胶原酶解物对双醛淀粉-明胶复合膜性质的影响

陈书霖[1]，王艳霞[1]，叶燕军[1]，陈俊[1,2]，刘建展[3]，郝更新[1,2]，翁武银[1,2]，唐兰兰[1]
（1.集美大学食品与生物工程学院，福建厦门 361021）（2.厦门市海洋功能食品重点实验室，福建厦门 361021）
（3.厦门中泓检测技术股份有限公司，福建厦门 361008）

摘要：本文考察了罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对双醛淀粉(DAS)交联明胶膜理化性质的影响，探讨了膜对人皮肤永生化角质(HaCat)细胞的相容性。结果发现，TSCH 添加量从 0 增加至 16%时，DAS 交联明胶膜的抗拉伸强度从 55.00 MPa 下降至 24.85 MPa，而断裂延伸率随着 TSCH 添加量的增加呈现先增大后减小的趋势。DAS 交联明胶膜在 30 ℃水中的溶解率为 33.10%，当膜中 TSCH 含量超过4%后，膜的溶解率接近100%。然而，不管 TSCH 添加量是多少，经过240 min后膜中含有的 TSCH 全部释放到水中。SDS-PAGE 的结果表明，在 DAS 交联明胶膜中添加的 TSCH 会阻碍明胶蛋白分子的相互交联作用。另一方面，将 HaCat 细胞培养于 DAS 交联明胶膜时，HaCat 细胞活力只有 11.39%，当 DAS 交联明胶膜中含有 8%的 TSCH 时，HaCat 细胞活力可以达到 108.20%。以上结果表明，添加 TSCH 的 DAS 交联明胶膜在化妆品领域将具有一定的应用潜力。

关键词：胶原酶解物；罗非鱼皮；明胶膜；双醛淀粉；细胞活力；角质细胞
文章篇号：1673-9078(2016)8-134-139 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.021

Effect of Collagen Hydrolysate on the Properties of Dialdehyde Starch-gelatin Films

CHEN Shu-lin[1], WANG Yan-xia[1], YE Yan-jun[1], CHEN Jun[1,2], LIU Jian-zhan[3], HAO Geng-xin[1,2], WENG Wu-yin[1,2], TANG Lan-lan[1]
(1.College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China) (2.Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China) (3.Xiamen Zhonghong Testing Technology Comporation, Xiamen 361008, China)

Abstract: The effect of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) on the physicochemical properties of dialdehyde starch (DAS) cross-linked gelatin films was investigated, and the biocompatibility of these films with the human skin keratinocyte (HaCat) cell was also studied. When the TSCH content in the DAS-gelatin films was increased from 0 to 16%, the tensile strength (TS) of films decreased from 55.00 MPa to 24.85 MPa, while the elongation at break (EAB) showed a downward trend after the initial increase with increasing amount of added TSCH. The solubility of DAS cross-linked gelatin films in water at 30 ℃ was 33.10%, and at TSCH concentration higher than four percent, it increased to 100%. However, TSCH from films was released into water after 240 min irrespective of the amount of added TSCH. The results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis revealed that the addition of TSCH in the DAS cross-linked gelatin film could hinder the interaction between the protein molecules of gelatin. On the other hand, when HaCat cell was cultured on the surface of DAS cross-linked gelatin films, the cell activity of HaCat cells was 11.39%. When the DAS cross-linked gelatin film contained 8% TSCH, the HaCat cell activity reached up to 108.2%. Based on the above results, the DAS-gelatin films containing TSCH have potential applications in the cosmetic industry.

Key words: collagen hydrolysate; tilapia skin; gelatin film; dialdehyde starch; cell viability; keratinocytes

收稿日期：2015-09-18
基金项目：国家自然科学基金(31271984)；福建省杰出青年科学基金项目(2014J06013)；厦门市海洋经济发展专项资金(13CZP003HJ05)；闽海渔高新（[2013] 006 号）
作者简介：陈书霖（1989-），男，硕士，研究方向：水产品加工副产物综合利用
通讯作者：翁武银（1974-），男，博士，教授

胶原肽是胶原或明胶经过降解后的蛋白肽混合物，一般由 2~20 个氨基酸组成，具有多种人体代谢和生理调节功能。有研究报道，胶原二肽或三肽在人体内的吸收速度比氨基酸还要快[1]。小分子量的胶原肽不仅具有良好的营养作用，还具有增强皮肤胶原活性、促进皮肤胶原纤维合成的功能[2]。前期研究表明，罗非鱼皮或鲨鱼皮胶原肽可以明显促进人皮肤角质细

胞的生长[3]。而且，胶原肽还具有良好的保湿性、溶解性和低过敏性等特点，已经在化妆品、保健食品和生物医药等领域被广泛应用[4]。

另一方面，由于明胶是一种天然水溶性高分子材料，具有良好的生物相容性和可降解性，已被广泛应用于生物药物和组织工程材料[5~6]。明胶结构中可能存在具有促进细胞粘附作用的 Arg-Gly-Asp 序列[7]。与壳聚糖膜和聚乳酸-乙醇酸膜相比，明胶膜更有利于大鼠胚胎神经干细胞的分化[8]。然而，利用明胶制备的蛋白膜存在耐水性能差，机械强度较低的缺陷，在组织材料的应用上受到一定的限制。因此，Ito 等[9]利用谷氨酰胺转胺酶(TGase)对明胶进行改性，发现改性后的明胶在 37 ℃下可以形成凝胶，而且小鼠成纤维细胞可以在制备的凝胶上生长。在前期研究中，我们也发现添加双醛淀粉(DAS)不仅可以提高罗非鱼皮明胶膜的机械强度，还能够改善膜的耐水性能[10]。然而，有关胶原酶解物对 DAS 交联明胶膜性质的影响却尚未见报道。

为了拓展鱼类明胶膜的应用范围，本研究首先考察了罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对 DAS 交联明胶膜性质的影响，再将人皮肤永生化角质(HaCat)细胞接种在 TSCH 添加的 DAS 交联明胶膜上，研究了膜对细胞的相容性，探讨其作为小分子活性物质载体的应用前景，为明胶膜在化妆品领域的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料

罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)参考 Weng 等[11]报道的方法进行制备(分子量分布在 200~1000 u)；双醛淀粉(DAS)，泰安市金山变性淀粉有限公司；DC 蛋白测定试剂盒，美国 Bio-Rad 公司；人皮肤永生化角质细胞(HaCat 细胞；KCB200442YJ)，北京北纳创联生物技术研究院；DMEM 高糖基础培养基和胎牛血清(FBS)，美国 Gibco 公司；双抗(Penicillin/Streptomycin)和 0.25%胰蛋白酶，美国 Corning 公司；MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；二甲基亚砜(DMSO)，美国 MP 生物科技有限公司；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

PSX 智能型恒温恒湿箱，宁波莱福科技有限公司；UV-8000A 紫外可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；TMS-PRO 质构仪，美国 Food Technology 公司；Agilent 1200 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；EVOS 型倒置显微镜，美国 AMG 公司；FLUOstar OPTIMA(0413)型多功能酶标仪，德国 BMG 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鱼皮明胶的提取

罗非鱼皮经冰水漂洗，在 4 ℃下利用 0.05 mol/L NaOH 浸泡 16 h 后，用冰水漂洗至中性，再于 4 ℃下利用 0.05 mol/L HCl 浸泡 30 min，冰水漂洗至中性后，在 80 ℃水浴下浸提 1 h，冷却至室温后通过离心(15000× g，20 ℃，15 min)，获得的上清液进行冷冻干燥制备成明胶粉末，保存于-18 ℃冰箱，供以下实验使用。

1.3.2 明胶膜的制备

明胶膜参考翁武银等[12]报道的方法进行制备。明胶粉末利用蒸馏水于室温下溶胀 30 min 后，经 60 ℃水浴加热 60 min 使明胶充分溶解，添加相对明胶质量 20% (*m*/*m*)的甘油，用蒸馏水调整溶液中明胶的终浓度为 2% (*m*/*V*)。DAS 的添加量为明胶质量的 1.5% (*m*/*m*)，混合溶液于室温搅拌 1 h 后，分别加入相对明胶质量 2%、4%、6%、8%、16%的 TSCH，混合均匀得到成膜溶液。脱泡后，将制备的成膜溶液(4 g)倒在 5 cm×5 cm 的有机硅树脂框内，在相对湿度(RH)为 50%、温度为 25 ℃的恒温恒湿箱中干燥 24 h 后制备成蛋白膜，揭膜后继续放在恒温恒湿箱中平衡 24 h，作为以下实验的测试样品。

1.3.3 膜的性质分析

1.3.3.1 机械性能

明胶膜机械性能的测定参考翁武银等[12]报道的方法。将膜切成宽 15 mm，长 45 mm 矩形长条，测定厚度后，利用 TMS-PRO 质构仪对膜进行拉伸试验。力量感应元为 100 N，初始间隔为 30 mm，拉伸速率为 60 mm/min。膜的拉伸强度(TS)和断裂伸长率(EAB)按照以下公式进行计算：

$$TS(MPa) = F/S$$

$$EAB(\%) = (E/30) \times 100$$

式中，F 为膜断裂时承受的最大张力(N)；S 为膜的横断面积(m^2)，是膜的宽度和厚度的乘积；30 为膜断裂时被拉伸的长度(mm)。

1.3.3.2 固形物溶解率

将明胶膜放在含有 0.1%叠氮钠水溶液的中，在 30 ℃水浴振荡 24 h 后，对未溶解的膜的固形物进行测定，固形物溶解率为溶解的蛋白膜固形物占明胶膜固形物的百分比。

1.3.4 SDS-PAGE

明胶膜利用含 2% SDS、8 mol/L 尿素、20 mmol/L

Tris-HCl (pH 8.8)的蛋白变性剂溶解后，溶解的蛋白根据 Laemmli[13]报道的方法进行 SDS-PAGE 分析。其中浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4%和 8%。在 10 mA 电流下进行电泳后，用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色，利用脱色液(甲醇:乙酸:水=3:1:6，*V/V/V*)脱色至背景完全透明，再进行拍照。

1.3.5 胶原酶解物(TSCH)释放率的测定

将含有 TSCH 的明胶膜放在 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS，pH 7.4)中溶解 10、30、120 和 240 min 后，利用高效液相色谱仪测定溶液中 TSCH 的含量。色谱柱为 TSKgel G2000 SWXL (300 mm×7.8 mm)，流动相为乙腈:水:三氟乙酸(45:55:0.1，*V/V/V*)，在柱温 30 ℃、流速 0.5 mL/min 的条件下，以检测波长为 214 nm 对样品进行测定。以溶解在 10 mmol/L PBS (pH 7.4)的 TSCH 作为标准品绘制标准曲线(图 1)。

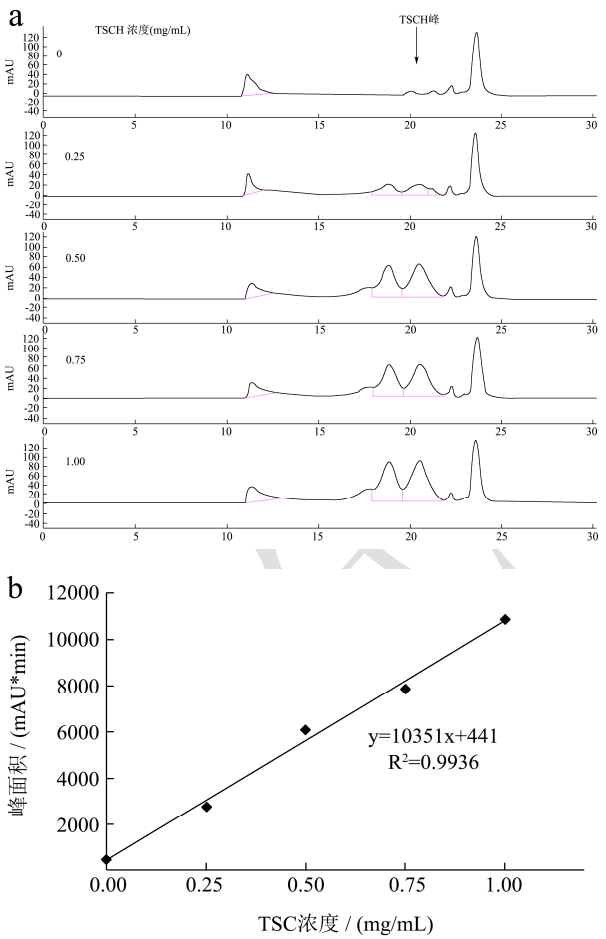


图 1 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)的液相图谱 a 和标准曲线 b

Fig.1 High performance liquid chromatograms (a) and the calibration curve (b) of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH)

1.3.6 明胶膜对细胞生长的影响

1.3.6.1 细胞培养

HaCat 细胞置于含 10% FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养液中，于二氧化碳培养箱(37 ℃、5% CO_2、饱和湿度)中培养，每隔 2~3 d 更换培养液，待细胞融合率达 90%时，用 0.25%胰蛋白酶消化，并进行传代培养，取对数期生长状态良好的细胞供以下实验使用。

1.3.6.2 细胞形态观察和细胞活力测定

HaCat 细胞以 6×10^4 个/孔密度接种于底部铺有明胶膜的 24 孔培养板后，放在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。利用倒置显微镜观察细胞在膜表面的生长形态，利用 MTT 试剂盒检测细胞的活力。测定细胞活力时，弃去培养板中的培养液，在各孔中加入 1 mL MTT (0.5 mg/mL)，继续培养 4 h，然后弃去培养液，加入 1 mL DMSO 溶解蓝紫色结晶物，用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各孔的吸光值。以未添加明胶膜的培养板中培养的 HaCat 细胞为空白组。细胞活力为样品组吸光值与空白组吸光值的比值。

1.3.7 数据统计与分析

所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行 ANOVA 方差分析，显著性检验方法为 Duncan 多重检验，检测限为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 机械性能

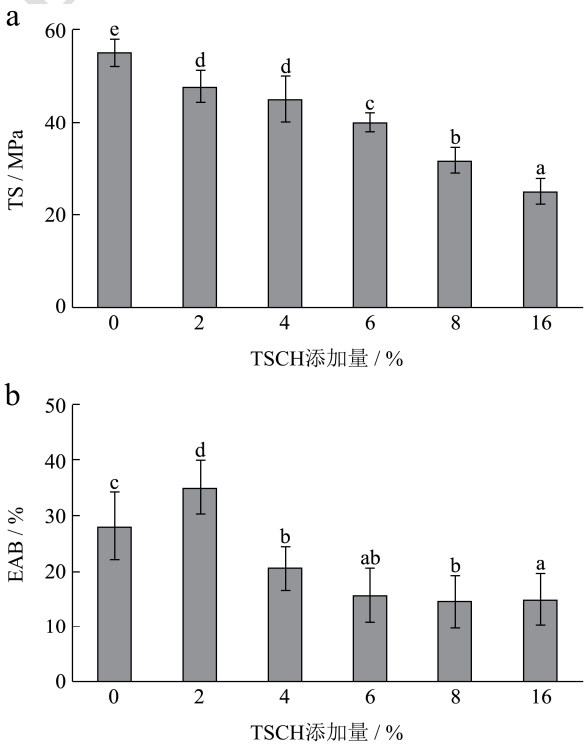


图 2 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对 DAS 交联明胶膜机械性能的影响

Fig.2 Effect of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) on the mechanical properties of DAS crosslinked gelatin films

注：相同小写字母表示差异不显著(p>0.05)。

图 2 显示了添加 TSCH 对 DAS 交联明胶膜机械性能的影响。从图中可以看到，伴随着 TSCH 添加量的增加，DAS 交联明胶膜的抗拉伸强度(TS)呈下降的趋势。当 TSCH 添加量从 0 增加至 16%时，膜的 TS 从 55.00 MPa 下降至 24.85 MPa(图 2a)。另一方面，DAS 交联明胶膜的断裂延伸率(EAB)随 TSCH 添加量的增加出现先增大后减小的变化(图 2b)。当 TSCH 的添加量为 2%时，膜的 EAB 出现了最大值，这可能是 TSCH 起到增塑作用，使膜的延展性得到增强。Nuanmano 等[14]研究了水解度为 61%和 95%的明胶酶解物对肌原纤维蛋白膜的机械性能的影响，结果发现膜的 EAB 不仅与明胶酶解物的添加量有关，还受明胶酶解物分子量大小的影响，分子量越小的明胶酶解物越容易使膜的 EAB 发生下降。还有文献报道，在鱿鱼皮明胶膜中添加鱿鱼皮明胶酶解物，由于小分子明胶酶解物穿插在高分子明胶网络中，破坏了明胶蛋白肽链间的相互作用，结果降低了膜的强度[15]。本研究采用的 TSCH 的分子量主要分布在 200~1000 u，因此小分子量 TSCH 的添加可能破坏了明胶分子间的相互作用，结果导致膜的机械性能下降(图 2)。

2.2 SDS-PAGE

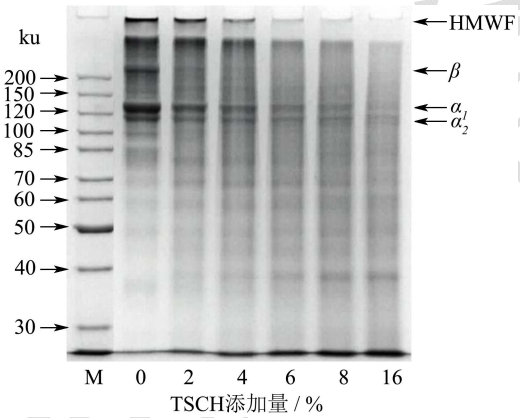


图3 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对DAS交联明胶膜蛋白组分的影响

Fig.3 Effect of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) on the protein profiles of DAS crosslinked gelatin films

注：M, 标准蛋白; HMWF, 高分子组分。

图 3 显示了 TSCH 对 DAS 交联明胶膜蛋白组成的影响。由图可知，DAS 交联明胶膜的蛋白组成中不仅含 β、α_1、α_2 肽链，还含有无法进入浓缩胶的高分子组分(HMWF)。这与唐兰兰等[10]报道的 DAS 交联罗非鱼皮明胶膜的结果类似。当 DAS 交联明胶膜中添加 TSCH 之后，伴随着 TSCH 添加量的增加，HMWF、β 肽链和 α 肽链的条带浓度都逐渐变浅，而分子量<α_2 肽链的小分子组分逐渐增加，尤其分离胶底部的小分子组分出现明显的增加。这些结果表明了 TSCH 的添加使明胶分子间无法形成交联，结果导致膜的机械性能下降(图 2)。

2.3 固形物溶解率

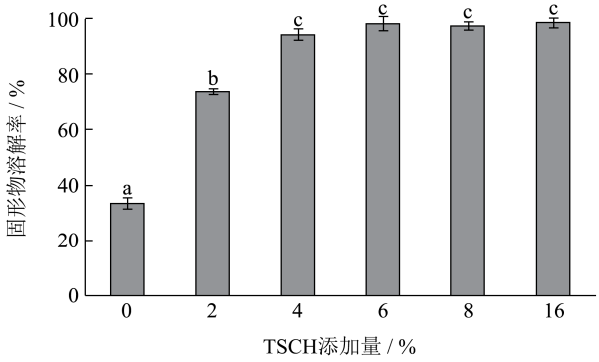


图4 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对DAS交联明胶膜固形物溶解率的影响

Fig.4 Effect of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) on the water solubility of DAS crosslinked gelatin films

注：相同小写字母表示差异不显著(p>0.05)。

添加 TSCH 对明胶膜固形物溶解率的影响如图 4 所示。通常，膜的溶解性可作为耐水性能的指标[16]。膜中形成的网络结构强度越大，膜的溶解性越小[17]。由图 4 可知，随着 TSCH 添加量的增加，DAS 交联明胶膜的固形物溶解率逐渐增加，在 TSCH 添加量超过 4%后膜的溶解率接近 100%。这些结果表明，添加 TSCH 破坏了明胶蛋白网络结构的形成，导致 DAS 交联明胶膜的耐水性能下降。Nemet 等[18]研究发现，肌原纤维蛋白膜的溶解率与甘油(增塑剂)的添加量存在正相关关系。本研究添加的 TSCH 由于分子量小，因此在鱼皮明胶膜中也起到增塑剂的作用。

2.4 TSCH 的释放

图 5 显示了 TSCH 从 DAS 交联明胶膜释放到水中的结果。当膜在 37 ℃的水中放置 10~30 min 时，低浓度 TSCH 添加的膜其 TSCH 释放率大于高浓度 TSCH 添加的膜，尤其在 30 min 时最明显。当膜在水中放置的时间超过 30 min 时，低浓度 TSCH 添加的膜其 TSCH 释放率小于高浓度 TSCH 添加的膜。然而，不管 TSCH 添加量是多少，将膜放在水中 240 min 时，TSCH 从 DAS 交联明胶膜都全部释放到水中。这些结果也表明了添加的 TSCH 可能在明胶干燥成膜中均匀的分散在膜的网络结构中，但没有与成膜的明胶高分子牢固地结合在一起，因此当膜与水接触时 TSCH 能够完全释放出来。当利用 DAS 交联明胶膜作为 TSCH

等小分子生物活性物质的载体时，不仅能够起到缓释作用，还不会使 TSCH 受到损失。

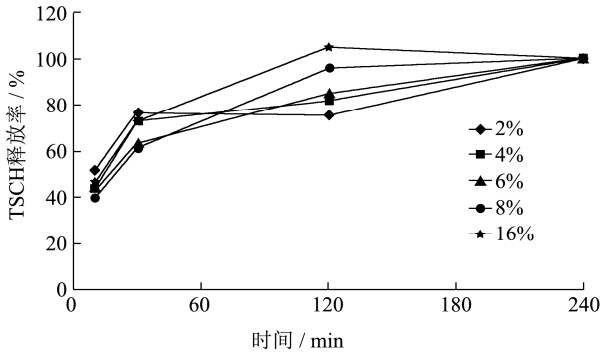


图5 添加罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)的DAS交联明胶膜在水中的TSCH释放率(37 ℃)

Fig.5 Release of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) from DAS crosslinked gelatin films into water at 37 ℃

2.5 细胞形态

将HaCat细胞分别接种于不同含量TSCH的DAS交联明胶膜表面，可以观察到细胞贴附于膜的表面增殖生长。图 6 为倒置显微镜拍摄的 HaCat 细胞在 DAS 交联明胶膜上粘附生长 24 h 的生长概况。从图 6 可以看出，在 DAS 交联明胶膜表面，单位面积 HaCat 细胞数较少。当 DAS 交联明胶膜中添加了 2%的 TSCH，单位面积 HaCat 细胞数出现明显增加，而且伴随着 TSCH 浓度的提高膜上的细胞增殖越快，利用添加 16% TSCH 的 DAS 交联明胶膜培养 HaCat 细胞的效果与直接添加 TSCH 的效果接近。这些结果表明了在 DAS 交联明胶膜中添加 TSCH 能够促进细胞的增殖。有研究报道，小分子胶原多肽有利于细胞生长，具有促进多种细胞增殖的功能，与胶原蛋白相比，胶原多肽一些活性基团的暴露，小分子信号物质的释放，可能还具有促细胞粘附的生理功能[19]。前期实验[3]也表明，不管是鲨鱼皮胶原酶解物还是罗非鱼皮胶原酶解物，都含有 HaCat 细胞生长促进因子。由于明胶在溶液中容易溶胀，HaCat 细胞无法粘附生长在明胶膜表面(数据未显示)。而且，由于 TGase 交联的明胶膜比 DAS 交联明胶膜容易溶胀，因此接种于 TGase 交联明胶膜表面的 HaCat 细胞的生长效果也没有 DAS 交联明胶膜好(数据未显示)，表明了 DAS 交联明胶膜不具有细胞毒性。因此，DAS 交联明胶膜可以作为小分子生物活性物质的载体应用于细胞培养。

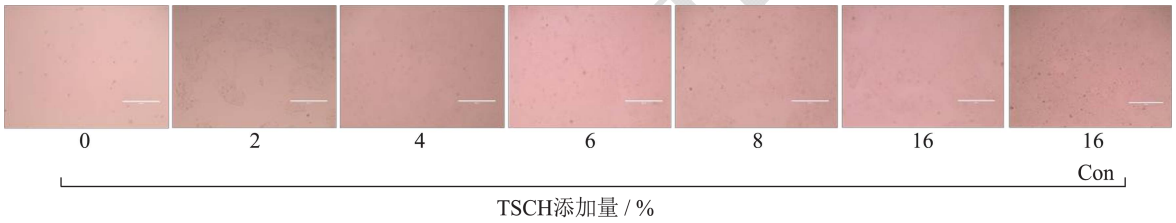


图 6 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对培养在 DAS 交联明胶膜表面的 HaCat 细胞形态的影响(×200)

Fig.6 Effect of tilapia skin collagen hydrolysate (TSCH) on cell morphology of HaCat cells cultured on the surface of DAS crosslinked gelatin films (×200 magnification)

注：直接添加 TSCH。

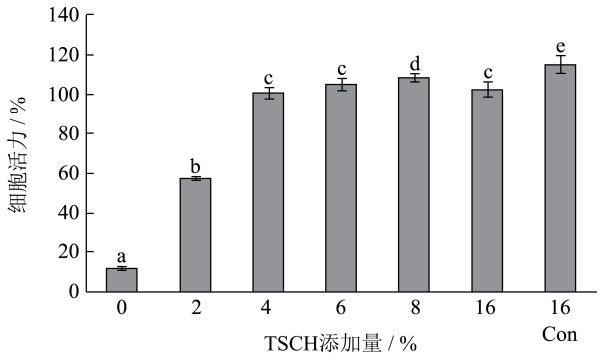


图7 罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对培养在DAS交联明胶膜表面的HaCat细胞活力的影响

Fig.7 Effect of collagen hydrolysate (TSCH) on cell activity of HaCat cells cultured on the surfaces of gelatin films treated with DAS

注：直接添加 TSCH，相同小写字母表示差异不显著(p>0.05)。

2.6 细胞活力

为了进一步阐明 TSCH 添加对 DAS 交联明胶膜表面 HaCat 细胞生长的影响，对细胞活力进行了测定(图 7)。从图 7 可以发现，DAS 交联明胶膜表面 HaCat 细胞的活力仅为 11.39%，当膜中添加 TSCH 后，HaCat 细胞的活力伴随着 TSCH 浓度的增加呈现增大的趋势，在 TSCH 添加量为 8%时细胞活力达到了 108.20%，接近直接添加 TSCH 培养 HaCat 细胞的活力(114.29%)，再次表明 TSCH 添加能够赋予 DAS 交联明胶膜促 HaCat 细胞增殖的能力。然而，进一步提高 TSCH 的浓度，细胞活力出现降低，这可能是因为

此时膜中释放出高浓度的TSCH对细胞生长产生了抑制作用。Chung等[20]在研究绿茶提取物对HaCat细胞增殖的影响时，也发现低浓度的绿茶提取物对HaCat细胞的生长具有促进作用，而提高提取物浓度后反而降低细胞的促生长能力。以上研究结果表明，DAS交联明胶膜可以作为载体支持HaCat细胞的生长和增殖，有望用于生物医药和化妆品领域。

3 结论

研究了罗非鱼皮胶原酶解物(TSCH)对DAS交联明胶膜性质的影响，结果发现伴随TSCH添加量的增加，DAS交联明胶膜的机械强度和耐水性能都出现下降。当膜与水接触时，TSCH能够从膜中完全释放到水溶液中，在DAS交联明胶膜中，TSCH不仅没有与明胶蛋白分子产生牢固的结合，而且还会阻碍明胶蛋白之间的相互交联作用，结果导致膜的耐水性能下降。将HaCat细胞培养于DAS交联明胶膜，结果发现添加TSCH可以促进细胞的生长。因此，利用DAS交联明胶作为TSCH的载体制备的材料可应用于生物医药领域。

参考文献

[1] Siemensma A D, Weijer W J, Bak H J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae [J]. Trends in Food Science & Technology, 1993, 4(1): 16-21

[2] 周倩,罗志刚,何小维.胶原蛋白的应用研究[J].现代食品科技,2008,24(3):285-289
ZHOU Qian, LUO Zhi-gang, HE Xiao-wei. Progress of collagen application [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(3): 285-289

[3] 陈俊,叶燕军,翁武银,等.鱼皮胶原肽对人皮肤角质细胞生长的影响[J].现代食品科技,2015,31(3):55-59
CHEN Jun, YE Yan-jun, WENG Wu-yin, et al. Effect of fish skin collagen peptides on cell viability of human skin keratinocytes [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(3): 55-59

[4] Gómez-Guillén M C, Giménez B, López-Caballero M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1813-1827

[5] Meng Z X, Xu X X, Zheng W, et al. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 84(1): 97-102

[6] Hong L, Peptan I, Clark P, et al. Ex vivo adipose tissue engineering by human marrow stromal cell seeded gelatin sponge [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2005, 33(4): 511-517

[7] Chang C H, Liu H C, Lin C C, et al. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2003, 24(26): 4853-4858

[8] 谭太贵,马景鑑,张文治,等.神经干细胞在PLGA，壳聚糖和明胶膜表面的生长规律[J].中国生物医学工程学报,2006,25(3):377-381
TAN Tai-gui, MA Jing-jian, ZHANG Wen-zhi, et al. Growth rules of neural stem cells on the surface of PLGA, chitosan and gelatin films [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2006, 25(3): 377-381

[9] Ito A, Mase A, Takizawa Y, et al. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(2): 196-199

[10] 唐兰兰,赵阳芳,翁武银,等.pH 和双醛淀粉对罗非鱼鱼皮明胶膜性质的影响[J].食品工业科技,2014,35(1):98-101
TANG Lan-lan, ZHAO Yang-fang, WENG Wu-yin, et al. Effect of pH and dialdehyde starch on the properties of tilapia skin gelatin films [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(1): 98-101

[11] Weng W, Tang L, Wang B, et al. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 342-351

[12] 翁武银,刘光明,苏文金,等.鱼皮明胶蛋白膜的制备及其热稳定性[J].水产学报,2011,35(12):1890-1896
WENG Wu-yin, LIU Guang-ming, SU Wen-jin, et al. Preparation and thermal stability of gelatin edible films from shark skins [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1890-1896

[13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685

[14] Nuanmano S, Prodpran T, Benjakul S. Potential use of gelatin hydrolysate as plasticizer in fish myofibrillar protein film [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47: 61-68

[15] Giménez B, Gómez-Estaca J, Alemán A, et al. Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(5): 1322-1327

[16] Rhim J W, Gennadios A, Handa A, et al. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films [J].

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(10): 4937-4941

[17] Hoque M S, Benjakul S, Prodpran T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1085-1097

[18] Nemet N T, Šošo V M, Lazić V L. Effect of glycerol content and pH value of film-forming solution on the functional properties of protein-based edible films [J]. Acta Periodica Technologica, 2010, 41: 57-67

[19] 蒋金利,潘道东,孙杨赢,等.鹅骨胶原蛋白及肽对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及向成骨分化的影响[J].现代食品科技, 2015,31(7):1-5
JIANG Jin-li, PAN Dao-dong, SUN Yang-ying, et al. Effects of goose bone collagen and peptides on proliferation and osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 1-5

[20] Chung J H, Han J H, Hwang E J, et al. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes [J]. The FASEB. Journal, 2003, 17(13): 1913-19154

现代食品科技