

# 响应面法优化鲫鱼鱼鳞 酸溶性胶原蛋白提取工艺

朱秀灵,戴清源,蔡为荣,王 建

(安徽工程科技学院生物化学工程系,安徽芜湖 241000)

**摘要:**在单因素实验基础上,采用响应面法对影响酸溶性胶原蛋白(acid-soluble collagen, ASC)提取效果的3个因素即乙酸浓度、液料比和提取时间进行了优化,建立并分析了各因素与ASC得率关系的数学模型。结果表明:ASC最佳提取工艺条件为:乙酸浓度0.41 mol/L,液料比12 mL/g,提取时间54.81 h,在此工艺条件下,ASC最高得率(以干基计)理论值为20.97%,而实测值可达20.68%,与理论预测值相比,相对误差为1.38%。ASC的相对溶解度在pH4时最大,当NaCl浓度低于3% (mg/mL)时,ASC的相对溶解度基本不变,当NaCl浓度大于3% (mg/mL)时,相对溶解度迅速降低,但都在40%以上。

**关键词:**酸溶性胶原蛋白,响应面法,优化,鱼鳞

## Optimization of extraction acid-soluble collagen from crucian carp scale by response surface methodology

ZHU Xiu-ling, DAI Qing-yuan, CAI Wei-rong, WANG Jian

(Department of Biochemistry Engineering, Anhui University of Technology and Science, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** Based on the single factor experiments, the effects of acetic acid concentration, ratio of solvent to solid and extraction time on the yield of acid-soluble collagen (ASC) from crucian carp scale were optimized with response surface methodology. A mathematical model was established and analyzed to describe the relationships between the factors and the response of the yield of ASC from crucian carp scale. The results showed that the optimum extracting conditions for ASC were as follows: the concentration of acetic acid 0.41 mol/L, the ratio of solvent to solid 12 mL/g and extraction time 54.81 h. Under the optimum conditions, the predictive maximum yield of ASC on the dry weight basis was 20.97% and experimental value was 20.68%. Comparing predictive value with experimental value, the relative error was 1.38%. The highest relative solubility of ASC from crucian carp scale was obtained at pH4. No changes in solubility were found in the presence of NaCl up to 3% (mg/mL). However, a sharp decrease but no less than 40% in solubility was observed with NaCl above 3% (mg/mL).

**Key words:** acid-soluble collagen (ASC); response surface methodology; optimization; scale

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)11-0247-05

胶原蛋白不仅是构成生物体的重要成分(如动物皮肤、骨骼、肌腱、韧带、软骨及血管等)<sup>[1]</sup>,而且作

为原料已被广泛应用到食品、医药及化妆品等众多领域<sup>[2-3]</sup>。胶原蛋白的主要来源最初仅限于陆生动物如牛、猪等的骨骼和皮肤<sup>[4]</sup>。然而,近几年来,由于疯牛病及口蹄疫等疾病的爆发使人们对这些来源的胶原蛋白的安全性甚是担忧<sup>[5]</sup>。欧美、日本等国家相继出台了不少法规,限制从牛等哺乳动物皮骨中的提取物用于食品、医药等对人体直接影响的产品中<sup>[6]</sup>。另外,来源于猪的胶原蛋白由于宗教信仰问

收稿日期: 2009-11-25

作者简介: 朱秀灵(1978-),女,硕士,讲师,研究方向:农副产品资源开发与利用。

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2009B091);安徽工程科技学院青年基金项目(2008YQ050)。

### 参考文献

[1] 唐粉芳,郭俊霞.芹菜汁降压和舒张血管作用的研究[J].食品科学,2007,28(1):322.  
[2] 晏志云,徐建祥.天然复合蔬菜澄清汁的研制[J].食品工

业,1999(2):6-8.

[3] 张学杰,蔡同一.芹菜浑浊汁加工技术研究[J].食品工业科技,1999,20(4):44-45.

[4] 孙君社.食品感官鉴评[M].华南理工大学出版社,1994:9.

题,其应用也受到限制<sup>[7]</sup>。基于此,必须寻找新的胶原蛋白来源。鱼类加工副产物——皮肤、骨、鱼鳞等富含胶原蛋白,以此为原料提取胶原蛋白的报道较多,但大多以深海鱼类为主,而以淡水鱼鱼鳞为原料的报道尚少<sup>[8]</sup>。本实验以淡水鱼鲫鱼鱼鳞为原料,采用传统的酸法提取工艺,利用响应面分析法对酸溶性胶原蛋白(acid-soluble collagen, ASC)提取工艺进行优化,并初步探讨 pH 及 NaCl 浓度对 ASC 溶解度的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

鱼鳞 购于本地集贸市场,活鱼屠宰后的鱼鳞用清水洗净,真空干燥(25℃),粉碎过 80 目筛,4℃ 保存,备用;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、乙酸、盐酸、柠檬酸、乳酸、氯化钠等 均为国产分析纯;牛血清白蛋白(BSA) 广州蕊特生物科技有限公司。

SP-754 型紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司;DZX-型(60508)真空干燥箱 上海福玛实验设备有限公司;L-550 台式大容量离心机 湘仪离心机有限公司;PHS-2C 数显酸度计 上海雷磁仪器厂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 鲫鱼鱼鳞中 ASC 的提取工艺流程 鱼鳞粉(质量  $m_1$ , g)→碱液处理→脱脂→脱钙→酸解→盐析→透析→真空干燥(质量为  $m_2$ , g)

具体操作参照文献[3,9]进行,则 ASC 得率  $\eta$ (%,以干基计) =  $m_2/m_1 \times 100\%$ 。

1.2.2 响应面法优化提取工艺 应用 Box- Behnken 中心组合方法进行三因素三水平的实验设计。在单因素实验基础上,以酸液浓度,液料比,提取时间 3 个因素为自变量,分别以  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  表示,按方程  $X_i = (x_i - x_0) / \Delta x$  对自变量进行编码( $X_i$  为自变量的编码值, $x_i$  为自变量的真实值, $x_0$  为实验中心点处自变量的真实值, $\Delta x$  为自变量的变化步长)。并以自变量的编码值 +1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平,ASC 得率 Y 为响应值,实验自变量因素编码及水平见表 1。

表 1 实验因素编码及水平表

自变量因素	编码	编码水平			$\Delta x$
		-1	0	+1	
乙酸浓度 $x_1$ (mol/L)	$X_1$	0.40	0.50	0.60	0.10
液料比 $x_2$ (mL/g)	$X_2$	11	13	15	2
提取时间 $x_3$ (h)	$X_3$	50	60	70	10

注: $X_1 = (x_1 - 0.5) / 0.1$ ;  $X_2 = (x_2 - 13) / 2$ ;  $X_3 = (x_3 - 60) / 10$ 。

1.2.3 紫外可见光谱分析 准确称取一定质量的 ASC 溶于 0.02mol/L 乙酸水溶液,得到 2mg/mL ASC 溶液<sup>[10-11]</sup>。在波长范围 190~400nm 下测定其吸光度,记录最大吸收波长。

1.2.4 ASC 溶解度实验 参照文献[10,12-13]进行,先用 0.5mol/L 乙酸溶解胶原蛋白配制成质量浓度分为 3mg/mL 和 6mg/mL 的胶原蛋白溶液。然后分别考察 pH 及 NaCl 浓度对胶原蛋白溶解度的影响。

1.2.4.1 pH 对 ASC 溶解度的影响 取 10 支离心管,各加入 8mL 3mg/mL 的 ASC 溶液,并用 6mol/L NaOH 或 6mol/L HCl 溶液调节 pH 分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,然后加入蒸馏水(将其 pH 调整到与胶原蛋白 pH 相同)至溶液体积为 10mL,磁力搅拌 30min 后进行离心(30min, 1000r/min)。测定上清液中蛋白质含量(mg/mL),计算 ASC 相对溶解度。

1.2.4.2 NaCl 浓度对 ASC 溶解度的影响 将 NaCl 溶解于 0.5mol/L 乙酸中,制得质量浓度分别为 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12% (mg/mL) 的 NaCl 溶液。分别取 5mL 不同质量浓度的 NaCl 溶液于离心管中,各加入 5mL 6mg/mL 的 ASC 溶液,混匀,则混合溶液中 NaCl 质量浓度分别为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6% (mg/mL)。然后离心(30min, 1000r/min),测定上清液中蛋白质含量(mg/mL),计算 ASC 相对溶解度。

1.2.4.3 ASC 相对溶解度计算 以牛血清白蛋白为标准,参照文献[14]对上清液中蛋白质含量(mg/mL)进行测定。

$$\text{ASC 相对溶解度}(\%) = \frac{V_2 \times C_2}{V_1 \times C_1} \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

式(1)中: $V_1$  为 ASC 溶液的体积, mL;  $C_1$  为 ASC 溶液的浓度, mg/mL;  $V_2$  为离心后上清液的体积, mL;  $C_2$  为上清液中蛋白质含量, mg/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外可见吸收光谱分析

通过测定 ASC 在波长 190~400nm 下的吸光度,得知最大吸收波长为 222nm,这与 ASC 多肽链中含有的 C = O、COOH、CONH<sub>2</sub> 基团有关<sup>[10]</sup>。绝大部分蛋白质因含有一定量的酪氨酸和色氨酸,因此在 280nm 处具有最大吸收峰。苯丙氨酸在 251nm 处有最大吸收峰。而胶原蛋白在 280nm 及 251nm 处无显著吸收峰<sup>[11]</sup>。因此,实验所得蛋白质为胶原蛋白。

### 2.2 不同酸对 ASC 得率的影响

称取 4 份质量均为 5g 的鱼鳞,按照 1.2.1 操作,分别以 0.5mol/L 的盐酸、乙酸、柠檬酸、乳酸为提取剂,液料比为 10mL/g,提取时间为 72h,ASC 得率见图 1。由图 1 看出,不同酸液提取 ASC 得率不同,按得率由大到小依次为乙酸、柠檬酸、盐酸、乳酸。故实验选择乙酸作为 ASC 的提取剂。

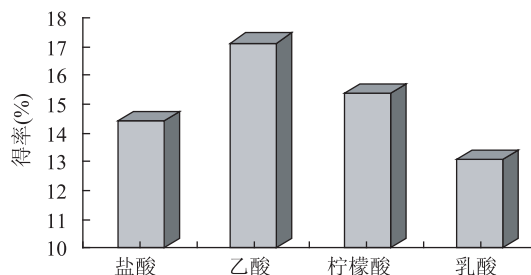


图 1 酸对 ASC 得率的影响

### 2.3 乙酸浓度对 ASC 得率的影响

称取 5 份质量均为 5g 的鱼鳞,以液料比为 10mL/g 分别加入浓度为 0.20、0.35、0.50、0.65、

表3 回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归	296.96246	9	32.99583	28.83	0.0009	**
一次项	131.09623	3	43.69874	38.18	0.0007	**
二次项	84.39298	3	28.13099	24.58	0.0020	**
交互作用	81.47325	3	27.15775	23.73	0.0022	**
残差误差	5.72214	5	1.14443			
失拟	4.51548	3	1.50516	2.49	0.2990	
纯误差	1.20667	2	0.60334			

注: \* P<0.05, \*\* P<0.01, 表4同。

0.80mol/L 的乙酸, 提取时间为 72h, 按 1.2.1 操作进行提取, 结果如图 2 所示。

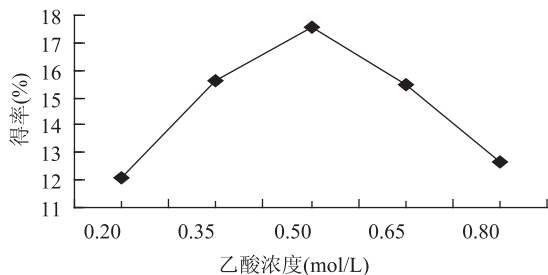


图2 乙酸浓度对 ASC 得率的影响

乙酸浓度对 ASC 得率的影响如图 2, 乙酸浓度为 0.2~0.5mol/L 时, ASC 得率随着乙酸浓度的增加而增大; 当乙酸为 0.5mol/L 时, 得率最大为 17.58%; 当乙酸浓度大于 0.5mol/L 时, 得率反而下降。这可能是随着乙酸浓度增大, 溶液 pH 降低, 胶原蛋白变性, 致使溶解度降低, 其得率也相应降低。故乙酸浓度以 0.50mol/L 较为合适。

### 2.4 液料比对 ASC 得率的影响

称取 5 份质量均为 5g 的鱼鳞, 以液料比为 5、10、15、20、25mL/g 分别加入 0.50mol/L 的乙酸, 提取时间为 72h, 按 1.2.1 操作进行提取, 结果如图 3 所示。当液料比为 5~10mL/g 时, ASC 得率急剧增加, 液料比为 10~15mL/g 时, 得率增加也较快, 但相对于前者增加幅度较小; 当液料比为 15~25mL/g 时, 得率趋于平缓。考虑到酸液使用量大, 后处理困难及成本高等问题, 故液料比以 10~15mL/g 为合适范围。

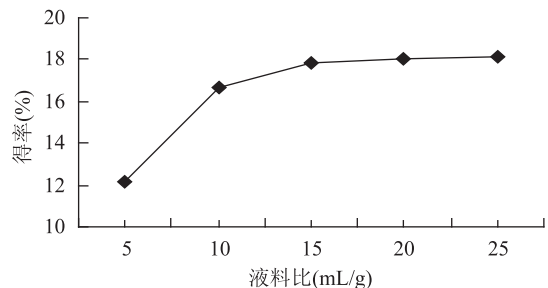


图3 液料比对 ASC 得率的影响

### 2.5 提取时间对 ASC 得率的影响

称取 7 份质量均为 5g 的鱼鳞, 以液料比 10mL/g 加入 0.50mol/L 的乙酸, 提取时间分别为 24、36、48、60、72、84、90h, 按 1.2.1 操作进行提取, 结果如图 4 所示。

由图 4 得知, 当提取时间为 24~60h, ASC 得率随着提取时间的延长而快速增加; 当提取时间为 60h 时, 得率达到 17.45%; 当提取时间大于 60h, 再随着

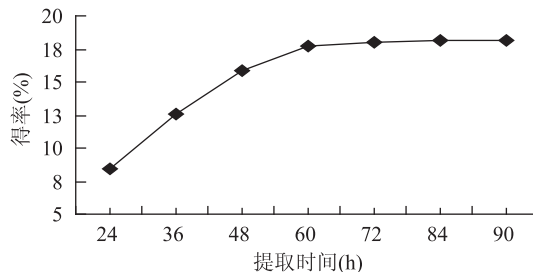


图4 提取时间对 ASC 得率的影响

时间延长, 得率增加不明显。故提取时间以 60h 为最佳。

### 2.6 鲫鱼鱼鳞中 ASC 提取工艺优化

在单因素实验基础上, 以乙酸浓度、液料比和提取时间 3 因素 3 水平进行响应面实验设计及分析, 实验因素编码及水平表见表 1, 实验设计及结果见表 2。以编码值  $X_1, X_2, X_3$  为自变量, 以 ASC 得率  $Y$  为响应值, 采用 SAS RSREG 程序进行响应面分析实验, 结果见表 3, 因子经过回归拟合, 解得回归方程为:

$$Y = 19.61667 - 3.11625X_1 - 1.80375X_2 + 1.85000X_3 - 3.36833X_1X_2 + 1.25000X_1X_3 + 4.30250X_2X_3 - 3.18833X_2^2 + 0.54250X_2X_3 - 2.15583X_3^2 \quad (2)$$

表2 ASC 提取实验设计与结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	得率 Y (%)
1	-1	-1	0	19.27
2	-1	1	0	14.17
3	1	-1	0	9.45
4	1	1	0	9.35
5	0	-1	-1	15.15
6	0	-1	1	18.01
7	0	1	-1	9.45
8	0	1	1	14.48
9	-1	0	-1	19.24
10	1	0	-1	5.49
11	-1	0	1	14.09
12	1	0	1	17.55
13	0	0	0	19.85
14	0	0	0	20.25
15	0	0	0	18.75

回归方程(2)的方差分析和参数估计分别见表 3、表 4。由表 3 可知, 模型回归 P 为 0.0009, 说明模型回归高度显著可靠; 一次项、二次项交互作用高度显著, 说明各因素之间不是简单的线性关系, 而是二次关系; 失拟项 F 值较小, 失拟项 P 为 0.2990, 表明失拟项不显著, 说明该方程对实验拟合好, 实验误差小。因此可以用该回归方程代替实验真实点对实验

结果进行分析。由表 4 知,对方程影响显著程度由大到小依次为乙酸浓度、提取时间和液料比,三者对 ASC 得率的影响均高度显著,说明三者取值大小直接关系到 ASC 得率。模型的回归系数  $R^2$  为 0.9811,说明模型响应值即 ASC 得率的变化 98.11% 来自所选因变量,即乙酸浓度、液料比和提取时间的值,因此,回归方程可以较好地描述随机因子与响应值之间的关系,可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。

图 5~图 7 反映了乙酸浓度、液料比和提取时间三因素交互作用对响应值的影响。由图 5 可知,当液料比  $X_2$  一定时,随着乙酸浓度  $X_1$  的增加,胶原蛋白得率先是逐渐增大然后又逐渐减少;当乙酸浓度一定时,胶原蛋白得率随着液料比的增大也是先逐渐增大而后又逐渐减少。如编码  $X_3$  为 0,  $X_1$  为 -0.5 时,当编码  $X_2$  为 -0.62 时,ASC 得率为 20.60%,  $X_2$  为 -0.40 时,得率为 20.79%,  $X_2$  为 -0.09 时,得率为 20.55%,  $X_2$  为 0.20 时得率又降低为 19.77%。

表 4 参数估计

项	系数	系数标准误差	t 值	P	显著性
常量	19.61667	0.61764	31.76	<0.0001	**
$X_1$	-3.11625	0.37822	-8.24	0.0004	**
$X_2$	-1.80375	0.37822	-4.77	0.0050	**
$X_3$	1.85000	0.37822	4.89	0.0045	**
$X_1X_1$	-3.36833	0.55673	-6.05	0.0018	**
$X_1X_2$	1.25000	0.53489	2.34	0.0666	
$X_1X_3$	4.30250	0.53489	8.04	0.0005	**
$X_2X_2$	-3.18833	0.55673	-5.73	0.0023	**
$X_2X_3$	-0.54250	0.53890	1.01	0.3570	
$X_3X_3$	-2.15583	0.55673	-3.87	0.0117	*

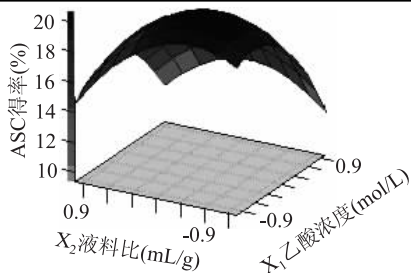
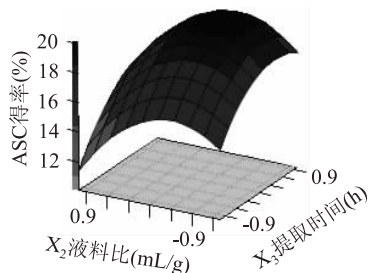
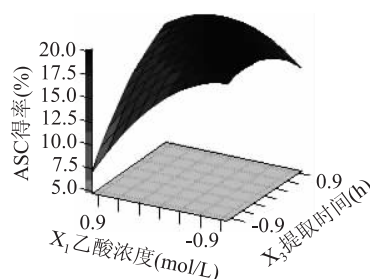
图 5 乙酸浓度和液料比对 ASC 得率影响的响应曲面( $X_3 = 0$ )图 6 液料比和提取时间对 ASC 得率影响的响应曲面( $X_1 = 0$ )

图 6 表明,提取时间不变,随着液料比的增大,ASC 得率先是逐渐增大而后又逐渐下降;当液料比一定时,提取时间编码  $X_2$  在 -1 至 1 范围内变化,在一定时间内延长提取时间有利于 ASC 得率的提高,

图 7 乙酸浓度和提取时间对 ASC 得率影响的响应曲面( $X_2 = 0$ )

但超过一定值后 ASC 得率随时间延长变化不明显。

由图 7 得知,乙酸浓度不变时,随着提取时间的延长,ASC 得率也是先增加而后又逐渐减少。而提取时间不变时,随着乙酸浓度的增大,ASC 得率呈下降趋势。

图 5~图 7 表明,ASC 得率与乙酸浓度、液料比和提取时间三个因素有关,且这三个因素存在最佳参数组合可以满足 ASC 得率达到理论最大值。再对三维非线性回归模型(2)取一阶偏导数等于零,得到如下方程组:

$$-3.11625 - 6.73666X_1 + 1.25000X_2 + 4.30250X_3 = 0 \quad \text{式(3)}$$

$$-1.80375 + 1.25000X_1 - 6.37666X_2 + 0.54250X_3 = 0 \quad \text{式(4)}$$

$$1.85000 + 4.30250X_1 + 0.54250X_2 - 4.31166X_3 = 0 \quad \text{式(5)}$$

解方程组得  $X_1 = -0.8871$ ,  $X_2 = -0.5009$  和  $X_3 = -0.5192$ , 根据编码值与非编码值的转换式解得  $x_1 = 0.41 \text{ mol/L}$ ,  $x_2 = 12 \text{ mL/g}$ ,  $x_3 = 54.81 \text{ h}$ 。即鲫鱼鱼鳞中 ASC 最佳提取工艺为乙酸浓度  $0.41 \text{ mol/L}$ , 液料比  $12 \text{ mL/g}$ , 提取时间  $54.81 \text{ h}$ , 由回归方程可得 ASC 最高得率理论值可达到 20.97%。在该提取工艺条件下,实际测得 ASC 得率为 20.68% (三次平行实验的平均值,即  $n = 3$ ), 与理论预测值相比,相对误差为 1.38%, 因此,采用响应曲面分析法优化得到的提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

## 2.7 ASC 的溶解度

按照 1.2.4 操作, pH 及氯化钠对 ASC 的影响分别见图 8、图 9。

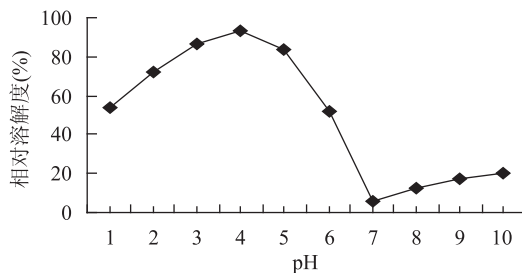


图 8 pH 对 ASC 溶解度的影响

pH 对 ASC 溶解度影响(见图 8)较大,当 pH 为 4 时,ASC 相对溶解度最大为 93.63%;当 pH 为 7 时,相对溶解度最小;而 pH 在 7~10 范围内,相对溶解度又随着 pH 增大而逐渐增大。其原因可能是胶原蛋白等电点在 7 附近,当 pH 接近蛋白质的等电点时,蛋白质所带净电荷接近零及蛋白质肽链间疏水相互

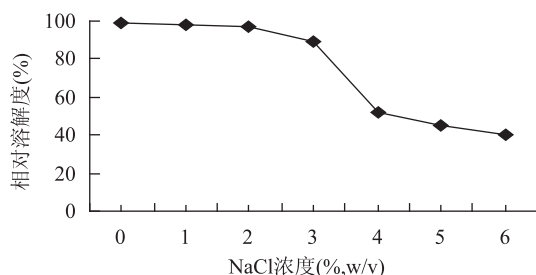


图9 NaCl对ASC溶解度的影响

作用增强,导致蛋白质分子聚集、沉淀,相对溶解度降低<sup>[13]</sup>。当pH偏离等电点时,蛋白质带有较多净电荷,蛋白质分子间相互排斥,因此蛋白质相对溶解度较高。

由图9看出,当溶液中NaCl浓度低于3%(mg/mL)时,ASC在0.5mol/L乙酸中的溶解度稍高于在NaCl溶液中的溶解度;当NaCl浓度为3%~4%时,相对溶解度随着NaCl浓度增大而迅速下降;当NaCl浓度大于4%时,相对溶解度缓慢下降;但是,ASC在NaCl溶液(1%~6%,mg/mL)中的相对溶解度均在40%以上。蛋白质在NaCl溶液中溶解度降低原因主要是由于较高离子浓度导致蛋白质分子间疏水相互作用增强,蛋白质与蛋白质发生聚集沉淀而使溶解度降低<sup>[15]</sup>。

### 3 结论

利用SAS9.1软件,采用响应面法(RSM)建立了鲫鱼鱼鳞ASC提取工艺条件的二次多项式数学模型,分析了各因素对响应值的影响。并对ASC在不同pH及NaCl溶液中的溶解度进行了初步分析。

结果表明:对响应值影响显著程度由大到小依次为乙酸浓度、提取时间和液料比;二次多项式数学模型拟合程度高,实验误差小。对响应回归方程进行一阶偏导数等于零,求出最佳提取工艺条件为:乙酸浓度0.41mol/L,液料比12mL/g,提取时间54.81h,在此条件下,ASC最高得率理论值为20.97%,而实测值可达20.68%,与理论预测值相比,相对误差为1.38%。ASC溶解度与溶液pH及离子强度(NaCl溶液)有关。当pH在等电点时,相对溶解度较低,偏离等电点时,相对溶解度增大,当pH为4时,相对溶解度最大为93.63%;当NaCl浓度低于3%,离子强度对ASC相对溶解度影响较小,当NaCl浓度大于3%时,相对溶解度先是迅速下降而后又趋于平缓,但都在40%以上。

### 参考文献

[1] Senaratne LS, Park PJ, Kim SK. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2): 191-197.  
 [2] Morimura S, Nagata H, Uemura Y, et al. Development of an

effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(12): 1403-1412.  
 [3] Ogawa M, Portier RJ, Moody MW, et al. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 88(4): 495-501.  
 [4] 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.  
 [5] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(3): 363-372.  
 [6] 胡业丽, 吴洁, 张瑞, 等. 酸法提取人工养殖鲟鱼皮中胶原蛋白工艺的研究 [J]. *食品科技*, 2008, 33(2): 209-212.  
 [7] 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.  
 [8] Zhang J, Duan R, Tian Y, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 318-322.  
 [9] Duan R, Zhang J, Du X, et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(3): 702-706.  
 [10] Zeng S, Zhang C, Lin H, et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(4): 879-883.  
 [11] 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.  
 [12] Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2): 593-601.  
 [13] Montero P, Jiménez-Colmenero F, Bordería J, et al. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991, 54(1): 137-146.  
 [14] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 256-275.  
 [15] Fennema OR 著. 食品化学 [M]. 第三版. 王璋, 许时婴等译. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 307-308.