鲍鱼肌肉胶原蛋白的提取与性质研究

马少抗[1]，陈俊[1,2]，郝更新[1,2]，翁武银[1,2]
（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）

摘要：提取了鲍鱼肌肉酸溶性胶原蛋白(ASC)和不同胃蛋白酶质量浓度下的酶溶性胶原蛋白(PSC)，并对它们的理化性质进行研究和比较。结果发现，ASC 的提取率只有 0.63%，低于任一 PSC。氨基酸组成结果显示，ASC 和 PSC 的 Gly 含量都没有达到氨基酸总量的 1/3，但都含有 12.03~16.30 个 Cys 残基和 9.75~14.68 个 Tyr 残基。根据 SDS-PAGE 图谱，发现鲍鱼肌肉 ASC 的 α 亚基是由 160 ku 的 α_1、140 ku 的 α_2 和 130 ku 的 α_3 肽链组成，而 PSC 则是由 3 条 α_1 肽链组成。ASC 的最大紫外吸收峰出现在 224 nm，而 PSC 却偏移至 228 nm。ASC 与 PSC 在粘度特性上存在明显的差异，结果表现为 ASC 的热变性温度高于任一 PSC。Zeta 电位测定结果表明，无论是 ASC 还是 PSC，其等电点均在 pH 4.90 附近。pH 和 NaCl 对 ASC 的溶解性影响趋势与 PSC 基本一致，但在同一 pH 或 NaCl 浓度下，PSC 的溶解度高于 ASC，且随着胃蛋白酶添加量的增加出现一定程度的上升。综上所述，鲍鱼肌肉 ASC 与 PSC 在理化性质上具有明显的区别。

关键词：鲍鱼肌肉；酸溶性胶原；酶溶性胶原；胃蛋白酶浓度；理化性质
文章篇号：1673-9078(2017)2-29-34 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.005

Extraction and Characterization of Collagens from Abalone Muscle

MA Shao-kang[1], CHEN Jun[1,2], HAO Geng-xin[1,2], WENG Wu-yin[1,2]
(1.College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)
(2.Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were extracted from abalone (*Haliotis discus hannai*) muscle, and their physicochemical properties were investigated and compared. The results showed that the extraction yield of ASC from abalone muscle was 0.63%, which was lower than that of any PSC extracted at different pepsin concentrations. Amino acid composition analysis showed that the Gly content of both ASC and PSC were less than one-third of the total amino acids; however, both ASC and PSC contained 12.03~16.30 Cys residues and 9.75~14.68 Tyr residues per 1000 residues. The results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis indicated that the α subunits of ASC were composed of α_1 (160 ku), α_2 (140 ku), and α_3 (130 ku), but there were only three α_1 peptide chains found in PSC. The maximum ultraviolet absorption of ASC was observed at 224 nm, while that of PSC shifted to 228 nm. Significant differences were observed between the viscosity of ASC and PSC; thus, the denaturation temperature of ASC was higher than that of any PSC. Based on the results of zeta potential measurement, both PSC and ASC had a similar isoelectric point at approximately pH 4.90. The effects of pH and NaCl concentration on the solubility of ASC were similar to those of PSC. However, at the same pH or NaCl concentration, the solubility of PSC was higher than that of ASC, and it was further increased to a certain extent with increasing pepsin concentration. In conclusion, these results suggest that the physicochemical properties of ASC and PSC from abalone muscle differ significantly.

Key words: abalone muscle; acid-soluble collagen; pepsin-soluble collagen; pepsin concentration; physicochemical properties

鲍鱼，又名腹鱼，是一种单壳贝类，隶属软体动物门腹足纲鲍科。鲍鱼腹足肉质细嫩，营养丰富，味道鲜美，是中国传统的名贵食材，被誉为四大海味之首。随着人们生活水平的提高，鲍鱼的市场需求量也不断增加。2014 年我国鲍鱼养殖总产量已经突破 11 万 t，其中福建省的鲍鱼年产量达到 9.1 万 t[1]，经济产值已经超过 100 亿元。

腹足是鲍鱼的可食部分，主要由肌原纤维蛋白和胶原蛋白组成。日本早在 60 年代末就已经注重鲍鱼腹足肌肉的化学组分和胶原蛋白的研究[2,3]，为鲍鱼加工积累基础数据。有研究表明，鲍鱼腹足胶原蛋白含量在 2 月份时最高，在 7 月份时最低[4]。鲍鱼不同部位的胶原蛋白含量也明显不同，生鲍鱼肌肉的质构性质与胶原蛋白含量具有一定的相关性，胶原蛋白含量越

收稿日期：2016-01-31
基金项目：国家自然科学基金项目(31571835)；海洋公益性行业科研专项(201405016)；厦门市海洋经济发展专项资金(13CZP003HJ05)
作者简介：马少抗（1991-），男，在读研究生，研究方向：水产品加工
通信作者：翁武银（1974-），男，博士，教授，研究方向：水产加工及其副产物综合利用研究

高肌肉硬度越大[5]。Gao 等[6~8]研究发现鲍鱼肌肉胶原蛋白的明胶化会引起各项流变学指标的变化，表明胶原蛋白对鲍鱼加工制品的品质起到主要作用。鲍鱼肌肉胶原蛋白可能在端肽区形成高度交联，需要通过酶处理才能溶解，因此目前的研究主要集中在酶溶性胶原蛋白(PSC)。Yoneda 等[9]从鲍鱼肌肉中提取获得 2 种酶溶性胶原蛋白并通过克隆深入研究一级结构的特征，结果发现它们在羧基端肽区域含有 6 个 Cys，只比脊椎动物来源的胶原蛋白少 2 个。然而，关于酸溶性鲍鱼胶原蛋白(ASC)的研究报道几乎还是空白。

因此，本研究主要考察了胃蛋白酶浓度对鲍鱼肌肉 PSC 提取率、以及氨基酸组成、蛋白组分分布和溶解性等性质的影响，并与 ASC 进行了比较，为进一步阐明鲍鱼肌肉胶原蛋白的特性提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

皱纹盘鲍，厦门市岛之原生物科技有限公司；胃蛋白酶，国药集团化学试剂有限公司；羟脯氨酸测试盒，南京建成生物工程研究所；其它试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

Avanti J-25 高速冷冻离心机，美国 Beckman 公司；UV-8000A 紫外可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；L-8900 高效氨基酸分析仪，日本 Hitachi 公司；Nicolet iS10 傅里叶红外变换光谱仪，美国 Thermo 公司；NanoZS Zeta 电位仪，英国 Marlvern 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胶原蛋白的提取

鲍鱼肌肉胶原蛋白参考 Dong 等[10]报道的方法进行提取，所有操作均在 4 ℃以下进行。将鲍鱼肌肉清洗干净后切成小块，按料液比 1:10 (*m/V*)加入 20 mmol/L EDTA-0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0)溶液进行匀浆，离心(10000 g，15 min)后，沉淀利用蒸馏水漂洗 2 次，再用 10 倍质量体积的 0.6 mol/L KCl 溶液搅拌 12 h，通过离心(5000 g，15 min)去除盐溶性蛋白，并用 0.6 mol/L KCl 溶液漂洗 2 次，将所得的沉淀再用 10 倍质量体积 0.45 mol/L NaCl 溶液搅拌 12 h，离心(5000 g，15 min)去除上清，利用蒸馏水漂洗 2 次；将所得的沉淀利用 10 倍质量体积的 NaOH (0.1 mol/L)溶液搅拌溶解，将离心(10000 g，30 min)获得的沉淀用蒸馏水洗至中性，再用 0.5 mol/L 乙酸溶液搅拌溶解 48 h，离心(12000 g，30 min)，将获得的上清通过盐析、透析、冻干，制备成酸溶性胶原蛋白(ASC)，而沉淀利用含不同质量浓度胃蛋白酶(0.02%、0.10%、0.50%、2.50%，*m/V*)的 0.5 mol/L 乙酸溶液搅拌溶解 48 h 后，通过离心(12000 g，30 min)获得的上清液经过盐析、透析、冻干即为酶溶性胶原(PSC)，分别记为 PSC-Ⅰ、PSC-Ⅱ、PSC-Ⅲ和 PSC-Ⅳ。各种胶原蛋白提取率按以下公式(1)计算。

提取率(%)=冻干后胶原蛋白质量/鲍鱼肌肉质量(湿重)×100% (1)

1.3.2 氨基酸组成

胶原蛋白利用 6 mol/L HCl 在 110 ℃真空条件下水解 22 h 后，通过自动氨基酸分析仪测定水解物的氨基酸组成，其羟脯氨酸含量利用试剂盒进行测定。

1.3.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳参照 Laemmli[11]报道的方法进行。其中浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4%和 8%。鲍鱼肌肉酶促溶性胶原蛋白利用含 2% SDS、8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)溶液进行溶解，配成蛋白含量为 0.5% (*m/V*)的电泳样品，电泳结束后，利用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

1.3.4 紫外吸收光谱

取一定量的样品溶于 0.1 mol/L 乙酸溶液，调配成 1 mg/mL 胶原蛋白溶液，以 0.1 mol/L 乙酸溶液作为空白，在 200~400 nm 区间利用紫外分光光度计对胶原蛋白溶液进行扫描。

1.3.5 粘度特性

参考 Nagai 等[12]报道的方法对胶原蛋白的粘度进行测定。胶原蛋白样品利用 0.1 mol/L 乙酸溶解并调配成终浓度为 0.1% (*m/V*)溶液，利用乌氏粘度计测定溶液在 10~45 ℃下通过毛细管所用的时间。按照下列公式计算溶液的增比粘度：

增比粘度 $\eta_{sp}=(t-t_0)/t_0$ (2)

式中，t 为胶原蛋白乙酸溶液通过毛细管所用的时间(s)，t_0 为 0.1 mol/L 乙酸通过毛细管所用的时间(s)。胶原蛋白的热变性温度(Td)为增比粘度变化一半时所对应的温度。

1.3.6 Zeta 电位

胶原蛋白 Zeta 电位的测定参考 Nalinanon 等[13]报道的方法并稍作修改。胶原蛋白用 0.5 mol/L 乙酸配成终浓度为 0.05% (*m/V*)溶液，利用 1.0 mol/L KOH 进行调节胶原溶液至一定的 pH (3~9)，用 Zeta 电位分析仪测定胶原蛋白溶液在不同 pH 下的 Zeta 电位。

相对溶解度(%)=(上清中蛋白含量/样品中蛋白含量)×100% (3)

1.3.7 胶原蛋白的溶解性

1.3.7.1 pH 的影响

pH 对胶原蛋白溶解性的影响参考 Zhu 等[14]报道的方法并稍作修改。胶原蛋白用 0.5 mol/L 乙酸调配成终浓度为 0.2% (*m/V*)的溶液，利用 2 mol/L NaOH 调节胶原溶液至一定的 pH (3~10)，离心(10000 g，30 min，4 ℃)后，用 Lowry 法测定不同 pH 下上清中蛋白的含量。按照如上公式(3)计算溶液的相对溶解度：

1.3.7.2 NaCl 的影响

NaCl 对胶原蛋白的溶解性的影响参考 Zhu 等[14]报道的方法并稍作修改。溶解在 0.5 mol/L 乙酸中的胶原溶液(0.2%，*m/V*)用 NaCl 溶液调节至一定的 NaCl 浓度(0~6%，*m/V*)，离心(10000 g，30 min，4 ℃)后，用 Lowry 法测定上清中蛋白的含量。按照公式(3)进行计算胶原在不同 NaCl 浓度下的相对溶解度。

1.3.8 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 提取率

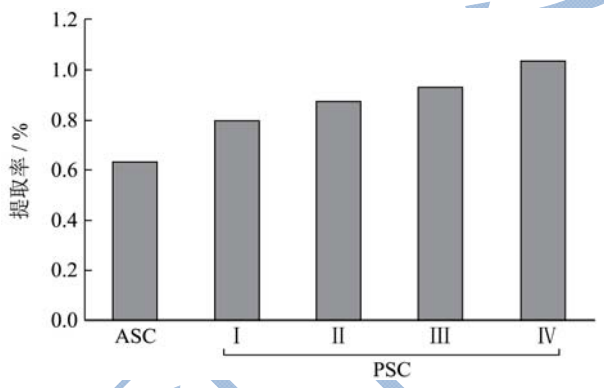


图 1 鲍鱼肌肉胶原蛋白的提取率

Fig.1 Extraction yield of collagens from abalone muscle

图 1 显示了鲍鱼肌肉酸溶性胶原(ASC)和酶溶性胶原(PSC)的提取率。由图可知，ASC 的提取率为 0.63%，低于任一 PSC(0.80~1.03%)，随着乙酸溶液中胃蛋白酶质量浓度的增加 PSC 的提取率呈上升趋势。这可能是 ASC 端肽中的 Lys、Hyl 与醛基形成高度交联[15]，导致鲍鱼肌肉胶原蛋白在乙酸中不易溶解。当添加了胃蛋白酶，交联被部分切断，使胶原蛋白容易溶解到乙酸溶液中。

2.2 氨基酸组成

表 1 显示了鲍鱼肌肉 ASC 和 PSC 的氨基酸组成。不管是鲍鱼肌肉 ASC 还是 PSC，Gly 含量都是最高，其次是 Glu，Pro，Hyp 和 Ala。通常，鱼皮 ASC 中 Gly 含量为 33.02~33.51%，约占氨基酸总量的 1/3[16]。然而，鲍鱼肌肉 ASC 中 Gly 含量仅达到 26.54%(表 1)，类似于 Elango 等[17]报道的白边真鲨头骨 ASC(Gly=27.36%)和崔凤霞等[18]报道的仿刺参体壁 PSC(Gly=26.50%)。当胃蛋白酶添加量为 0.02%，提取的 PSC-I 其 Gly 含量明显高于 ASC，而且进一步提高胃蛋白酶的添加量，PSC 中 Gly 含量出现一定程度的上升。然而，无论哪一种 PSC，其 Gly 含量都低于氨基酸总量的 1/3。从表 1 中还可看出，鲍鱼肌肉胶原蛋白中的 Ala 含量在 7.95~8.52%之间，低于大眼鲷鱼皮(13.60%)和鱼骨(12.90%)来源的胶原蛋白[19]。类似于木村和久保的研究结果[3]，鲍鱼肌肉胶原蛋白中 Gly+Ala 含量和 Pro+Hyp 含量都显著低于脊椎动物胶原蛋白，而 Cys 和 Tyr 含量较高，表明 Gly-Pro-Ala 和 Gly-Pro-Hyp 氨基酸序列在鲍鱼肌肉胶原的一级结构中数量较少。

表 1 鲍鱼肌肉酸溶性胶原(ASC)和酶溶性胶原(PSC)的氨基酸组成(个/1000 个)

Table 1 Amino acid compositions of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from abalone muscle (residues/1000 residues)

Amino acids	ASC	PSC			
		I	II	III	IV
Asp	62.83	56.35	58.04	59.60	60.56
Thr	25.72	18.08	17.84	18.42	21.11
Ser	53.68	51.89	52.32	54.18	55.39
Glu	95.29	90.82	94.58	93.98	94.28
Gly	265.40	294.16	313.13	314.05	310.30
Ala	79.71	80.47	84.99	85.21	79.52
Cys	14.12	16.30	12.22	12.03	12.43
Val	35.93	32.43	28.63	28.90	29.98
Met	27.62	30.92	24.00	25.19	23.71
Ile	23.09	20.01	18.14	18.53	22.24
Leu	40.50	36.89	33.84	33.97	34.08
Tyr	14.68	11.29	9.75	11.08	11.24
Phe	20.71	22.65	18.06	18.32	19.18
Lys	16.49	10.58	9.06	8.69	7.86
His	3.11	2.81	2.27	1.95	2.60
Arg	60.47	53.09	55.73	54.29	48.14
Pro	79.52	82.52	89.26	87.07	82.80
Hyp	81.15	88.72	78.16	74.54	84.58
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Gly+Ala	345.11	374.63	398.12	399.27	389.82
Pro+Hyp	160.67	171.24	167.42	161.60	167.38

2.3 SDS-PAGE

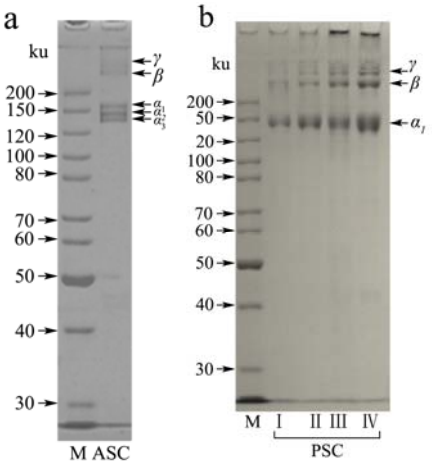


图 2 鲍鱼肌肉酸溶性胶原蛋白(a)和酶溶性胶原蛋白(b)的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of acid-soluble (a) and pepsin-soluble (b) collagens from abalone muscle

注：M 表示标准蛋白；M 表示 Standard molecular weight mixture。

由图 2a 可以看出，利用鲍鱼肌肉提取的 ASC 由分子量为 160 ku 的 α_1、140 ku 的 α_2 和 130 ku 的 α_3 及其交联形成的 β 和 γ 等肽链组成。这与 Rhods 等[20]报道的人类胎盘胶原蛋白(V 型)的 α 肽链的亚基构成类似。然而，在鲍鱼肌肉 PSC 中只发现 α_1 肽链(图 2b)，表明 PSC 可能是由三条 α_1 肽链及其交联物组成，类似于水产无脊椎动物胶原蛋白的特征[18]，由 3 条 α_1 肽链组成，与 Yoneda 等[21]报道的的鲍鱼肌肉 PSC 的结果一致。由图 2b 还可以发现随着胃蛋白酶添加量的增加，在提取的 PSC 中 α、β 和 γ 肽链以及未能进入浓缩胶的高分子聚合物的条带浓度呈上升趋势，表明胃蛋白酶可以促进鲍鱼肌肉胶原蛋白在乙酸溶液中的溶解。

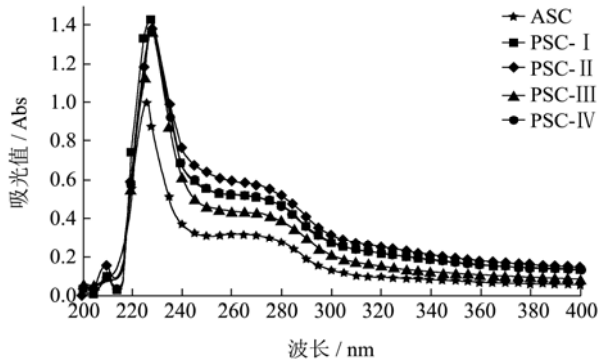


图 3 鲍鱼肌肉胶原蛋白的紫外吸收光谱

Fig.3 Ultraviolet absorption spectra of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from abalone muscle

2.4 紫外吸收光谱

图 3 显示了鲍鱼肌肉 ASC 和 PSC 的紫外吸收光谱。由于胶原分子中肽键 C=O 的 n→π*跃迁，ASC 在 224 nm 附近出现一个的特征吸收峰。然而，PSC 的特征吸收峰却偏移至 228 nm 处，且不随酶添加量的变化而改变，这可能是端肽被胃蛋白酶酶切断的缘故。由于鲍鱼肌肉 ASC 和 PSC 都含有一定的芳香族氨基酸(表 1)，因此它们在 250~290 nm 区间都有一个隆起的平峰。

2.5 粘度特性

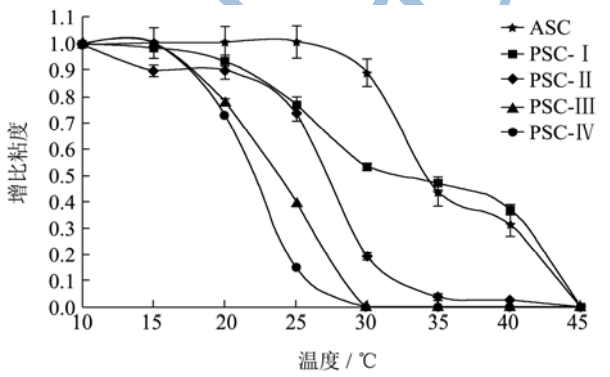


图 4 鲍鱼肌肉胶原蛋白的热变性曲线

Fig.4 Thermal denaturation curve of collagens from abalone muscle

从图 4 中可以看出，ASC 的增比粘度在温度超过 25 ℃后，开始出现缓慢下降，而 PSC-I 的增比粘度却在 20 ℃附近就开始出现缓慢下降。随着胃蛋白酶添加量的增加，提取的 PSC-Ⅱ、PSC-Ⅲ和 PSC-Ⅳ在温度升高的过程中增比粘度会出现一个急剧下降的现象，表明端肽被切断后的 PSC 三股螺旋结构稳定性明显下降。根据图 4 结果还可以得出，ASC、PSC-Ⅰ、PSC-Ⅱ、PSC-Ⅲ以及 PSC-Ⅳ的热变性温度(Td)分别为 34.23 ℃、31.74 ℃、27.31 ℃、23.75 ℃和 22.05 ℃，表明鲍鱼肌肉 PSC 的变性温度低于 ASC，且随着酶添加量的增加逐渐下降。

2.6 Zeta 电位

图 5 显示了鲍鱼肌肉胶原蛋白在不同 pH 下的 Zeta 电位。由图可知，ASC 的 Zeta 电位随着 pH 的上升而降低，在 pH 4.90 左右达到 0 并开始转变为负电位，表明 ASC 的等电点在 pH 4.90 左右。pH 对 PSC Zeta 电位的影响与 ASC 类似，但在 pH 3 时 PSC 的 Zeta 电位明显低于 ASC，而且随着胃蛋白酶添加量的增加呈上升趋势。这可能是因为 PSC 中酸性氨酸含量

(Glu+Asp，14.72~15.48%)低于 ASC(Glu+Asp，15.81%)的缘故[22]。然而，PSC 的等电点与 ASC 基本一致(图 5)，表明所提取的鲍鱼肌肉胶原蛋白酸性侧基和碱性侧基，α-氨基和 α-羧基数量大致相同。

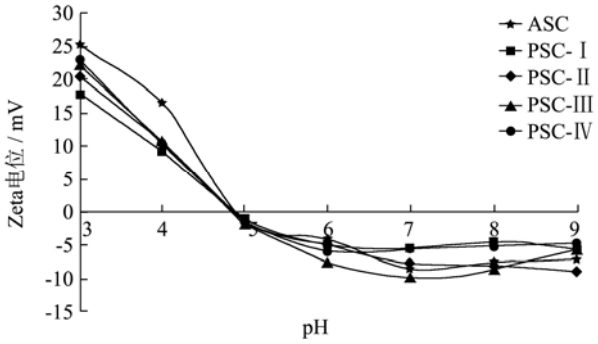


图 5 鲍鱼肌肉胶原蛋白在不同 pH 下的 Zeta 电位

Fig.5 Zeta potential of collagens from abalone muscle at different pH values

2.7 pH 和 NaCl 对胶原蛋白溶解性的影响

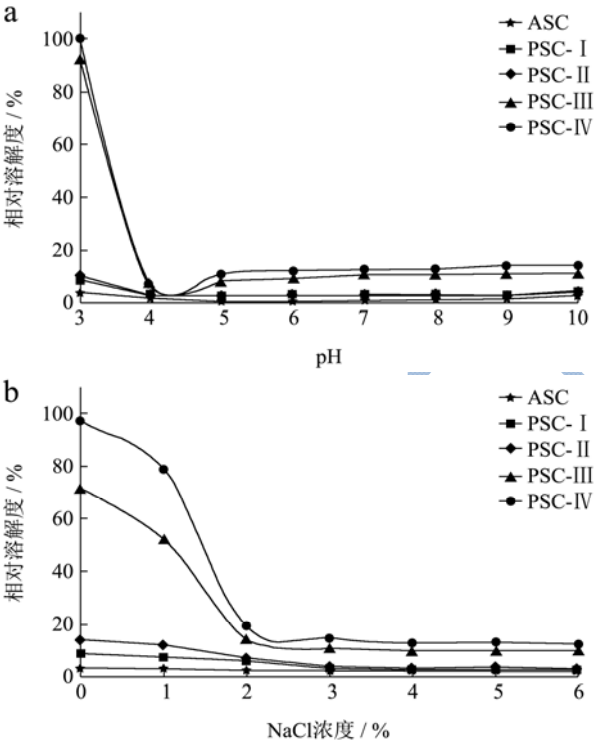


图 6 pH(a)和 NaCl (b)对鲍鱼肌肉胶原蛋白溶解性的影响

Fig.6 Effects of pH (a) and NaCl (b) on the solubility of collagens from abalone muscle

图 6a 显示了鲍鱼肌肉酸溶性胶原(ASC)和酶溶性胶原(PSC)在不同 pH 下的溶解性。由图可知，ASC 在 pH 3 下的溶解性低于 5%，而且随着 pH 的上升还呈下降的趋势。PSC 的溶解性受 pH 的影响趋势与 ASC 类似，但在 pH 3 下的溶解性明显高于 ASC。而且，随着胃蛋白酶添加量的增加 PSC 的溶解性出现上升，尤其 PSC-Ⅳ在 pH 3 下的溶解性接近 100%。这可能是 ASC 分子间的交联程度高于 PSC[23]。不管是哪一种鲍鱼肌肉胶原蛋白，在 pH 4 附近溶解性都是最低，这与利用 Zeta 电位分析仪测定的等电点(图 5)存在一定的差异，可能是因为两种方法的原理和精度不同。

图 6b 显示了 NaCl 浓度对鲍鱼肌肉胶原蛋白溶解性的影响。在任一 NaCl 浓度下 ASC 的溶解性都低于 5%。在 1% NaCl 浓度下，PSC-Ⅲ和 PSC-Ⅳ的溶解性明显高于 PSC-Ⅰ和 PSC-Ⅱ。当 NaCl 浓度从 1%升高到 2%，PSC 的溶解性出现急剧下降，在 NaCl 浓度为 2%左右就已经达到最低值，但进一步提高 NaCl 浓度 PSC 的溶解性不再出现明显的变化。值得注意的是，鲍鱼肌肉胶原蛋白的溶解性受 NaCl 浓度的影响比红鲷鱼鱼皮[23]、大眼鲷鱼皮和鱼骨[19]和绯鲍鲣鱼鳞[15]胶原蛋白显著。图 6 的结果再次表明，PSC 的溶解性高于 ASC，且与提取时的酶添加量呈正相关关系。

3 结论

从鲍鱼肌肉提取了酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC)，结果发现 ASC 的提取率和溶解性都低于 PSC，而热稳定性高于 PSC。ASC 的 α 亚基是由 α_1、α_2 和 α_3 肽链组成，而 PSC 则是由 3 条 α_1 肽链组成。同时，在氨基酸组成和紫外吸收光谱上 ASC 与 PSC 也存在一定程度的差异。在 PSC 的提取过程中还发现，随着胃蛋白酶添加量的增加，PSC 的提取率、溶解性和 Gly 含量都出现增加，但热稳定性却出现下降，而胃蛋白酶添加量对亚基组成、紫外吸收和蛋白等电点等没有明显的影响。这些结果将为进一步研究鲍鱼肌肉胶原蛋白的特性提供基础数据。

参考文献

[1] 中国渔业年鉴[M].北京:中国农业出版社,2015
China fisheries yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015

[2] Takayama Naoko, Yamamoto Yoshio, Kadowari Yodo, et al. Chemical components of abalone meat [J]. Journal of Home Economics of Japan, 1970, 21(4): 239-242

[3] Kimura Shigeru, Kubota Minoru. Some properties of collagen from the abalone [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1968, 34(10): 925-929

[4] Yoneda C, Ahsan M, Nakaya M, et al. Abalone collagens: immunological properties and seasonal changes of their mRNA levels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2000, 126(1): 59-68

[5] Porturas R O, Ushio H, Watabe S, et al. Toughness and

collagen content of abalone muscles [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(1): 6-11

[6] Gao X, Ogawa H, Tashiro Y, et al. Rheological properties and structural changes in raw and cooked abalone meat [J]. Fisheries Science, 2001, 67: 314-320

[7] Gao X, Tashiro Y, Ogawa H. Rheological properties and structural changes in steamed and boiled abalone meat [J]. Fisheries Science, 2002, 68: 499-508

[8] Gao X, Tashiro Y, Ogawa H. The correlation rheological properties and characteristic values of structure for steamed abalone meat [J]. Food Science and Technology Research, 2002, 8: 304-310

[9] Yoneda C, Hirayama Y, Nakaya M, et al. The occurrence of two types of collagen pro *α*-chain in the abalone *Haliotis* discus muscle [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 261: 714-721

[10] Dong X, Yuan Q, Qi H, et al. Isolation and characterization of pepsin-soluble collagen from abalone (*Haliotis discus hannai*) gastropod muscle part II [J]. Food Science and Technology Research, 2012, 18(2): 271-278

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

[12] Nagai T, Suzuki N, Tanoue Y, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skins of surf smelt (*Hypomesuspretiosus japonicas Brevoort*) [J]. Food and Nutrition Sciences, 2010, 1: 59-66

[13] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammusazonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnusalalunga*) stomach [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(9): 1492-1500

[14] Zhu B W, Dong X P, Zhou D Y, et al. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicas* [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 182-188

[15] Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, et al. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneusheptacanthus*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 1179-1186

[16] Tang L, Chen S, Su W, et al. Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(1): 148-155

[17] Jeevithan E, Wu W, Wang N, et al. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinusalbimarginatus*) skeletal and head bone and pepsin [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(49): 1767-1777

[18] 崔凤霞,薛长湖,李兆杰,等.仿刺参胶原蛋白的提取及理化性质[J].水产学报,2006,30(4):549-553
CUI Feng-xia, XUE Chang-hu, LI Zhao-jie, et al. Extraction and the physical and chemical characterization of collagen in *Stichopusjaponicas* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 549-553

[19] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthustayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372

[20] Rhodes R, Edward J. Evidence for the existence of an *α*l(V)*α*2(V)*α*3(V) collagen moleeulein human placental tissue [J]. Collagen and Related Research, 1981, 1(4): 337-343

[21] Chie T Y, Shugo W, Misako N, et al. Isolation and characterization of a 148 ku protein possibly participating in collagen metabolism of abalone adductor muscle [J]. Fisheries Sience, 1997, 63(1): 115-121

[22] 蒋挺大.胶原与胶原蛋白[M].北京:化学工业出版社,2006
JIANG Ting-da. Collagen and collagen protein [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006

[23] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanusvitta*) [J]. Food Chemistry, 2005, 93(3): 475-484