

鲟鱼皮胶原蛋白的理化特性研究

陈明辉¹, 汤海青², 欧昌荣¹, 曹锦轩¹

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211) (2. 浙江医药高等专科学校, 浙江宁波 315100)

摘要: 本文以俄罗斯鲟鱼皮为原料, 采用酸法和酶法提取胶原蛋白, 研究了酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶促溶性胶原蛋白(PSC)的蛋白类型、结构、热变性温度和溶解度等理化性质, 并与牛跟腱I型胶原蛋白(BATC)进行比较。SDS-PAGE电泳图显示ASC和PSC均包含了两条 α 链(α_1 链和 α_2 链), 为I型胶原蛋白; 傅立叶红外光谱图表明提取的2种胶原蛋白均保存了完整的三螺旋结构, 但ASC的有序度相对较高; ASC和PSC的热变性温度分别为32.48℃和32.68℃, 低于BATC; 在酸性pH条件下(pH 1~4), ASC和PSC溶解度较高, 当NaCl浓度大于2%时, PSC的溶解度较高; 扫描电镜显示2种胶原蛋白均为网状结构, ASC的孔径较均匀, 且孔径较小。上述结果表明提取方法不同, 导致2种胶原蛋白的理化性质具有一定的差异, 但都具有较好的热稳定性、溶解性, 能形成较好的网状结构, 有潜力的作为胶原蛋白的替代来源。

关键词: 鲟鱼皮; 酸溶性胶原蛋白; 酶促溶性胶原蛋白; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2015)12-191-196

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.029

Physicochemical Properties of Collagen from the Skin of *Acipenser gueldenstaedtii*

CHEN Ming-hui¹, TANG Hai-qing², OU Chang-rong¹, CAO Jin-xuan¹

(1. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

Abstract: The skin of *Acipenser gueldenstaedtii* was used as the raw material in this study, and collagens were extracted using acid and pepsin extraction methods. The protein type, structure, thermal denaturation temperature, solubility, and other physicochemical properties of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) were studied and compared with those of bovine achilles tendon type I collagen (BATC). SDS-PAGE patterns revealed that both ASC and PSC contained two typical α chains (α_1 chain and α_2 chain) and were type I collagens. The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) results indicated that both extracted collagens had a triple helical structure, but ASC had a higher degree of molecular order. The denaturation temperatures of ASC and PSC were 32.48 °C and 32.68 °C, respectively, which were lower than that of BATC. Both ASC and PSC had a relatively high solubility at acidic pH (pH 1~4). PSC had a higher solubility when the NaCl concentration was higher than 2%. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the two collagen sponges had a network structure, and the pore size of ASC was relatively uniform and small. These results indicate that different extraction methods may lead to certain differences in the physicochemical properties of ASC and PSC; however, both collagens have good thermal stability and solubility, as well as the ability to form a better network structure than BATC. Therefore, the skin from *Acipenser gueldenstaedtii* can serve as an alternative source of collagens.

Key words: *Acipenser gueldenstaedtii* skin; acid soluble collagen; pepsin soluble collagen; physicochemical properties

胶原蛋白是脊椎动物体内含量最丰富的蛋白质, 广泛分布于动物骨、肌腱、血管壁、软骨和皮肤等结缔组织中, 其分子结构为天然的三螺旋构型。胶原蛋

收稿日期: 2015-03-08

基金项目: 浙江省中青年学科带头人学术攀登项目(pd2013100); 宁波市农业重大择优委托攻关项目(2012C10024); 企业横向项目(HK2013000105)

作者简介: 陈明辉(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工新技术

通讯作者: 欧昌荣(1974-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向: 水产品加工新技术, 食品风味化学

白具有多种生物活性与良好的生物相容性, 是化妆品、生物医学、食品和制药等行业的重要原辅料之一。现已发现23种类型胶原蛋白, 其中I型、II型、III型和V型胶原蛋白呈纤维状。I型胶原蛋白由2条不同的 α 链组成, 占生物体胶原蛋白总量的85%以上, 是研究和应用最为广泛的胶原蛋白。制备胶原蛋白的原料主要来源于哺乳动物如牛皮、猪皮和骨头。近年来, 随着家畜中传染性海绵状脑病和口蹄疫等疾病的爆发, 消费者对陆生动物来源的胶原蛋白制品的安全性缺乏信心, 另外, 由于宗教信仰的禁戒, 一部分人拒

绝使用来源于猪或者牛的胶原蛋白,且由于国内外对胶原蛋白的市场需求持续升高,利用鱼类加工副产物提取胶原蛋白逐渐成为研究的热点。

俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*),隶属于脊索动物门(*Chordata*)辐鳍鱼纲(*Actinopterygii*)鲟形目(*Acipenseriformes*)。自然界约有30种鲟鱼,我国约8种,主要分布于江河及沿海。人工养殖的鲟鱼主要有西伯利亚鲟、闪光鲟、俄罗斯鲟、史氏鲟、达氏鳇、匙吻鲟和几种杂交鲟等。据FAO统计,2010年我国鲟鱼养殖总量占世界总产量的80%以上,鲟鱼加工业每年将产生近700t的鱼皮副产物^[1],加工厂对鱼皮副产物的利用程度不高,甚至直接废弃掉,这样既造成了资源的浪费又造成了环境的污染。鲟鱼皮中蛋白质含量占干重的85%,其中胶原蛋白占总蛋白质的60%左右,是一种优质的胶原蛋白原料^[2]。目前对于鲟鱼皮胶原蛋白的研究还相对较少,为此本实验以人工淡水养殖的鲟鱼皮为原料,利用酸法和胃蛋白酶法提取胶原蛋白,分析了理化性质,以期更加深入了解鲟鱼皮胶原蛋白的理化性质,为拓展胶原蛋白的新来源,促进鲟鱼副产物的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

俄罗斯鲟鱼由浙江省新昌县来益生态农业发展有限公司提供。剥下鱼皮并剔除皮下组织,用清水洗净鱼皮表面的血及黏液,储存于-20℃备用。

牛跟腱I型胶原蛋白标准品和溴化钾等为Sigma进口分装;胃蛋白酶(3000 U/mg)为北京索莱宝科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

傅立叶红外光谱仪, Tensor27型,德国Bruker公司;差示扫描量热仪, DSC20F3,德国Maia公司;紫外分光光度计, Cary100型,美国瓦里安中国有限公司;扫描电子显微镜, TM3000,株式会社日立制作所;电泳仪, EPS301,美国Amersham Bioscience公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鲟鱼皮酸溶性和酶促溶性胶原蛋白的制备

参考Singh的方法略有改动^[3],称取鱼皮200g,剪成碎片,放入锥形瓶中,加入15倍体积的0.1 mol/L的NaOH溶液,搅拌24h,用蒸馏水洗至中性,过滤,

将不溶物浸泡在15倍体积的10%正丁醇溶液中,搅拌48h,用蒸馏水洗净正丁醇。过滤,将不溶物浸泡在15倍体积的0.5 mol/L醋酸溶液中,搅拌提取40h,将提取液10000g离心30min,上清液中加入NaCl至其最终浓度为0.9 mol/L,10000g离心30min,沉淀复溶于0.5 mol/L醋酸溶液中,将以上溶液转入透析袋,先用0.1 mol/L醋酸溶液透析1d,每6h换一次透析液,再用蒸馏水透析4d,每6h换一次透析液,干燥后即得酸溶性胶原蛋白。将上述试验第一次离心所得沉淀再溶于15倍体积的0.5 mol/L醋酸溶液中,加入1%胃蛋白酶(*m/V*),搅拌抽提48h,离心(10000g×30min),上清液中加入NaCl至其最终浓度为0.9 mol/L,10000g离心30min,沉淀复溶于0.5 mol/L醋酸溶液中,将以上溶液转入透析袋,先用0.1 mol/L醋酸溶液透析1d,每6h换一次透析液,再用蒸馏水透析4d,每6h换一次透析液,干燥后即得酶促溶性胶原蛋白。以上操作均在4℃条件下进行。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳分析

参考Singh的方法略有改动^[3],取1.0mg冷冻干燥的胶原蛋白加入5%的SDS(*m/V*)溶液中,固液比为4:1,85℃水浴1h,室温离心(10000g×5min)。取15μL上清液,放入装有5μL含β-巯基样品缓冲液的离心管中,振荡10~20s,95℃下水浴5min,室温下以10000g离心5min,取10μL上清液作为电泳上样液。采用4%浓缩胶、7.5%分离胶和SDS-Tris-甘氨酸系统电极缓冲液,染色液为0.1%的考马斯亮蓝R-250-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)。采用恒定电压100V,电泳3~4h,染色30min后脱色。

1.3.3 傅立叶红外光谱的测定

将1~2mg冷冻干燥样品和200mgKBr置于玛瑙研钵中,研磨均匀,装入压片模型中手动压片,采用傅立叶变换红外光谱仪对样品在500~4000cm⁻¹区间内进行扫描,分辨率为4cm⁻¹。

1.3.4 热变性温度的测定^[4]

冻干的胶原蛋白以1:40(*m/V*)的比例复溶于0.05mol/L的醋酸溶液中,混合液于4℃下静置2d,精确称取5~10mg胶原蛋白样品溶液于一DSC坩埚中,加盖密封后,以空坩埚作为参比,从20℃缓慢加热到60℃,升温速率为1℃/min,测定胶原蛋白的热变性温度,样品室中的N₂流量为10mL/min,液氮为冷却介质。

1.3.5 pH对胶原蛋白溶解度的影响

参照Jongjareonrak的方法略有改动^[5]。取适量胶原蛋白溶于0.5 mol/L的醋酸溶液中,配制样品浓度为

3 mg/mL, 取 4 mL 上述溶液于离心管中, 用 6 mol/L 的 NaOH 或 6 mol/L 的 HCl 调节胶原蛋白溶液的 pH 值从 1~10, 间隔为 1, 再用预先调节相同 pH 的蒸馏水使溶液总体积为 5 mL。分散液搅拌 30 min, 20000 g 离心 30 min, 所有操作在 4 °C 进行。测定上清液中蛋白质含量^[6]。

相对溶解度 (%) = 各 pH 点的蛋白质含量 / 最高蛋白质含量 × 100%

1.3.6 NaCl 对胶原蛋白溶解度的影响

参照 Jongjareonrak 的方法略有改动^[5]。取适量冷冻干燥的胶原蛋白溶于 0.5 mol/L 醋酸溶液中, 配制浓度为 6 mg/mL, 分别取 2.5 mL 上述胶原蛋白溶液与 2.5 mL 不同质量分数的 NaCl 溶液混合, 使混合液中 NaCl 质量分数分别为 0%~6%, 间隔为 1%。分散液搅拌 30 min, 20000 g 离心 30 min, 以上操作均在 4 °C 进行。上清液中蛋白质含量的测定方法与相对溶解度的计算同上。

1.3.7 胶原蛋白的微观结构

分别取冻干的胶原蛋白(ASC 和 PSC), 用 0.5 mol/L 醋酸溶液配成相同浓度。取等体积的上述溶液置规格一致的玻璃器皿中冷冻干燥。将冻干的胶原蛋白剪成薄片后真空喷金, 在不同扫描倍数下观察样品的微观结构。

1.3.8 数据分析与处理方法

实验数据用 Microsoft Excel 2007 进行统计分析, 每项测定数据采用 3 个平行, 对溶解度测定的平均值进行标准误差分析, 图形绘制采用 Origin 8.5。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳图谱分析

每个原胶原分子由三条 α 肽链组成, α 肽链自身为 α 螺旋结构, 三条 α 肽链以平行、右手螺旋形式缠绕成“草绳状”三股螺旋结构, 不同的 α 多肽链构成独特的胶原蛋白类型如 I 型、II 型、III 型, 鱼皮胶原蛋白通常以 I 型为主。从图 1 可看出, ASC 和 PSC 均主要含 α 链、 β 链及少量 γ 链, 其中 α 链包含 α_1 链和 α_2 链, 分子量为 100~135 ku 之间, α_1 链含量和 α_2 链含量比接近 2:1, 类似于牛跟腱 I 型胶原蛋白 α 链, 说明鲟鱼皮胶原蛋白为典型的 I 型胶原蛋白。从图 1 可观察到, 在 200 ku 左右, ASC 和 PSC 出现了 β 链, 且含量高, 与 α_1 链含量接近, 在 245 ku 以上出现了少量 γ 链。胶原蛋白中的大分子链(如 β 链和 γ 链)是通过胶原蛋白多肽链末端的共价交联作用形成的。比较 PSC 和 ASC 的电泳图谱发现, PSC 中 α 链含量

和 β 链含量较 ASC 多, 这可能是因为胶原蛋白的提取过程中, 胃蛋白酶切割了胶原蛋白部分大分子链末端中赖氨酸(或羟赖氨酸)形成的共价键, 导致 α 链含量和 β 链含量增加^[7]。

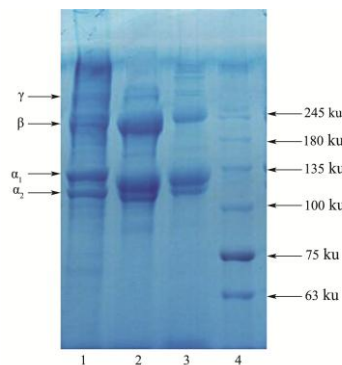


图 1 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE image of the collagen from *Acipenser gueldenstaedtii* skin

注: 1. BATC; 2. PSC; 3. ASC; 4. Mark.

2.2 傅立叶红外光谱分析

傅立叶红外光谱图能够体现胶原蛋白分子振动中偶极矩的变化, 可对胶原蛋白的结构和构象进行分析。蛋白质在红外区域表现为 5 个特定振动模式或基团频率(表 1), 其中酰胺 A 带的吸收峰波数通常出现在 3400~3440 cm^{-1} 之间。从表 1 可知, ASC 和 PSC 均在 3430 cm^{-1} 左右出现吸收峰, 这结果与酰胺 A 带的出峰位置是一致的。ASC 和 PSC 分别在 2926.55 cm^{-1} 和 2925.25 cm^{-1} 出现了弱吸收峰, 该峰是由酰胺 B 带的 CH_2 基团反对称收缩引起的。酰胺 I 带和酰胺 II 带是蛋白质二级结构变化的敏感区, 其中酰胺 I 带与二级结构的相关性较强。酰胺 I 带的吸收峰出现在 1600~1700 cm^{-1} 之间。由表 1 可知, ASC 和 PSC 均存在酰胺 I 带的吸收峰, ASC 吸收峰明显较高, 原因可能是 ASC 多肽链交联程度较高, 多肽链中的 $\text{C}=\text{O}$ 基团形成的氢键较少, 导致吸收峰波数较高^[8]。酰胺 I 带和酰胺 II 带的吸收峰与胶原蛋白多肽链的有序度有关, 有序度越高, 则两个带的吸收峰越大^[9]。ASC 酰胺 I 带和 II 带的特征吸收峰均明显高于 PSC, 说明 ASC 的有序度较高, 与 Wang 等研究的史氏鲟鱼皮 ASC 和 PSC 得到的结果一致^[2], 因此, 两种胶原蛋白在二级结构上可能存在差异。酰胺 III 带与胶原蛋白的三螺旋结构有关。由图 2 可知, ASC 和 PSC 均在 1240 cm^{-1} 和 1454 cm^{-1} 左右出现了吸收峰, 以上吸收峰基本与 BATC 相应的吸收峰吻合, 说明两种样品均保存了完整的三螺旋结构^[10]。ASC 和 PSC 的吸收峰出现的波数基本相似, 在其它波长下, 对红外光吸收率的变

化趋势也基本相同, 说明两种胶原蛋白的结构有很大的相似性。

表 1 鲟鱼皮胶原蛋白主要特征峰位置及其归属

Table 1 Positions of the main characteristic bands in FTIR spectra and their assignments for the collagens from *Acipenser gueldenstaedtii* skin

名称	波数/cm ⁻¹			振动模式
	ASC	PSC	BATC	
酰胺 A	3430.87	3430.54	3424.18	N-H 伸缩振动
酰胺 B	2926.55	2925.25	2925.32	CH ₂ 不对称伸缩振动
酰胺 I	1646.97	1639.35	1635.08	C=O 伸缩振动
酰胺 II	1551.49	1546.17	1545.49	N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动
酰胺 III	1239.94	1240.93	1239.39	C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动

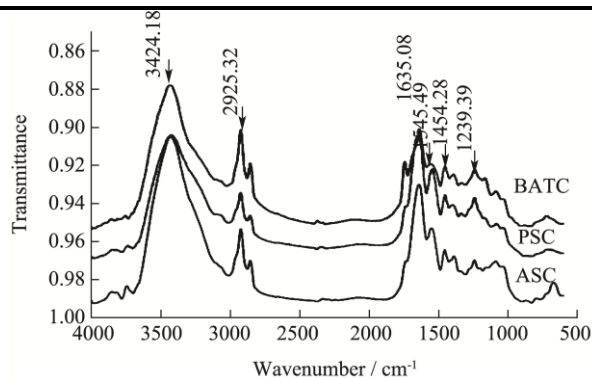


图 2 鲟鱼皮胶原蛋白的傅立叶红外转换扫描图谱

Fig.2 Fourier transform infrared spectra of the collagens from *Acipenser gueldenstaedtii* skin

2.3 热稳定性分析

胶原蛋白的二、三和四级结构遭到破坏时的温度通常用热变性温度(T_d)表示。由图 3 可知, 鲟鱼皮 PSC 和 ASC 的 T_d 分别为 32.68 °C 和 32.48 °C, 两种胶原蛋白的 T_d 基本一致, 说明胃蛋白酶没有破坏胶原蛋白的三螺旋区域。PSC 和 ASC 的 T_d 虽低于哺乳动物胶原蛋白的热变性温度如猪皮胶原蛋白 (T_d , 37 °C)^[11]、牛跟腱胶原蛋白 (T_d , 38.38 °C), 但明显高于冷水性鱼类胶原蛋白如鳕鱼皮胶原蛋白 (T_d , 16.8 °C)^[12], 也高于暖水性鱼类胶原蛋白如鲢鱼皮胶原蛋白 (T_d , 22.09 °C)^[4]、长鳍金枪鱼皮胶原蛋白 (T_d , 29.36 °C)^[13]、笛鲷鱼皮胶原蛋白 (T_d , 28.68 °C)^[14] 及棕色条纹红鲷鱼皮的 ASC (T_d , 30.52 °C) 和 PSC (T_d , 30.46 °C)^[5]。胶原蛋白的变性温度影响其应用特性, 例如汪海波等^[15]研究胶原蛋白的生物学性能时发现, 草鱼鱼鳞胶原蛋白的热变性温度低于哺乳动物, 其抗酶解性也较哺乳动物差。有研究^[16]表明, 猪皮胶原蛋白因多肽

链的交联程度较高而展现出较好的材料延展性。鲟鱼皮胶原蛋白的热变性温度高于大部分鱼类, 可能与其多肽链的交联作用有关, 交联越多, 胶原蛋白的热变性温度越高^[17], 鲟鱼皮胶原蛋白可替代哺乳动物胶原蛋白在某些医学材料等领域中的应用。

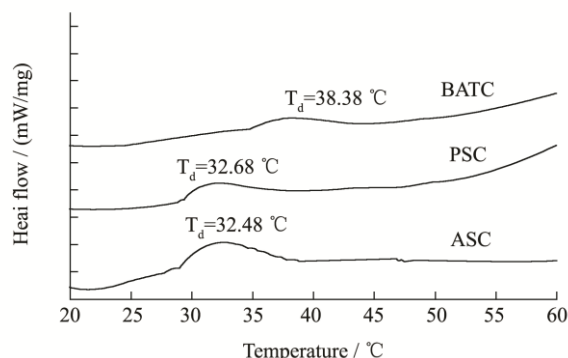


图 3 鲟鱼皮胶原蛋白的热变性曲线

Fig.3 Thermal denaturation curves of the collagens from *Acipenser gueldenstaedtii* skin

2.4 pH 和 NaCl 对胶原蛋白溶解度的影响

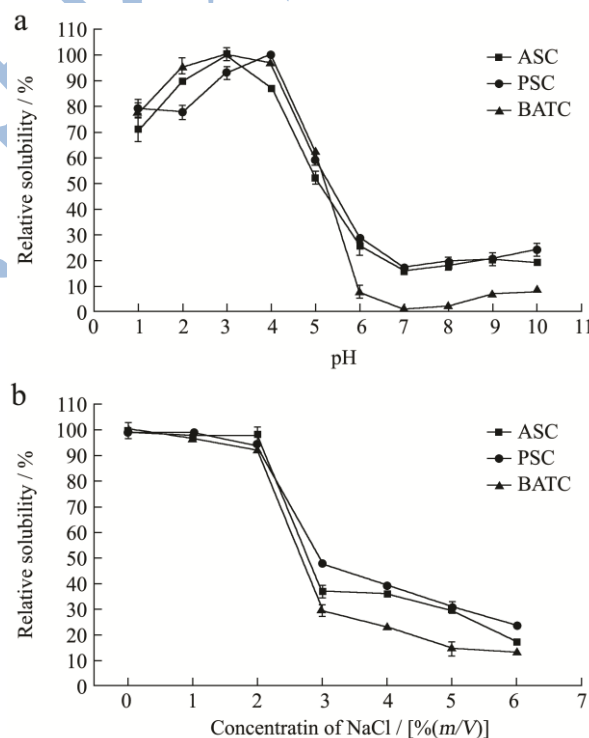


图 4 不同 pH 和 NaCl 浓度下鲟鱼皮胶原蛋白的相对溶解度

Fig.4 Relative solubility of the collagens from *Acipenser gueldenstaedtii* skin at different pH values and different NaCl concentrations

不同 pH 和 NaCl 浓度条件下, PSC 和 ASC 的相对溶解度如图 4 所示。由图 4 (a) 可知, 不同 pH 对 PSC 和 ASC 溶解度的影响效果类似。在酸性条件下 (pH 1~4), PSC 和 ASC 溶解度较高, 分别在 pH 3 和

pH 4 达到最高, 在 pH 4~7 范围内溶解度迅速下降, 随后溶解度缓慢上升, 因此 2 种胶原蛋白的等电点均为 pH 7。pH 偏离胶原蛋白等电点时, 胶原蛋白中肽链间的疏水作用减弱, 斥力增大, 胶原蛋白的溶解度上升。PSC 和 ASC 溶解度最高时的 pH 不同, 可能是两种胶原蛋白多肽链末端交联区域不同, 影响胶原蛋白的离子化作用, 导致两种胶原蛋白溶解度在不同 pH 达到最高。

不同 NaCl 浓度对 PSC 和 ASC 溶解度的影响效果类似。如图 4 (b) 所示, 当 NaCl 浓度在 0%~2% 之间时, PSC 和 ASC 的溶解度均达到 90% 左右; 当 NaCl 浓度在 2%~3% 时, 这 2 种胶原蛋白的溶解度迅速下降; 在 NaCl 浓度大于 3% 以后, 溶解度进一步缓慢下降。胶原蛋白在较高浓度的 NaCl 溶液中, 发生盐析现象, 从而溶解度迅速下降。在 NaCl 浓度大于 2% 时, PSC 相对溶解度略高于 ASC, 可能是 ASC 中的多肽链较少, 水合作用降低引起的。鲟鱼皮胶原蛋白的溶解度明显与 BATC 的溶解度不同, 可能是不同来源的胶原蛋白分子的氨基酸组成、空间结构和构象等不同引起的。在 NaCl 浓度大于 2% 时, PSC 和 ASC 相对溶解度明显高于 BATC, 因此高浓度盐溶液中, PSC 和 ASC 较 BATC 在某些方面的应用可能具有优势。

2.5 胶原蛋白微观结构

图 5 为 ASC 和 PSC 放大 500、1 k、5 k 倍后的电镜扫描图, 低倍 (500 倍) 镜下, 两种胶原蛋白纤维形态为多孔的网状结构。放大 1 k 倍的情况下, ASC 的网状结构较致密, 孔径大小基本一致, 且孔径小于 PSC, 而 PSC 网状结构的孔隙形状稍不规则, 整体结构较疏松, 孔与孔之间的连贯性较好。高倍 (5 k 倍) 镜下, ASC 大部分孔状结构的直径约为 50 μm 左右, PSC 孔径大部分集中在 50~150 μm 之间, ASC 的孔壁较 PSC 光滑。ASC 和 PSC 的微观结构存在差异, 原因可能是 2 种胶原蛋白多肽链末端区域不同, 导致微纤维形成方式也不同^[18]。比较而言, BATC 的网络结构不规则, 孔分布更疏松, 且不均匀。网状结构均匀且孔径大小均一的胶原蛋白, 作为药物的载体, 不仅有利于药物均匀地分散, 而且还有利于水分的蒸发^[19]。因此 ASC、PSC 在网络结构的均匀性、致密性方面均优于 BATC, 这为二者在食品、化妆品、生物医学等领域的应用提供了可能。

3 结论

本试验用酸法和酶法提取的鲟鱼皮胶原蛋白为典型的 I 型胶原蛋白; PSC 和 ASC 均保持了完整的三

螺旋结构, 但 PSC 和 ASC 的二级结构可能有差异, ASC 的有序度高于 PSC; PSC 和 ASC 的 T_d 分别为 32.68 $^{\circ}\text{C}$ 和 32.48 $^{\circ}\text{C}$, 虽比牛跟腱胶原蛋白低, 但高于大部分已报道的鱼类胶原蛋白变性温度; pH 和 NaCl 浓度对 PSC 和 ASC 的溶解度影响较大, PSC 和 ASC 都在 pH 1~4 和 NaCl 浓度小于 2% 时溶解度较大; 冻干的 2 种胶原蛋白为均匀的网状结构, ASC 纤维表面微观结构孔径较 PSC 更小和均匀, 原有结构保持较佳。综上所述, 本试验获得的鲟鱼皮 PSC 和 ASC 具有热稳定性高、溶解性好和网状结构均匀等优点, 具有替代哺乳动物胶原蛋白, 应用于食品、化妆品、生物医学等领域的潜力。

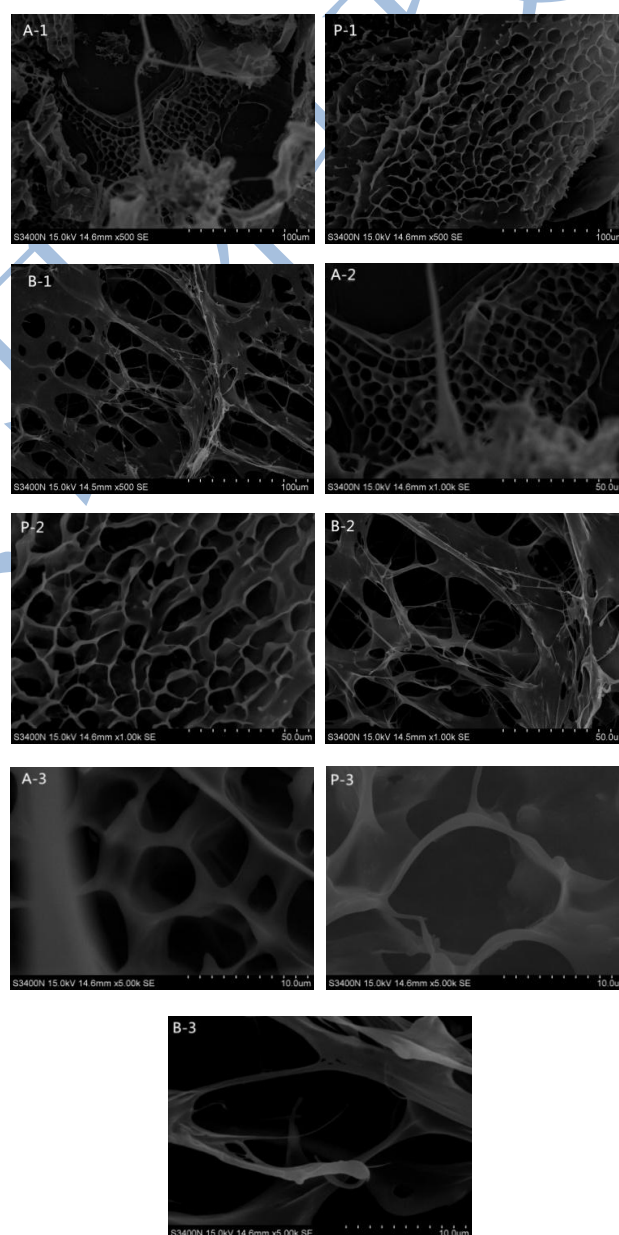


图 5 2 种胶原蛋白的电镜扫描图谱

Fig.5 Scanning electron micrograph of ASC and PSC from *Acipenser gueldenstaedtii* skin

注: A: ASC, P: PSC, B: BATC。

参考文献

- [1] 刘奇. 鲟鱼腥味物质特征及其脂肪酸氧化的关系研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013
LIU Qi. Study on the off-flavor compounds character of sturgeon and their relationship with lipid oxidation [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013
- [2] Wang L, Liang Q, Chen T T, et al. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38: 104-109
- [3] Singh P, Benjakul S, Maqsood S, et al. Isolation and characterization of collagen extracted from of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) [J]. Food Chemistry, 2011,124(1): 97-105
- [4] 张虹,卓素珍,戴志远. 鮫鰈鱼皮中胶原蛋白的提取及性质研究[J].中国食品学报,2009,9(6):34-40
ZHANG Hong, ZHUO Su-zheng, DAI Zhi-yuan. Isolation and characterisation of collagen from Anglerfish (*Lophius litulon*) skin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(6) : 34-40
- [5] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) [J]. Food Chemistry, 2005, 93(3): 475-484
- [6] 关静,叶萍,武继民. 胶原海绵的羟脯氨酸含量测定[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(1): 52-54
GUAN Jing, YE Ping, WU Ji-min. The determination of hydroxyproline in collagen sponge [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2000, 22(1): 52-54
- [7] Sato K, Ebihara T, Adachi E, et al. Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with protease [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 25870-25875
- [8] Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bull frog skin collagen [J]. Food Chemistry, 2004, 84(1): 65-69
- [9] Paynek J, Veis A. Fourier transform spectroscopy of collagen and gelatin solutions : deconvolution of the amide I band for conformational studies [J]. Biopolymers, 1998, 27(11): 1749-1760
- [10] Liu H, Li D, Guo S. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 621-625
- [11] Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus* [J]. Biological Macromolecules, 2003, 32(3-5):199-204
- [12] Sadowska M, Kolodziejaska I, Niecikowska C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 257-262
- [13] Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 817-824
- [14] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372
- [15] 汪海波,梁艳萍,汪海婴,等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能[J]. 水产学报,2012,36(4):553-561
WANG Hai-bo, LIANG Yan-ping, WANG Hai-ying, et al. Isolation and partial biological properties of scale collagen from grass scarp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36 (4) : 553-561
- [16] 汪海婴,梁艳萍,李云雁,等. 鱼源胶原蛋白海绵材料的构建及其生物学性能[J]. 华中科技大学学报(医学版),2012, 6(6) : 709-715
WANG Hai-ying, LIANG Yan-ping, LI Yun-yan, et al. Preparation and biochemical properties of collagen sponges from fish [J]. Acta Med Univ Sci Technol Hua zhong, 2012, 6(6) : 709-715
- [17] 侯虎,孙江,毛家楠,等. 海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J]. 现代食品科技,2013,29(7):1491-1495
HOU Hu, SUN Jiang, MAO Jia-nan, et al. Collagen fibers morphology and physical and chemical properties of collagen of sea cucumber[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1491-1495
- [18] Sai K P, Badu M, Pietrucha K. Studies on *Rana tigerina* skin collagen[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(1): 81-90
- [19] Zhang Y, Liu W, Li G, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912