

胰酶水解牦牛乳水解乳蛋白理化性质的初步分析

靳冬武^{1,2}, 李明生^{1,3}, 张健², 龙仕和³, 张磊², 冯玉萍^{1,2}, 李倬^{1,2}, 魏锁成², 马忠仁^{1,2,3*}¹西北民族大学 生物工程与技术国家民委重点实验室;²西北民族大学生命科学与工程学院; ³甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030

摘要: 水解乳蛋白(Lactoalbumin hydrolysate, LH)作为复合生物活性肽,在食品营养和生物制药领域中有广泛的应用。本文采用胰酶水解牦牛乳酪蛋白(Yak Casein, YC)得到牦牛乳水解乳蛋白(Yak casein lactoalbumin hydrolysate, YCLH),并通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、扫描电镜(SEM)、红外光谱(FTIR)、X射线衍射(XRD)以及离子交换色谱法(IEC)对YCLH的理化性质进行了分析。结果表明:用胰酶在温度40℃, pH 7.5, 酶与底物比例为1:5的条件下水解YC 4 h后所得的YCLH与Hyclone水解乳蛋白(Hyclone lactoalbumin hydrolysate, HLH)相比较,有19种相同的氨基酸,总含量分别为46.202 ± 2.263%和24.04 ± 0.768%,差异极显著($P < 0.01$);两者均没有大分子蛋白,形态结构属于矩阵型,二级结构主要以 α -螺旋和 β -转角结构存在,并含有蛋白质(amid I)、羧基、纤维素、核酸、脂类、多糖。综上可知,该水解方法简单,耗时短,易于产业化,YCLH与HLH的理化性质极其相似,这为牦牛乳酪蛋白的进一步开发利用和水解乳蛋白国产化提供了科学理论依据。

关键词: 胰酶; 牦牛乳酪蛋白; 理化性质; 水解乳蛋白

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.022

Pancreatin Hydrolysis Yak Casein and Preliminary Analysis of Physicochemical Property of Lactoalbumin Hydrolysate

JIN Dong-wu^{1,2}, LI Ming-sheng^{1,3}, ZHANG Jian², LONG Shi-he³, ZHANG Lei²,
FENG Yu-ping^{1,2}, LI Zhuo^{1,2}, WEI Suo-cheng², MA Zhong-ren^{1,2,3*}¹The Key Bio-engineering and Technology Laboratory of Nationality Commission Northwest University For Nationalities; ²Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities;³Engineering Technology Research Center for Animal Cell Gansu, Lanzhou 730030, China

Abstract: LH, which as compound bioactive peptide, has a wide range of applications in food nutraceutical and biopharmaceuticals. The study using pancreatin hydrolysed YC to prepare YCLH. The physicochemical property of YCLH was investigated by SDS-PAGE, SEM, FTIR, XRD and IEC. The results showed that the pancreatin add to YC with ratio of 1:5 to prepare YCLH under 40℃, pH 7.5 for 4 h. Consistent with HLH, there were 19 kinds of amino acids, the contents of total amino acids were 46.202 ± 2.263% and 24.04 ± 0.768%, the difference was extremely significant ($P < 0.01$). There were no macromolecular protein, belong to matrix morphology, secondary structure were mainly existed in α -helix and β -turns, contain protein (amid I), carboxyl, cellulose, nucleic acids, lipids and polysaccharide. In conclusion, this method is simple, time saving, feasibility to be industrialized, the physicochemical property of YCLH and HLH is extremely similar. The study can be served as a scientific basis for the further exploitation and utilization of the YC and the Localization of the LH.

Key words: pancreatin; yak casein; physicochemical property; lactoalbumin hydrolysate

生物活性肽(Bioactive peptides)是食物蛋白质经水解分离得到的特异性蛋白片段,其营养价值远

远超出蛋白本身,对人体机能具有积极的影响^[1]。LH是一种重要的复合生物活性肽。乳蛋白,尤其是酪蛋白是乳品工业的主要产品之一,早已成为一种非常有价值的蛋白基料,也是生物活性肽的主要前体^[2]。根据其生物活性肽的氨基酸序列大小的不同,其在生物体内或体外具有免疫调节、抑制细菌和

收稿日期: 2015-07-22 接受日期: 2016-04-06

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT13091);
兰州市科技计划(2014-1-158); 国家民委创新团队计划
(2013-231); 甘肃省科技支撑计划(144FKCA082)

* 通讯作者 E-mail: mzm@xbmu.edu.cn

病毒、抗癌、抗氧化和清除自由基、改善元素吸收等生理功能和作用^[3,4]。从而作为酪蛋白磷酸肽(Casein phosphopeptides, CPPs)、血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽、抗氧化肽(antioxidant peptide)和水解乳蛋白(Lactoalbumin hydrolysate, LH)等生物活性肽的原材料。Cruz-Huerta E等^[5]采用胰蛋白酶水解酪蛋白分离了CPPs; Solieri L等^[6]采用乳酸菌发酵法从酪蛋白中分离了ACE抑制肽; Xie NN等^[7]采用碱性蛋白酶水解酪蛋白分离了抗氧化肽; Lacroix IM等^[8]采用胃蛋白酶水解乳蛋白制备了乳清分离蛋白(Whey protein isolate, WPI)和 α -水解乳蛋白(α -lactalbumin hydrolysates)。由于胰酶是一种复合酶,主要成分是胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶,还有羧肽酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶和核糖核酸酶等^[9,10]。根据酶的专一性,胰酶能够水解多个氨基酸位点。另外, YC在我国青藏高原及其毗邻地区资源丰富,开发价值较大。因此本文采用胰酶水解YC制备YCLH,并对其理化性质与HLH进行对比分析,为YC的进一步开发利用和LH国产化提供了科学理论的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛乳酪蛋白(Yak casein)由甘肃高原生物工程有限公司提供;胰酶(Pancreatin, 胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶的活力分别为3055、82788和32667 U/g)由甘肃省动物细胞工程技术研究中心提供;水解乳蛋白(Lactalbumin hydrolysates)购自美国Hyclone公司;蛋白分子量预染marker购自Bio-Rad公司;茚三酮缓冲液和茚三酮溶液购自日本Wako公司;PF系统缓冲液购自日本Wako公司;5-磺基水杨酸购自天津市凯信化学工业有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SG2型pH计,梅特勒-托利多仪器有限公司;DYY-12型电泳仪,北京市六一仪器厂;L8900型全自动氨基酸分析仪,日本HITACHI公司;X. Pert PRO型多晶粉末X射线衍射仪, PANalytical公司;IFS66v/s型傅里叶变换红外光谱仪,德国布鲁克公司;JSM-5600LV扫描电子显微镜,日本JEOL公司。

1.3 实验方法

1.3.1 牦牛乳水解乳蛋白的制备

牦牛乳水解乳蛋白的制备参照Xie NN等^[11]的方法进行并适当改进。具体方法为:配制5%酪蛋白底物溶液,按照E/S=1:5的比例添加胰酶,调pH值7.5,在45℃下酶解4h并持续搅拌,酶解结束后在85℃以上热处理20min终止酶解反应。再将酶解产物在3500 rpm离心20min,取上清液喷雾干燥后即水解乳蛋白。

1.3.2 SDS-PAGE分析

采用SDS-PAGE凝胶电泳对胰酶水解YC的效果进行分析,电泳条件:5% pH 6.8的浓缩胶,12% pH 8.8的分离胶;样品中加入等量的2×SDS上样缓冲液,95℃变性5min,15μL上样。80V电泳2h后将胶用考马斯亮蓝染色。

1.3.3 样品的形态分析

参照Yang S等^[12]采用扫描电镜对YC、YCLH和HLH的表面形貌进行分析,具体方法为将样品干粉表面三次镀金,在5KV的加速电压下进行扫描,分别在不同倍数下采集电镜扫描图片。

1.3.4 红外吸收光谱(FT-IR)分析

称取一定量溴化钾(KBr),研磨至看不到晶体为止。称取200mg研磨好的KBr和2mg样品放入研钵中,研磨混合均匀,然后用压片器压片,并于红外光谱仪中做全波段(400~4000 cm⁻¹)扫描,分辨率0.009 cm⁻¹。

1.3.5 X射线衍射(XRD)分析

采用多晶粉末X射线衍射仪对YC、YCLH和HLH的结构进一步进行分析,以铜靶进行试验。在管电压为40kV,管电流为40mA,扫描速度15°/min条件下进行试验,其中2 θ 为3~70°。

1.3.6 游离氨基酸分析

样品处理:取水解乳蛋白溶解,用5%的5-磺基水杨酸,按1:3的比例与样品混合20000 r/min离心15min后去蛋白,取上清液用样品稀释液稀释到一定范围后,采用L-8900型全自动氨基酸分析仪检测水解产物中的游离氨基酸,同时以Hyclone水解乳蛋白为对照。

色谱条件:样品分析系统:生理体液系统,交换柱:4.6 mm×60 mm,填料为3μm磺酸型阳离子树脂,分离柱柱温:50℃,反应柱柱温:135℃,进样体积为20μL。系统时间:110min。

1.3.7 数据处理

每组实验平行三次,实验数据采用SPSS 19.0

进行统计分析,最后结果用均数 \pm 标准差 ($X \pm S$) 表示。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

通过 SDS-PAGE 电泳对胰酶水解 YC 的效果进行了分析,同时以 HLH 为对照组,结果如图 1 所示。根据图 1 可以看出,YC 的分子量大于 25 kD,其中,在 25 ~ 37 kD 之间有两条带。YCLH 中 YC 的条带全部消失,也无低分子量条带出现,与 HLH 保持一致。说明酪蛋白中的大分子蛋白已水解成为小分子多肽和氨基酸。这与 Andriamihaja M 等^[10]采用胰酶水解酪蛋白的电泳结果保持一致。

2.2 扫描电镜结果

通过 SEM 对 YC、YCLH 的微观结构进行了分析,同时以 HLH 为对照组。结果如图 2 和图 3 所示,根据图 2 可以看出,YC 经水解后其结构发生了明显的变化。YC 为片状结构,表面粗糙;YCLH 和

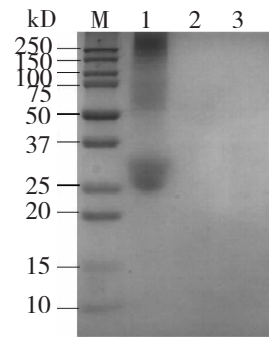


图 1 YC、YCLH 和 HLH 的电泳图谱

Fig. 1 The SDS-PAGE of YC, YCLH and HLH

注:条带 M 为 Marker,条带 1,2,3 分别为 YC、YCLH 和 HLH

Note: Band M was Marker, Band 1 was YC, Band 2 was YCLH, Band 3 was HLH

HLH 的结构相似,为大小不等球形,表面光滑。

根据图 3 可以看出,HLH (500 \times) 和 YCLH (2000 \times) 的结构大小基本一致,并在球上有小孔。这说明 YCLH 与 HLH 均属于矩阵型,这与 Shu Y 等^[12]研究的乳清蛋白水解产物的表面结构相似。

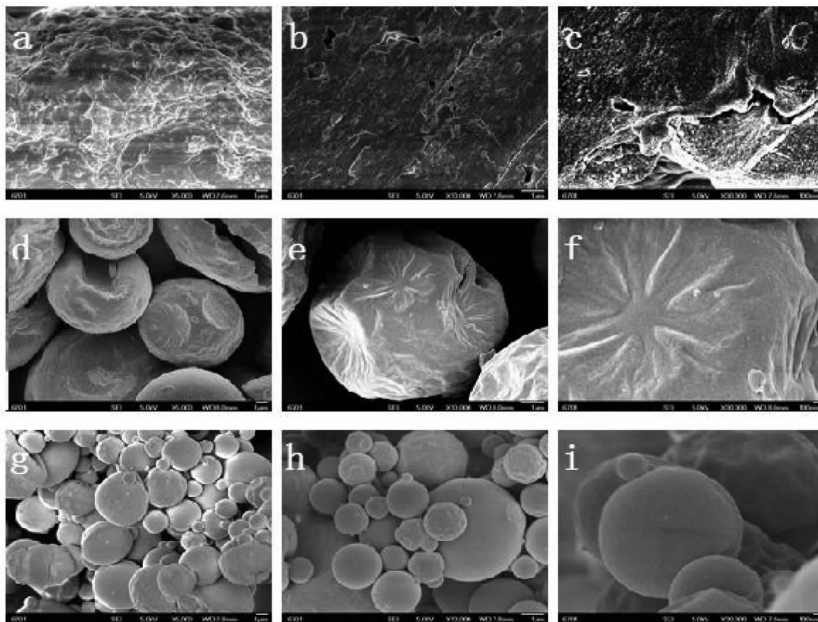


图 2 YC、HLH 和 YCLH 的电镜扫描图谱

Fig. 2 The SEM images of YC, HLH and YCLH

注:a,b,c 依次为 YC 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times 电镜扫描图谱;d,e,f 依次为 HLH 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times 电镜扫描图谱;g,h,i 依次为 YCLH 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times 电镜扫描图谱

Note:a,b,c:The SEM image of YC 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times ;d,e,f:The SEM image of HLH 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times ;g,h,i:The SEM image of YCLH 5000 \times 、10000 \times 、30000 \times

2.3 FT-IR 分析

在 FT-IR 蛋白质图谱中,吸收峰强度比可以反映蛋白质分子结构定量信息,每一个峰的吸收强度

与样品中所对应的化学基团直接相关^[13]。本文通过 FT-IR 鉴定了 YC 和 YCLH 的生化组成,同时以 HLH 为对照组,结果见图 4 所示。根据图 4 可以看

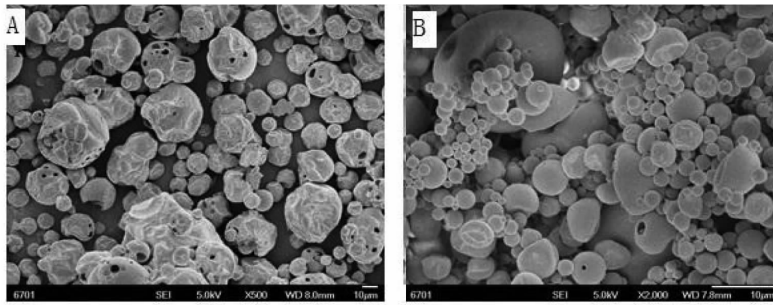


图3 HLH 500 × (A) 和 YCLH 2000 × (B) 电镜扫描图谱

Fig. 3 The SEM images of HLH 500 × (A) and YCLH 2000 × (B)

出, YC 经水解后其二级结构发生了明显的变化, YCLH 与 HLH 结构相似, 吸收较强。Kose A 等^[14]研究表明蛋白质在 3280 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} (amid I), 1542 cm^{-1} (amid II) 处有红外吸收, 羧基在 1398 cm^{-1} 处有红外吸收, 脂类在 2923 cm^{-1} 处有红外吸收, 纤维素在 $1165 \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处有红外吸收, 而核酸在 1241 cm^{-1} 处有红外吸收。Fu HT 等^[15]研究表明, 由多糖羟基的伸缩振动引起 $3200 \sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是多糖的特征吸收峰。YCLH 和 HLH 样品在 1642 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} , 1079 cm^{-1} , 1241 cm^{-1} 处均有红外吸收峰, 在 $3200 \sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 也有吸收峰。说明 YCLH 和 HLH 样品中含有蛋白质 (amid I)、羧基、纤维素、核酸和多糖。其中 1398 cm^{-1} 吸收峰较高, 这是因为水解产物中富含游离氨基酸; 在 2960 cm^{-1} 处有吸收红外吸收峰, 这可能是脂类的吸收峰发生偏离所致。而除此之外, 在 537 、 1453 、 1517 cm^{-1} 和 3068 cm^{-1} 处也有吸收峰, 有待进一步研究。

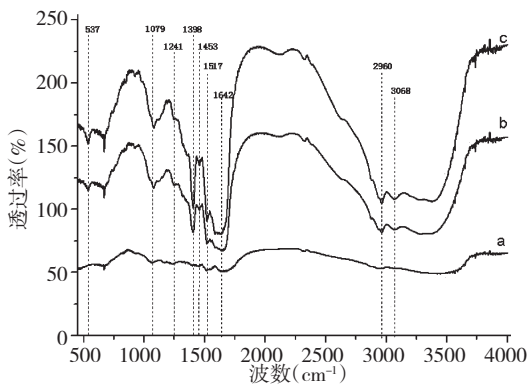


图4 YC (a)、HLH (b) 和 YCLH (c) 的红外吸收图谱

Fig. 4 IR spectra of YC (a), HLH (b) and YCLH (c)

2.4 XRD 分析

采用 XRD 对 YC 和 YCLH 的结构特征进行了分析, 同时以 HLH 为对照组。结果如图 4 所示。根

据图 4 可以看出, YC 经水解后其结构特征发生明显的变化。YC 在 9.1° 和 19.7° 均有特征衍射峰出现; HLH 和 YCLH 在 9.1° 、 19.7° 和 32.9° 均有特征衍射峰出现, 结构特征相似。但 HLH 和 YCLH 的特征衍射峰吸收度强于 YC。Hu X 等^[16]研究表明, 蛋白质 α -螺旋和 β -转角结构的特征衍射峰出现在 12.2° 、 19.7° 和 24.7° 处; β -折叠结构的特征衍射峰出现在 9.1° 、 18.9° 和 20.7° 处。由此可以表明, YC、HLH 和 YCLH 主要以 α -螺旋和 β -转角结构存在。

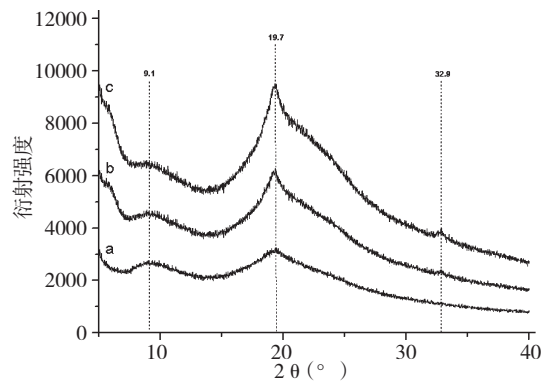


图5 YC (a)、HLH (b) 和 YCLH (c) X 射线衍射图谱

Fig. 5 X-ray diffraction patterns of YC (a), HLH (b) and YCLH (c)

2.5 氨基酸分析结果

2.5.1 氨基酸种类分析

根据图 5 以看出, YCLH 与 HLH 均有 19 种相同的氨基酸, 其中酸性氨基酸有 5 种, 分别为 P-Ser、Asp、AspNH₂、Glu、GluNH₂; 中性氨基酸有 11 种, 包括脂肪族氨基酸有 7 种, 分别为 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Thr 和 Ser, 芳香族氨基酸有 2 种, 分别为 Phe 和 Tyr, 含硫氨基酸有 2 种, 分别为 Met 和 Cys; 碱性氨基酸有 3 种, 分别为 Lys、His 和 Arg。根据图 5 还可

以看出,其氨基酸的出峰顺序为酸性氨基酸、中性氨基酸,碱性氨基酸。这主要是因为氨基酸检测过程中,采用的分离柱为离子交换柱,这主要是取决于氨基酸的等电点。由于氨基酸的羧基介离常数大于氨基的介离常数,所以氨基酸的等电点(pI)偏酸,各种氨基酸所含羧基、氨基个数不同,所以各种氨基酸

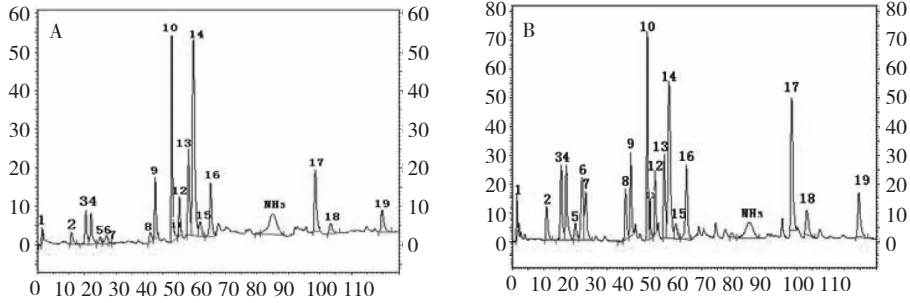


图 6 HLH(A)和YCLH(B)氨基酸分析图谱

Fig. 6 Amino acids chromatograms of HLH (A) and YCLH(B)

1. 磷酸丝氨酸(P-Ser); 2. 天冬氨酸(Asp); 3. 苏氨酸(Thr); 4. 丝氨酸(Ser); 5. 天冬酰胺(AspNH₂); 6. 谷氨酸(Glu); 7. 谷氨酰胺(GluNH₂); 8. 甘氨酸(Gly); 9. 丙氨酸(Ala); 10. 缬氨酸(Val); 11. 胱氨酸(Cys); 12. 蛋氨酸(Met); 13. 异亮氨酸(Ile); 14. 亮氨酸(Leu); 15. 酪氨酸(Tyr); 16. 苯丙氨酸(Phe); 17. 氨(NH₃); 18. 赖氨酸(Lys); 19. 组氨酸(His); 20. 精氨酸(Arg)

2.5.2 氨基酸浓度分析

根据表 1 可以看出,HLH 和 YCLH 中的氨基酸含量有明显的差异($P < 0.01$),其氨基酸总量分别为 $24.04 \pm 0.768\%$ 和 $46.202 \pm 2.263\%$ 。这与底物的种类及酶的专一性有关,胰酶是一种多酶复合物,其与氨基酸的结合位点具有专一性。Andriamihaja

具有不同等电点(pI)。酸性氨基酸等电点在 3 左右、中性氨基酸等电点在 5 左右、碱性氨基酸等电点在 7~10。当洗脱液的 PH 值逐渐升高时,原来带正电荷的酸性氨基酸先失去正电荷从树脂洗脱下来,此时中性氨基酸和碱性氨基酸仍与树脂结合的紧,需要更高的 PH 值洗脱液才能将它们洗脱下来。

M 等^[10]表明胰蛋白酶水解阳离子氨基酸结合位点(Arg、Lys),糜蛋白酶能够水解芳香族和支链氨基酸的结合位点(Tyr、Phe、Trp、Leu),羧肽酶 A 除了不能水解 Asp、Glu、Arg、Lys 四种氨基酸的结合位点以外,其余各种氨基酸的结合位点都能被水解,弹性蛋白酶能够水解 Ala 的结合位点。

表 1 HLH 和 YCLH 的氨基酸组成

Table 1 Amino acids composition of of HLH and YCLH

序号 No.	氨基酸名称 Name	HLH(%)	YCH(%)	序号 No.	氨基酸名称 Name	HLH(%)	YCH(%)
1	磷酸丝氨酸(P-Ser)	0.263 ± 0.020	0.725 ± 0.028	11	胱氨酸(Cys)	0.057 ± 0.003	0.285 ± 0.035
2	天冬氨酸(Asp)	0.347 ± 0.014	0.927 ± 0.192	12	蛋氨酸(Met)	0.907 ± 0.064	1.716 ± 0.112
3	苏氨酸(Thr)	0.803 ± 0.045	2.175 ± 0.176	13	异亮氨酸(Ile)	2.236 ± 0.047	2.707 ± 0.205
4	丝氨酸(Ser)	0.715 ± 0.202	1.909 ± 0.313	14	亮氨酸(Leu)	6.539 ± 0.096	6.740 ± 0.088
5	天冬酰胺(AspNH ₂)	0.601 ± 0.006	1.835 ± 0.105	15	酪氨酸(Tyr)	0.770 ± 0.012	0.471 ± 0.019
6	谷氨酸(Glu)	0.525 ± 0.005	3.740 ± 0.299	16	苯丙氨酸(Phe)	2.058 ± 0.213	3.582 ± 0.179
7	谷氨酰胺(GluNH ₂)	0.061 ± 0.004	2.661 ± 0.169	17	氨(NH ₃)	0.261 ± 0.007	0.239 ± 0.003
8	甘氨酸(Gly)	0.088 ± 0.004	0.355 ± 0.051	18	赖氨酸(Lys)	2169 ± 0.208	6.253 ± 0.223
9	丙氨酸(Ala)	1.087 ± 0.039	1.816 ± 0.117	19	组氨酸(His)	0.594 ± 0.032	1.512 ± 0.256
10	缬氨酸(Val)	2.690 ± 0.101	3.105 ± 0.190	20	精氨酸(Arg)	1.267 ± 0.106	3.465 ± 0.226

3 结论

用胰酶在底物浓度为 5%, 温度 40 °C, pH7.5, 酶与底物比例为 1:5 的条件下水解 YC 4 h 后所得

的 YCLH 与 HLH 相比较,有 19 种相同的氨基酸,总含量差异极显著($P < 0.01$),分别为 $46.202 \pm 2.263\%$ 和 $24.04 \pm 0.768\%$;两者均没有大分子蛋白,形态结构属于矩阵型,二级结构主要以 α -螺旋

和 β -转角结构存在,并含有蛋白质(amid I)、羧基、纤维素、核酸、脂类、多糖。该水解方法简单,耗时短,易于产业化,YCLH与HLH的理化性质极其相似,这为牦牛乳酪蛋白的进一步开发利用和水解乳蛋白国产化提供了科学理论的依据。

参考文献

- Silva SV, Malcata FX. Milk caseins as a source of bioactive peptides. *Int Dairy J*, 2015, 15:1-15.
- Kamau, SM, Lu RR, Chen W, *et al.* Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Rev Int*, 2010, 26:386-340.
- Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol*, 2006, 59:118-124.
- Mills S, Ross RP, Hill C, *et al.* Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J*, 2011, 21:377-401.
- Cruz-Huerta E, García-Nebot MJ, Miralles B, *et al.* Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product. *Food Chem*, 2015, 168:648-655.
- Solieri L, Rutella GS, Tagliazucchi D, *et al.* Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food Microbiol*, 2015, 51:108-116.
- Xie NN, Wang B, Jiang L, *et al.* Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption. *Food Res Int*, 2015, 76:518-526.
- Lacroix IM, Li-Chan EC. Comparison of the susceptibility of porcine and human dipeptidyl-peptidase IV to inhibition by protein-derived peptides. *Peptides*, 2015, 69:19-25.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (中国药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol II, 848-849.
- Andriamihaja M, Guillot A, Svendsen A, *et al.* Comparative efficiency of microbial enzyme preparations versus pancreatin for *in vitro* alimentary protein digestion. *Amino Acids*, 2013, 44:563-572.
- Xie NN, Liu SS, Wang C, *et al.* Stability of casein antioxidant peptide fraction during *in vitro* digestion/Caco-2 cell model: characteristics of the resistant peptides. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239:577-586.
- Yang S, Mao XY, Li FF, *et al.* The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235:91-97.
- Liu YY(刘燕燕), Zeng XA(曾新安), Chen XD(陈晓东). Effects of pulsed electric fields and heat treatments on SPI structure analyzed by FT-IR. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学光谱分析), 2010, 30:2340-2344.
- Kose A, Oncel SS. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. *Biotechnol Reports*, 2015, 6:137-143.
- Fu HT(付海田), Deng C(邓超), Chen JH(陈敬华), *et al.* Extraction, structural identification and bioactivities of polysaccharide from fermented Cordyceps. *Nat Prad Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:111-116.
- Hu X, Kaplan D, Cebe P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules*, 2006, 39:6161-6170.