

海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究

侯虎, 孙江, 毛家楠, 李倩倩, 薛长湖

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘要: 海参体壁除水分外主要成分是胶原蛋白, 对其理化性质研究将为海参加工提供理论基础。本文以鲜活刺参为原料, 通过组织学方法分析了其体壁胶原纤维特征, 采用胃蛋白酶促溶法提取海参胶原蛋白, 并对其理化性质进行分析。研究表明, 海参体壁中以胶原纤维为主, 呈网状排列, 少见肌原纤维; 海参胶原蛋白的紫外特征吸收峰位于 235 nm 处, 在 280 nm 附近吸收峰较小; 傅立叶红外光谱显示其保持三螺旋结构; 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示海参胶原蛋白分子组成为 $(\alpha_1)_3$, 且不含二硫键, α_1 链的分子量约为 135 kDa; 氨基酸组成以甘氨酸含量最高 (33.3%), 脯氨酸与羟脯氨酸含量为 16.4%, 符合水产胶原蛋白特征; 海参胶原蛋白热收缩温度 (T_s) 为 67.56 °C, 高于狭鳕鱼皮胶原蛋白, 海参热变性温度 (T_d) 为 22.3 °C, 与狭鳕鱼皮胶原蛋白类似。

关键词: 胶原蛋白; 性质; 热稳定性; 结构; 海参

文章编号: 1673-9078(2013)7-1491-1495

Collagen Fibers Morphology and Physical and Chemical Properties of Collagen of Sea Cucumber

HOU Hu, SUN Jiang, MAO Jia-nan, LI Qian-qian, XUE Chang-hu

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Collagen is the main component of sea cucumber body wall, and the study of its physical and chemical properties will provide theoretical basis for processing sea cucumber. The characteristics of collagen fibers of sea cucumber were analyzed by histological method and sea cucumber collagen was extracted by pepsin-solution method for analysis of their physical and chemical properties. Sea cucumber body wall was mainly composed of collagen fibers which exhibited reticular arrangement, and little myofibril was found. Ultraviolet-visible absorption spectra exhibited a maximum absorbance at 235 nm, but little absorbance near to 280 nm. FT-IR demonstrated the existence of triplehelix structure. SDS-PAGE pattern showed that the structure of sea cucumber collagen was $(\alpha_1)_3$ which was absence of disulphide bonds, and the molecular weight of α_1 chain was about 135 kDa. Amino acid composition analysis indicated that the content of glycine was high (33.3%), and the level of proline and hydroxyproline was 16.4%, in accordance with the aquatic collagen characteristics. The shrinkage temperature (T_s) of sea cucumber collagen was 67.56 °C, higher than that of pollock skin collagen, and the denaturation temperature (T_d) was 22.3 °C, similar to that of pollock skin collagen.

Key words: Collagen; characterization; thermal stability; structure; sea cucumber

海参 (Sea cucumber), 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothurioider) 木盾手目 (Aspidochirota) 生物。全世界约有 900 多种海参, 我国约 140 多种, 其中可供食用者约有 40 多种。海参是天然营养的宝库, 具有较高的营养价值和药用价值^[1]。目前研究发现海参具有延缓衰老、调节免疫力、防止动脉硬化、降血脂、缓解疲劳等功效。随着人们生活水平的提高, 越来越多的消费者把海参作为一种

收稿日期: 2013-04-06

基金项目: 中国博士后基金面上项目 (2012M511549); 长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT1188); 中央高校青年教师科研专项基金项目 (201313002)

作者简介: 侯虎 (1984-), 男, 博士后, 讲师, 水产胶原蛋白及活性肽

通讯作者: 薛长湖 (1964-), 男, 博士, 教授, 水产品加工

养生食品, 使海参的需求量逐年加大, 同时也带动了海参养殖业与加工业的飞速发展。2003 年我国海参总产量约为 3.9 万 t, 2004 年达 5.3 万 t, 增幅达 36.87%, 2008 年已达到 9 万 t。2009 年山东和辽宁刺参产量已经超过 7 万 t, 产值突破 200 亿元。海参体壁可食用的主要部分是胶原蛋白, 海参的很多加工特性都与海参体壁胶原蛋白密不可分。

胶原蛋白是动物体内含量最多、分布最广的蛋白质, 由三条肽链螺旋形成的纤维状蛋白, 是细胞外基质的主要成分^[2], 在水产无脊椎动物中分布较为广泛的胶原蛋白类型是类 I 型和类 V 型胶原。Matsumura 指出海参胶原蛋白与脊椎动物胶原蛋白相比, 具有显著的难溶性, 其理化性质和亚基组成研究较少^[3]。毕

琳等通过工艺优化确定了胃蛋白酶法提取刺参胶原蛋白的最佳条件: pH 2.0、温度 4 °C、料液比 1:10、加酶量 6%、提取时间 48 h, 制备的刺参胶原蛋白最大程度地保持了其天然结构。崔凤霞等将提取的海参胶原蛋白经 DEAE-52 纯化, 得到除去粘多糖的胶原蛋白纯品。关于海参胶原蛋白的类型, Saito 等及 Trotter 等曾分别对日本仿刺参(*S. japonicus*)及加州海参(*C. frondosa*)胶原特性进行研究, 但得到的胶原蛋白构型结果不一致, 尚待进一步研究。在热加工过程中, 海参的组织结构和流变学性质等随着热处理条件的变化而发生明显变化, 这主要是由于胶原蛋白的结构与理化性质所导致的^[4], 因此海参胶原蛋白的分离及理化性质进一步研究, 将为海参的加工与贮藏提供科学依据和参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜的刺参购于青岛南山水产市场。三羟甲基氨基甲烷、碳酸氢铵、尿素、冰醋酸、考马斯亮蓝 G-250、 β -巯基乙醇、过硫酸铵、丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠、 KH_2PO_4 、HCl 等试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

PHS-3C 精密酸度计, 上海虹益仪器仪表有限公司; BR4i 型冷冻离心机, 法国 Jouan 公司; HJ-2 磁力加热搅拌器, 国华电器有限公司; BX51 光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; Hitachi 835-50 氨基酸自动分析仪, 日本日立公司; DYY-6C 电泳仪, 北京市六一仪器厂; DSC-200PC 差示扫描量热仪, 德国 NETZSCH 公司; Nicolet-200SXV 傅立叶红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; UV-2102PC 分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 海参胶原纤维的 VG 染色

切片制作: 锐利刀片制备 0.5 cm \times 0.5 cm 大小的新鲜海参体壁组织块, 4% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 7 μm 切片。Van Gieson 染色流程: 常规脱腊及复水, Weigert 苏木素液染 5~10 min \rightarrow 自来水冲洗 2 min \rightarrow 蒸馏水洗 \rightarrow Van Gieson 液染 5 min \rightarrow 95% 乙醇分色和脱水 \rightarrow 100% 酒精(I) 5 min \rightarrow 100% 酒精(II) 5 min \rightarrow 二甲苯(I) \rightarrow 二甲苯(II) \rightarrow 中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照^[5]。

1.3.2 海参胶原蛋白的制备^[2]

取鲜活海参体壁切成小块(300 g), 于蒸馏水中搅拌 30 min, 用纱布滤出, 再加入蒸馏水重洗一次, 然后将海参碎块放于 4 mmol/L EDTA, 0.1

mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中, 搅拌过夜。过滤, 蒸馏水洗 2 次, 置于蒸馏水中搅拌过夜, 溶液中即充满絮状胶原纤维, 滤出未解离的海参块, 离心将沉淀加入 0.1 mol/L NaOH, 搅拌 3 d。9000 r/min 离心 60 min, 沉淀水洗至中性, 加入一定体积的 0.5 mol/L 乙酸, 加入 0.5% 的胃蛋白酶, 搅拌、消化 2 d。9000 r/min 离心 20 min, 上清液边搅拌边缓慢加入研磨精细的 NaCl (终浓度为 0.8 mol/L), 搅拌过夜。离心收集沉淀溶于 0.5 mol/L 醋酸中, 用 0.1 mol/L 醋酸透析 1 d, 再用蒸馏水透析 2 d, 冻干。以上所有操作均在 4 °C 下进行。

1.3.3 紫外-可见吸收光谱分析

称取胶原蛋白冻干品 5 mg, 将其溶解在 5 mL 的 0.5 mol/L 的醋酸溶液中, 9000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用紫外分光光度计进行紫外光谱扫描测试。

1.3.4 氨基酸组成分析

取一定量的胶原蛋白至安培瓶中, 加 6 mol/L 盐酸, 密封后在 110 °C 水解 24 h, 反复减压蒸干去掉 HCl。然后用 1 mL pH 2.2 的磷酸缓冲液溶解, 定容后过滤, 用氨基酸自动分析仪进行测定^[6]。

1.3.5 傅立叶变换红外光谱(FTIR)分析

将一定量干燥的 KBr 和胶原蛋白冻干品置于玛瑙研钵中, 研磨均匀, 手动压片, 采用傅立叶红外光谱仪对样品在 4000~500 cm^{-1} 扫描, 分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.3.6 胶原蛋白热收缩温度的测定

用 DSC-200PC 型差示扫描量热仪进行胶原蛋白热收缩温度(T_s)测试, 仪器采用金属铟进行校正(铟的熔融焓为 28.451 J/g, 熔点为 156.4 °C)。精确称取 10 mg 左右的样品于 DSC 坩埚中, 坩埚加盖密封后, 以空坩埚作为参比, 从 20 °C 加热至 100 °C, 升温速率为 5 K/min, 样品室的氮气流量为 20 mL/min^[6]。

1.3.7 胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳

采用 SDS-PAGE 方法分析海参胶原蛋白样品, 用 7.5% 的分离胶、5% 的浓缩胶, 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3, 含 0.1% SDS), 样品缓冲液为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 染色液为 0.1% 的考马斯亮蓝 R250-甲醇-冰醋酸(9:9:2, V/V/V); 脱色液为水-甲醇-冰醋酸(8:1:1, V/V/V)。取冷冻干燥样品 1 mg 溶于 0.5 mol/L 的醋酸溶液中, 调节 pH 为中性, 加入样品缓冲液, 沸水浴煮沸 5 min, 5000 r/min 离心 5 min 取 20 μL 上样。采用直流恒压电源, 电压为 100 V^[6-7]。

1.3.8 胶原蛋白热变性温度的测定

胶原蛋白的热变性温度通过乌氏粘度计测定。将 0.05% 胶原蛋白溶液(0.1 mol/L 醋酸缓冲液配制)从 16 °C 逐渐升高温度至 42 °C, 在每个测定温度保持

30 min, 然后测定溶液通过毛细管所用的时间, 重复测试三次。相对粘度 $\eta_r = t/t_0$, 增比粘度 $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = (t - t_0)/t_0$, 其中, t 是样品溶液流出的时间, t_0 是溶剂流出的时间。以 Fractional viscosity = $[\eta_{sp}(T) - \eta_{sp}(42^\circ\text{C})]/[\eta_{sp}(16^\circ\text{C}) - \eta_{sp}(42^\circ\text{C})]$ 与温度作胶原蛋白热变性曲线, Fractional viscosity=0.5 时所对应的温度即为热变性温度 (Td) [8]。

2 结果与讨论

2.1 海参体壁胶原纤维分布

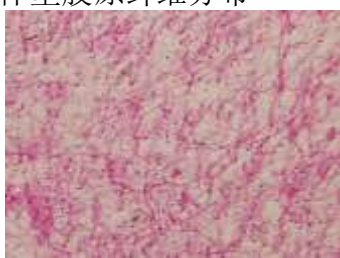


图1 海参体壁胶原纤维

Fig.1 Collagen fiber of body wall of sea cucumber

如图1所示, 海参体壁经 Van Gieson 染色后, 主要为红色的胶原纤维, 呈网状排列, 少见黄色的肌纤维。已有研究表明海参中胶原纤维的长度在 30 μm ~1 mm 变化, 具有对称的梭形形状, 平均长度与纤维直径的比为 2000~2500 [9]。海参的胶原纤维的间隙区中间结合有粘多糖(GAGs), 海参胶原纤维具有广泛的交联作用。

2.2 海参体壁胶原蛋白的紫外-可见吸收光谱分析

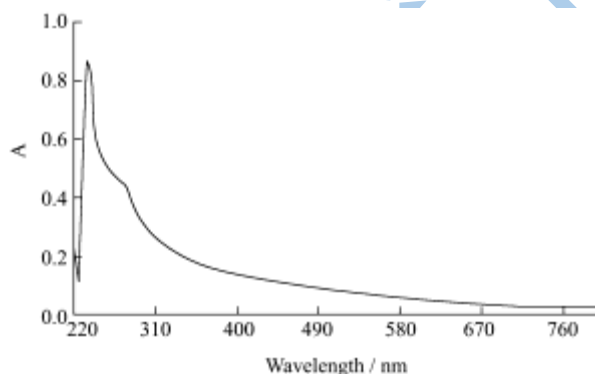


图2 海参胶原蛋白的紫外-可见光谱图

Fig.2 Ultraviolet-visible absorption spectra of pepsin-soluble collagen from body wall of sea cucumber

海参胶原蛋白的特征吸收波长位于 235 nm 处(见图2), 主要是由肽键 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所贡献 [6]。这与海蜇中酶促溶胶原蛋白的最大吸收峰类似 [10]。蛋白质中酪氨酸、苯丙氨酸的最大紫外吸收分别为 283 nm 和 251 nm [6], 但是海参胶原蛋白在此吸收较少, 表明胶原蛋白芳香族氨基酸含量较少。本研究所提取的胶

原蛋白的紫外吸收光谱特性与已报道的胶原蛋白的紫外吸收特征一致 [6,10], 因此可以初步推断所提取的蛋白质为典型的胶原蛋白。

2.3 海参体壁胶原蛋白的氨基酸分析

胶原蛋白的氨基酸组成有一个显著特点, 具有羟脯氨酸和羟赖氨酸, 在其它蛋白质中含量很少。甘氨酸几乎占总氨基酸残基的三分之一, 其肽链用 (甘-X-Y) $_n$ 来表示 [2]。如表1所示, 海参胶原蛋白有着典型胶原蛋白氨基酸的组成, 其中 Gly 含量最高, 约占氨基酸总量的 1/3; Ala、Glu、Pro、Hyp 和 Asp 含量较高, 而 His、Tyr 和 Met 含量较低, 缺乏 Trp。亚氨酸(脯氨酸和羟脯氨酸)是胶原蛋白的特征性氨基酸, 含量为 16.4%, 符合水产胶原蛋白特征, 与鳕鱼皮胶原蛋白的 18.4% 接近 [6], 但低于猪皮胶原蛋白的 22% [11] 和牛皮胶原蛋白的 21.7% [11]。羟脯氨酸不是以现成的形式参与胶原的生物合成, 而是从已经合成的胶原肽链中的脯氨酸经羟化酶作用转化而来的 [3]。海参胶原蛋白中脯氨酸羟化程度为 47.2%, 低于河豚鱼皮的 60.92% [12], 高于红鳍东方鲀鱼皮的 39% [13]。

表1 海参胶原蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of pepsin-soluble collagen from body wall of sea cucumber

氨基酸名称	含量 ^a	氨基酸名称	含量 ^a
天门冬氨酸	67.8	异亮氨酸	16.2
苏氨酸	35.5	亮氨酸	16.6
丝氨酸	41.8	酪氨酸	6.7
谷氨酸	107.8	苯丙氨酸	3.8
甘氨酸	333.3	赖氨酸	5.1
丙氨酸	112	组氨酸	2.5
缬氨酸	26.6	精氨酸	53
蛋氨酸	7.5	色氨酸	/
羟脯氨酸	77.3	脯氨酸	86.5

注: ^a: 氨基酸残基/1000 总氨基酸残基

2.4 海参胶原蛋白的傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 分析

如3所示, 胶原蛋白在 3422 cm^{-1} 处的吸收峰是酰胺 A 带的 N-H 伸缩 (氢键) 振动, 3052 cm^{-1} 的弱吸收为酰胺 B 带的 C-H 不对称伸缩振动产生的特征性吸收峰, 酰胺 I 带的特征吸收波数通常在 1680~1630 cm^{-1} 是由蛋白多肽的骨架 C=O 伸缩振动引起的, 海参胶原蛋白的酰胺 I 带的波数在 1662 cm^{-1} , 符合酰胺 I 带的出峰位置, 酰胺 I 带通常不受肽链侧基影响, 振动频率取决于肽链构型, 对三螺旋结构的变化非常敏感。海参胶原蛋白的酰胺 II 带的波数在 1550 cm^{-1} , 主要由胶原蛋白的 C-N 伸缩振动和异相 N-H 弯曲振动

引起的。海参胶原蛋白显示了在 1239 cm^{-1} (酰胺III带) 和 1453 cm^{-1} 均有吸收, 这表明海参胶原蛋白的螺旋结构保持较好^[14]。酰胺III带主要由同相 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动共同引起的, 此外还含些许 C-O 面内弯曲振动和 C-C 伸缩振动。此谱带的振动组成比较复杂, 侧链结构对其有不同程度的影响, 但此谱带仍可用于蛋白质二级结构预测。红外谱图的结果也证明了在提取过程中胃蛋白酶仅水解胶原的非螺旋区, 对螺旋区没有破坏。

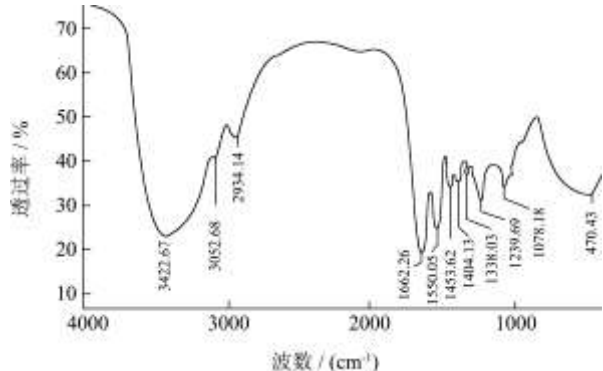


图3 海参胶原蛋白的红外光谱图

Fig.3 FTIR spectrogram of collagen from body wall of sea cucumber

2.5 胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳

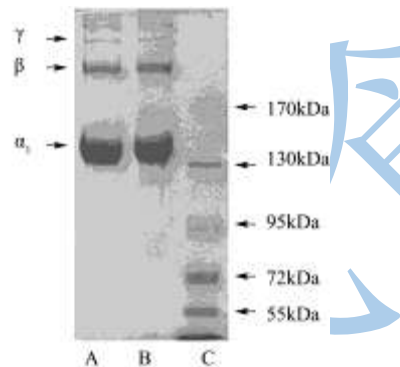


图4 海参胶原蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE patterns of collagen from body wall of sea cucumber

注: A: 胶原蛋白含 β -巯基乙醇; B: 胶原蛋白无 β -巯基乙醇; C: 次高分子量标准。

如图4所示, 海参胶原主要含 β 及 α 链, 少量 γ 链, 与文献报道的结果一致^[3]。 α_1 链的分子量为 135 kDa, 未见 α_2 链, 因此胶原蛋白分子组成可能为 $(\alpha_1)_3$ 。A 与 B 的电泳图谱完全一致, 巯基乙醇的添加对胶原蛋白的提取无影响, 这说明在海参胶原三螺旋区无二硫键, 与海蜇胶原蛋白分子结构类似^[15]。

2.6 胶原蛋白的热稳定性

胶原蛋白的热稳定性通常是由胶原蛋白溶液的热变性温度 (Td) 和胶原蛋白的热收缩温度 (Ts) 来表

达。胶原蛋白受热后其二、三、四级结构遭到破坏而导致变性。Td 为增比粘度变化一半时的温度, Ts 为胶原纤维收缩至 1/3 长度时的温度。由图5可知, 海参胶原蛋白的 Ts 为 $67.56\text{ }^\circ\text{C}$, 高于狭鳕鱼皮胶原蛋白 $46.96\text{ }^\circ\text{C}$ ^[6]。

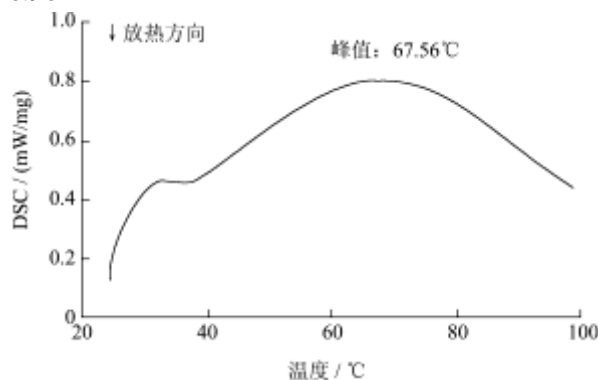


图5 海参胶原蛋白的 DSC 曲线

Fig.5 DSC curve of pepsin-soluble collagen from body wall of sea cucumber

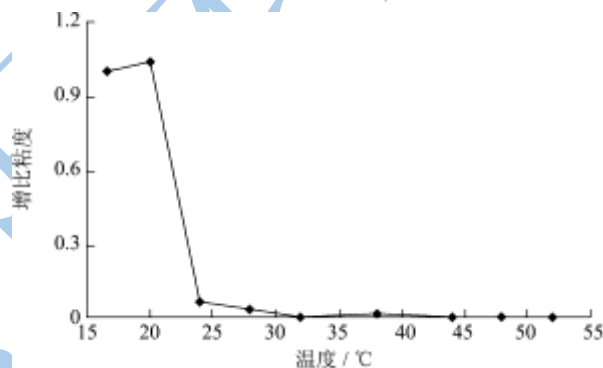


图6 海参胶原蛋白的热变性曲线

Fig.6 Thermal denaturation curve of pepsin-soluble collagen from body wall of sea cucumber

海参胶原蛋白的热变性温度 (Td) 为 $22.3\text{ }^\circ\text{C}$, 与狭鳕鱼皮 (Td, $24.6\text{ }^\circ\text{C}$)^[6] 的热变性温度相似, 低于鳕鱼皮 ($39.6\text{ }^\circ\text{C}$)^[16]、草鱼皮 (Td, $28.4\text{ }^\circ\text{C}$)^[8] 等胶原蛋白。热稳定性主要由亚氨基酸的含量来决定, 亚氨基酸的含量越高, 其三螺旋的胶原蛋白结构越稳定。这主要与脯氨酸和羟脯氨酸的吡咯环对其三级结构的限制以及羟脯氨酸的羟基所形成的氢键来稳定其三级结构有关^[8]。

3 结论

- 3.1 海参体壁主要为红色的胶原纤维, 呈网状排列。
- 3.2 海参胶原蛋白的紫外特征吸收波长位于 235 nm 处, 氨基酸含量以甘氨酸含量最高, 亚氨基酸含量为 16.4%, 脯氨酸羟基化程度为 47.2%, 其红外光谱主要特征吸收峰酰胺 I 带、酰胺 II 带、酰胺 III 带的波数分别为 1662 cm^{-1} 、 1550 cm^{-1} 、 1239 cm^{-1} 。

3.3 海参胶原蛋白分子结构为 $(\alpha_1)_3$, 无二硫键, 且胶原蛋白的热变性温度 T_d 较低为 $22.3\text{ }^\circ\text{C}$, 热收缩温度 T_s 为 $67.56\text{ }^\circ\text{C}$ 。

参考文献

- [1] 刘昌衡,王小军,袁文鹏,等.复方海参口服液的抗疲劳和免疫功能的研究[J].现代食品科技,2009,25(10):1115-1119
Liu C H, Wang X J, Yuan W P, et al. Anti-fatigue and Immune Functions of Sea Cucumber Oral Liquid [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(10): 1115-1119
- [2] 汤克勇.胶原物理与化学[M].北京:科学出版社,2012
Tang K Y. Collagen Physics and Chemistry [M]. Beijing: Science Press, 2012
- [3] 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 F X, Xue C H, Li Z J, et al. Extraction and the physical and chemical characterization of collagen in *Stichopus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 549-553
- [4] Matsumura T. Collagen fibrils of the sea cucumber, *Stichopus japonicus*: purification and morphological study [J]. Connective Tissue Research, 1974, 2(2): 117-125
- [5] 张锦生.现代组织化学原理及应用[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003
Zhang J S. The principle and application of modern histochemistry [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House, 2003
- [6] Yan M, Li B, Zhao X, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1581-1586
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [8] Zhang Y, Liu W T, Li G Y, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 906-912
- [9] Trotter J A, Koob T J. Biochemical characterization of fibrillar collagen from the mutable spine ligament of the sea-urchin [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1994, 107: 125-134
- [10] 刘磊,陈伟.海蜇胶原蛋白的提取及纯化(英文)[J].天然产物研究与开发,2011,23:72-75
Liu L, Chen W. Extraction and Isolation of Pepsin-solubilised Collagen from Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) [J]. Natural Products Research and Development, 2011, 23: 72-75
- [11] Li Z R, Wang B, Chi C F, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 103-113
- [12] Huang Y R, Shiau C Y, Chen H H, et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*) [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25 (6): 1507-1513
- [13] Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) [J]. Food Chemistry, 2002, 78(2): 173-177
- [14] 段蕊,张俊杰,陈玲,等.鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白的性质比较[J].食品与发酵工业,2008, 34(5):10-13
Duan R, Zhang J J, Chen L, et al. Characteristics Comparison of Pepsin-soluble Collagen from Skin and Bone of Carp (*Cyprinus Carpio*) [J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(5): 10-13
- [15] Zhuang Y, Hou H, Zhao X, et al. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(6): 183-188
- [16] Singh P, Benjakul S, Maqsood S, et al. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 97-105