未明显改变三螺旋结构。

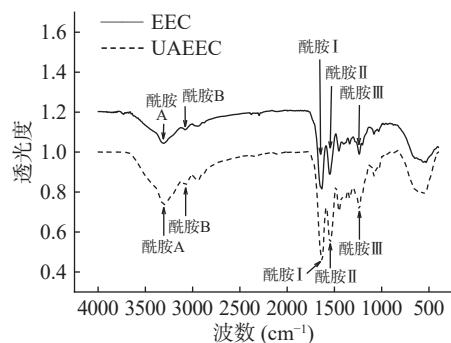


图 5 EEC 和 UAEEC 红外图谱
Fig.5 Infrared spectra of EEC and UAEEC

表 4 FTIR 红外光谱峰位置、峰值波数及说明

Table 4 FTIR infrared spectrum peak position, peak wave number and description

谱峰位置	峰值波数(cm ⁻¹)		说明
	EEC	UAEEC	
酰胺A	3308.22	3305.34	N—H伸缩振动
酰胺B	3079.28	3076.40	CH ₂ 基团的反对称收缩振动
酰胺 I	1638.37	1634.07	C=O伸缩振动
酰胺 II	1548.23	1545.36	N—H弯曲振动和C—N伸缩振动
酰胺 III	1240.58	1234.42	N—H形变振动

2.3.3.2 酰胺 I 去卷积图谱分析 通过 Peakfit 软件对胶原蛋白酰胺 I 带进行去卷积处理, 可对蛋白质的二级结构进行解析(表 5 和图 6), β -折叠、 α -螺旋、无规则卷曲和 β -转角所对应的位置分别为 1615~1637 cm⁻¹ 与 1682~1700 cm⁻¹、1646~1664 cm⁻¹、1637~

1645 cm⁻¹ 和 1664~1681 cm⁻¹。从表 5 中可以看出, 与 EEC 相比, UAEEC 中二级结构含量均出现了显著性差异($P<0.05$), UAEEC 中 α -螺旋含量从 33.70% 下降到 20.93%, β -转角含量小幅下降; 但是 UAEEC 中 β -折叠和无规则卷曲从 37.11%、18.73% 分别增加到 44.23%、28.37%。这与张坤等^[32]采用超声波处理鹅胸肉而导致其肌动球蛋白二级结构含量变化趋势相同, 出现这种现象的原因可能是由于超声波的空化作用导致蛋白质二级结构中分子间作用力发生变化, 使胶原蛋白稳定性降低。

表 5 EEC 和 UAEEC 二级结构含量
Table 5 Secondary structure content of EEC and UAEEC

处理方式	α -螺旋(%)	β -折叠(%)	β -转角(%)	无规则卷曲(%)
EEC	33.70±1.44 ^a	37.11±2.29 ^b	8.11±0.17 ^a	18.73±0.67 ^b
UAEEC	20.93±0.40 ^b	44.23±1.21 ^a	7.23±0.11 ^b	28.37±0.68 ^a

注: 同列不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

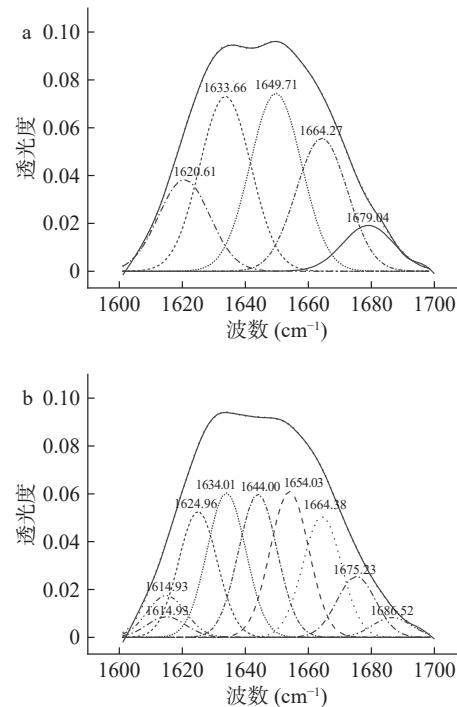


图 6 EEC(a) 和 UAEEC(b) 酰胺 I 去卷积图谱
Fig.6 Amide I deconvolution map of EEC (a) and UAEEC (b)

2.3.4 氨基酸组成分析 如表 6 所示, 单一酶和超声波辅助酶提取的胶原蛋白氨基酸的组成和含量无明显差异, 其中甘氨酸和脯氨酸含量最高, 分别占总氨基酸总量的 29.96%、27.14% 和 29.39%、35.96%, 符合 I 型胶原蛋白三个氨基酸就有一个甘氨酸的特征。在氨基酸检测中未检测到半胱氨酸, 这是因为酸水解法无法将其检测出来, 这与李八方等^[33]的研究结果相同。胶原蛋白的分子结构主要与多肽链二级结构的变化密切相关, 而脯氨酸中的吡咯环可以阻止肽链二级结构的变化, 从而增强了胶原蛋白分子之间的稳定性。脯氨酸的含量越高, 螺旋的稳定性越高, 蛋白的结构也就越稳定, 因此可推测超声作用的胶原蛋白 α -螺旋含量降低并不是由脯氨酸含量变化引起

的, 而是可能与超声导致羟脯氨酸中氢键结合能力降低有关^[34]。试验中发现酶法和超声波辅助酶法提取的胶原蛋白的脯氨酸含量约占总氨基酸的 25% 以上, 且超声波辅助酶法提取的胶原蛋白中脯氨酸含量高于单一酶提取的胶原蛋白。与单一酶法相比, 由于超声波波动和能量的双重作用, 导致了分子内键的破坏, 超声波辅助酶提取的胶原蛋白疏水性氨基酸含量相对较高^[35]。

表 6 牛皮胶原蛋白的氨基酸组成分析

Table 6 Analysis of the amino acid composition of cowhide collagen

序号	氨基酸种类	氨基酸含量(%)	
		EEC	UAEEC
1	天门冬氨酸	0.02±0.00	0.04±0.00
2	谷氨酸	1.36±0.06	2.43±0.04
3	丝氨酸	2.95±0.20	3.61±0.06
4	甘氨酸	29.96±0.03	27.14±0.46
5	组氨酸	1.10±0.01	0.93±0.01
6	精氨酸	7.49±0.13	6.97±0.08
7	苏氨酸	1.92±0.14	1.09±0.05
8	丙氨酸	10.16±0.27	8.22±0.04
9	脯氨酸	29.39±0.41	35.96±0.22
10	酪氨酸	2.82±0.00	2.14±0.02
11	缬氨酸	0.28±0.00	0.24±0.00
12	蛋氨酸	2.96±0.06	2.51±0.05
13	胱氨酸	0.13±0.01	0.46±0.02
14	异亮氨酸	1.54±0.01	1.44±0.01
15	亮氨酸	3.01±0.01	2.64±0.11
16	苯丙氨酸	1.93±0.05	2.00±0.21
17	赖氨酸	2.98±0.02	2.16±0.08

2.3.5 扫描电镜分析(SEM) 如图 7 所示, 根据两种处理方法提取的胶原蛋白微观结构分析, 两者具有不同的结构特点, 相比于常规组, 超声辅助酶提胶原蛋白纤维层叠连接且紧密, 排列较不规则和复杂, 呈多孔网状组织, 这可能是由于超声处理导致孔洞的产生, 因为超声波产生的较高剪切力和空化作用会引起胶原纤维解析出现折叠, 导致胶原的孔洞较多且紧密^[36-37]; 两种提取方式胶原蛋白都保留了表面粗糙的片状纤维结构, 呈现相互缠绕的网状结构, 这与杨恒等^[38]所提鸡肺胶原蛋白微观结构相似, 符合胶原蛋白的纤维特征。研究表明胶原蛋白在医学药物运输方面的应用与蛋白空隙率、孔径大小、网络结构以及

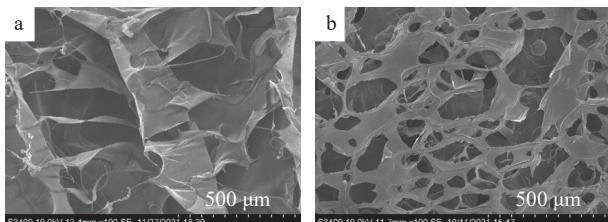


图 7 牛皮胶原蛋白的扫描电镜图(100×)

Fig.7 SEM of cowhide collagen (100×)

注: a: 单一酶法提取; b: 超声波辅助酶法提取。

表面积等因素有着重要的关系, 因此超声处理后的胶原蛋白在药物运输方面更具有优势^[39]。

3 结论

通过单因素和响应面试验, 得到超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白的最佳工艺条件: 超声功率 161 W, 超声时间 64 min, 胃蛋白酶添加量 109 U/g, 料液比为 1:16 g/mL, 在此条件下, 胶原蛋白提取率为 63.77%, 与常规方法相比, 超声辅助处理可明显提高牛皮胶原蛋白的提取率。超声波处理使溶剂与牛皮更易接触, 有利于胶原蛋白的提取。超声辅助提取胶原蛋白 α -螺旋含量降低, 无规则卷曲含量升高, 其网状亚基组成和三螺旋空结构变化不明显; 微观结构变得紧密, 其氨基酸组成和含量未发生明显变化。因此, 超声波辅助胃蛋白酶法可作为一种可行的牛皮胶原蛋白提取方法。

参考文献

- [1] 李国英. 胶原的类型及其结构特征[J]. 中国皮革, 2002(17): 20-21. [LI G Y. Types of collagen and its structural characteristics [J]. China Leather, 2002(17): 20-21.]
- [2] DAN W, CHEN Y, DAN N, et al. Multi-level collagen aggregates and their applications in biomedical applications [J]. International Journal of Polymer Analysis and Characterization, 2019, 24(8): 1-17.
- [3] JAFARI H, LISTA A, SIEKAPEN M, et al. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering [J]. Polymers, 2020, 12(10): 2230.
- [4] 陈诗妍. 胶原蛋白在食品中的应用分析[J]. 现代食品, 2019(18): 27-28, 31. [CHEN S Y. Analysis of the application of collagen in food [J]. Modern Food, 2019(18): 27-28, 31.]
- [5] 曹兵海, 张越杰, 李俊雅, 等. 2021 年肉牛牦牛产业技术发展报告 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(3): 245-250. [CAO B H, ZHANG Y J, LI J Y, et al. Technology development report of beef cattle and yak industry in 2021 [J]. China Animal Husbandry Journal, 2022, 58(3): 245-250.]
- [6] 余群力, 冯玉萍. 家畜副产物综合利用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014. [YU Q L, FENG Y P. Comprehensive utilization of livestock by-products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2014.]
- [7] 金晓丹, 田永强, 吴昊, 等. 制革行业土壤铬污染特征及其影响因素 [J]. 环境工程, 2021, 39(12): 206-211, 219. [JIN X D, TIAN Y Q, WU H, et al. Characteristics and influencing factors of soil chromium pollution in the leather industry [J]. Environmental Engineering, 2021, 39(12): 206-211, 219.]
- [8] 但卫华, 曾睿. 生物质与生物质工程 [J]. 中国皮革, 2002, 31(11): 5. [DAN W H, ZENG R. Biomass and biomass engineering [J]. China Leather, 2002, 31(11): 5.]
- [9] GEOW C H, TAN M C, YEAP S P, et al. A review on extraction techniques and its future applications in industry [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2021, 123(4): 2000302.
- [10] PATIST A, BATES D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(2): 147-154.

- [11] ZA A, SK B, ET B. Effects of sonication on the extraction of pepsin-soluble collagens from lamb feet and product characterization[J]. *LWT*, 2022, 159: 113253.
- [12] 廖伟, 夏光华, 李川, 等. 尖吻鲈鱼鳞和鱼皮胶原蛋白的提取及其理化特性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 36–41. [LIAO W, XIA G H, LI C, et al. Extraction of barramundi fish scales and skin collagen and analysis of its physical and chemical properties [J]. *Food Science*, 2018, 39(1): 36–41.]
- [13] 杨恒. 超声辅助对鸡肺胶原蛋白提取工艺、理化性质及其酶解产物抗氧化活性的影响[D]. 南京: 南京财经大学, 2020.
- [14] YANG H. The effect of ultrasound-assisted on the extraction process, physical and chemical properties of chicken lung collagen and the antioxidant activity of its enzymatic hydrolysis products[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2020.]
- [15] 齐越. 超声波辅助法酶解鹿皮胶原蛋白及其产品研发[D]. 长春: 吉林大学, 2014. [QI Y. Ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of deerskin collagen and its product development[D]. Changchun: Jilin University, 2014.]
- [16] 孟月志, 翁佩芳. 胃蛋白酶提取牛皮胶原蛋白的工艺研究[J]. *精细化工*, 2010, 27(12): 1187–1190, 1200. [MENG Y Z, WENG P F. Study on the extraction process of bovine bovine collagen by pepsin[J]. *Fine Chemicals*, 2010, 27(12): 1187–1190, 1200.]
- [17] 沈菊泉, 汤俊, 沈亚领, 等. 酸法制备牛皮胶原蛋白及其结构性质研究[J]. *食品工业*, 2009, 30(4): 43–46. [SHEN J Q, TANG J, SHEN Y L, et al. Preparation of bovine bovine collagen by acid method and its structural properties[J]. *Food Industry*, 2009, 30(4): 43–46.]
- [18] 徐毓谦, 郭美, 刘贵珊, 等. 牛皮胶原蛋白在牛肉饼中的抗冻特性评价[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(2): 182–188. [XU Y Q, GUO M, LIU G S, et al. Evaluation of antifreeze properties of cowhide collagen in beef patties[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(2): 182–188.]
- [19] KHALAJI S, EBRAHIMI N G, HOSSEINKHANI H. Enhancement of biocompatibility of PVA/HTCC blend polymer with collagen for skin care application[J]. *International Journal of Polymeric Materials*, 2020: 1–10.
- [20] ETHERINGTON D J, SIMS T J. Detection and estimation of collagen[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 32(6): 539–546.
- [21] SAHNI P, SHARMA S, SURASANI V. Influence of processing and pH on amino acid profile, morphology, electrophoretic pattern, bioactive potential and functional characteristics of alfalfa protein isolates[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127503.
- [22] ZHU S, YUAN Q, YANG M, et al. A quantitative comparable study on multi-hierarchy conformation of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2018, 96(MAR.): 446–457.
- [23] 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定: GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版, 2016. [State Food and Drug Administration. National food safety standard determination of amino acids in food: GB 5009.124-2016[S]. Beijing: China Standard Publishing, 2016.]
- [24] LIU J, LUO D, LI X, et al. Effects of inulin on the structure and emulsifying properties of protein components in dough[J]. *Food Chemistry*, 2016, 210(Nov.1): 235–241.
- [25] UMEGO E, HE R, REN W, et al. Ultrasonic-assisted enzymolysis: Principle and applications[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 100: 59–68.
- [26] LIANG X, FENG S, AHMED S, et al. Effect of potassium sorbate and ultrasonic treatment on the properties of fish scale collagen/polyvinyl alcohol composite film[J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2363.
- [27] 宋正规, 朱丽娜, 张洪超, 等. 胃蛋白酶提取马面鱼皮胶原蛋白及结构分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(20): 260–267. [SONG Z G, ZHU L N, ZHANG H C, et al. Extraction of collagen from horse noodle fish skin by pepsin and structural analysis[J]. *Food Science*, 2018, 39(20): 260–267.]
- [28] PRASANTH K S, STONE A K, GUO Q, et al. Effect of alkaline de-esterified pectin on the complex coacervation with pea protein isolate under different mixing conditions[J]. *Food Chemistry*, 2019, 284: 227–235.
- [29] CAO S, WANG Y, XING L, et al. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2020: 121.
- [30] BLANCO M, VÁZQUEZ J A, PÉREZ-MARTÍN R I, et al. Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(1): 40.
- [31] 吴睿, 何静, 吉日木图. 超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白的工艺及结构表征[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(2): 213–223. [SHI R, HE J, JIRI M T. Ultrasonic-assisted extraction of collagen from camel skin and its structural characterization[J]. *Chinese Journal of Foodstuffs*, 2022, 22(2): 213–223.]
- [32] 张坤, 邹烨, 王道营, 等. 高强度超声处理对鹅胸肉肌动球蛋白特性的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(21): 59–65. [ZHANG K, ZOU Y, WANG D Y, et al. Effects of high-intensity ultrasound treatment on the properties of actomyosin in goose breast meat[J]. *Food Science*, 2018, 39(21): 59–65.]
- [33] 李方八, 郭鸣, 侯虎, 等. 胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白的理化性质研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(11): 2580–2585. [LI F B, GUO M, HOU H, et al. Study on the physical and chemical properties of acid-soluble collagen from clarias catfish skin[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2580–2585.]
- [34] 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*, 2010, 125(2): 500–507.
- [35] CHEUNG H S, WANG F L, ONDETTI M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(2): 401–407.

- [36] MDA B, EAAA C, BM A, et al. Proteolysis kinetics and structural characterization of ultrasonic pretreated sunflower protein[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 198–206.
- [37] 向安妮, 许爽, 鞠红梅, 等. 遇蓝菜硒蛋白的纯化、结构表征及抗氧化活性研究 [J]. *西北农业学报*, 2022, 31(3): 299–309.
- [38] 杨恒, 陈银基, 邹烨, 等. 两种方法提取的鸡肺胶原蛋白性质及保湿性研究 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 1–8. [YANG H, CHEN Y J, ZOU Y, et al. Study on the properties and moisturizing properties of chicken lung collagen extracted by two methods [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(17): 1–8.]
- [39] SUN X, WANG J, WANG Y, et al. Collagen-based porous scaffolds containing PLGA microspheres for controlled kartogenin release in cartilage tissue engineering [J]. *Artificial Cells Nanomedicine & Biotechnology*, 2017: 1.