高效酶提取鸡肺明胶及其结构与性质的研究

潘佳昕， 杨 恒， 时海波， 张新笑， 邹 烨*， 徐为民， 王道营
（江苏省农业科学院 农产品加工所，江苏 南京 210014）

摘要： 以鸡肺为原料，通过超声辅助酶法提取明胶，采用紫外光谱法、差示扫描量热法、圆二色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、激光粒度分布法、扫描电镜等分析超声辅助酶提鸡肺明胶的结构，并研究其乳化性质，探究该法在鸡肺明胶中的应用效果。研究结果表明，与常规热水提取法相比：超声辅助酶提法的明胶得率为 30.08%（鸡肺除杂后干重状态原料），是前者提取的 3.43 倍，提取效率也提高了 2.15 倍，热变性温度为 90.22 ℃，略低于前者；两种明胶均存在胶原的特征负吸收峰，出现在 229 nm 处，其中超声辅助酶提明胶的无规则卷曲程度低于常规热水提取明胶。平均粒径为 396 nm，颗粒减小了 13.7%，多数分布在相对分子质量 45 000~95 000 之间，已基本降解为小分子亚基，表面微观结构有明显的破碎；进一步分析发现，两种明胶样品的乳化性无明显差异。因此，超声辅助酶提法可显著提高明胶提取率，有效缩短了生产周期，鸡肺明胶还可作为乳化剂用于食品工业中，该方法制备的鸡肺明胶在食品领域具有潜在的应用前景，可进一步提高肉鸡副产物的附加值。

关键词： 鸡肺；明胶；超声；酶提
中图分类号：TS 209　**文章编号：**1673-1689(2021)01-0075-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.010

Study on Structure and Properties of Chicken Lung Gelatin Prepared by Efficient Enzymatic Extraction

PAN Jiaxin, YANG Heng, SHI Haibo, ZHANG Xinxiao, ZOU Ye, XU Weimin, WANG Daoying*
(Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The application of ultrasound-assisted enzymatic extraction of gelatin from chicken lung was explored in this study. The structure of extracted chicken lung gelatin was investigated by ultraviolet spectroscopy, differential scanning calorimetry, circular dichroism, polyacrylamide gel electrophoresis, laser particle size distribution, scanning electron microscopy, etc. Its emulsifying property was also characterized. The yield of ultrasonic assisted enzymatic extraction was 30.08% based on the dry weight of lungs without impurity, which was 3.43 times compared with that of conventional hot water extraction. And the extraction efficiency increased by 2.15 times, while the thermal denaturation temperature slightly decreased to 90.22 ℃. The characteristic absorption peaks of chicken lung gelatin were observed at 229 nm in both extracted methods. The secondary structure of extracted gelatin using ultrasonic-assisted enzymatic extraction was more orderly with lower

收稿日期： 2020-03-18
基金项目： 国家现代农业（肉鸡）产业技术体系建设专项项目（CARS-41）；江苏省农业科技自主创新项目（CX(18)1006）；江苏省自然基金项目（BK20180300）；江苏省农业科学院基本科研业务专项资金项目（ZX(18)3009）。
* **通信作者：** 邹 烨(1986—)，女，博士，副研究员，主要从事肉类副产物高值化开发与综合利用研究。E-mail：zouye@jaas.ac.cn

degree of random curling. The average particle size distribution of gelatin extracted by ultrasound-assisted enzymatic extraction was 396 nm, reduced by 13.7%. The gelatin molecules distributed by ultrasound assisted enzyme were mainly within 45 000 ~ 95 000, which suggested almost completely degradation into smaller molecular subunits. Obvious fragmentation was observed on their surface microstructures. Insignificant difference of emulsification was determined between two extracted gelatin samples. Therefore, ultrasound-assisted enzymatic extraction can significantly improve the extraction rate of gelatin and effectively shorten the production cycle. Chicken lung gelatin can also be used as an emulsifier in the food industry with a potential application prospect in the food field, which can further improve the added value of broiler by-products.

Keywords: chicken lung, gelatin, ultrasonic, enzymatic extraction

2017 年,中国的鸡肉产量为 1 200 万吨[1],鸡肺产量约为 8.5 万吨,但其高值化产品的开发与综合利用却没有很好地进行。鸡肺难以清洗,故不为人类食用。目前,鸡肺基本以赠送的方式外包给养殖户作为狐狸和貂等的动物饲料或直接弃置于环境中,造成副产物资源浪费以及环境污染。鸡肺干物质中蛋白质质量分数高达 70%,但现有文献对鸡肺的研究极少。李小勇[2]、王春焕等[3]对猪肺及牛肺中的胶原蛋白进行了提取和纯化,为从动物肺中提取蛋白质提供了可行性参考,但有关鸡肺胶原蛋白的理化性质研究并未见报道。明胶是一种从猪、牛、鱼等动物性食品副产物中提取的天然高分子化合物,是胶原在酸、碱、酶或高温下的水解变性产物[4],可广泛应用于食品工业中。

胶原明胶化的过程涉及胶原三螺旋结构的共价交联的维系和稳定及非共价键的破坏,三螺旋结构从而展开,非螺旋结晶区的破坏使得胶原亚基分子游离出来[5]。制备明胶预处理的方法主要包括酸法、碱法、酶法、超高压法等,目前,广泛应用于生产的只有传统的酸碱法,而对于酶法制胶的理论研究较少。伴随着常规酸碱法产率低、生产周期长及废液污染等问题,Singh 等[6]比较了酸和胃蛋白酶预处理的明胶得率和特性,发现酶法提取率高,且对胶原的三螺旋结构无明显影响。超声波产生的空化效应、机械效应等多重效应不但能加快化学反应的进行,促进蛋白质溶出,还能打开胶原的纤维结构促进酶解[7]。Kim[8]等发现超声辅助乙酸提取鲈鱼皮胶原的得率较高。Li[7]等发现超声辅助胃蛋白酶提取的胶原与单一酶法比较,得率较高且生产周期缩短。

作者采用超声辅助酶解法从鸡肺中提取明胶,研究超声辅助酶提明胶的效果及在食品体系中的应用,为肉鸡副产物的高值化利用与综合开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡肺:常州市立华牧业有限公司提供;胃蛋白酶(USP 级):上海源叶生物科技有限公司提供。

超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-IID):宁波新芝生物科技股份有限公司产品;磁力加热搅拌器(78-1):常州国华电器有限公司产品;循环水式多用真空泵(SHB-Ⅲ):南京科尔仪器设备有限公司产品;CHRIST 冷冻干燥机(Alpha 1-2 LDplu):北京五洲东方科技发展有限公司产品;差示扫描量热仪(STA-449C):德国 NETZSCH 公司产品;圆二色谱仪(Jasco-715):日本 Jasco 公司产品;扫描电子显微镜(EVO-LS10):德国 ZEISSE Oberkochen 公司产品;紫外分光光度仪(UV-6100):上海美普达仪器有限公司产品;马尔文激光粒度分析(Zetasizer Nano Zs90):英国 Malvern 仪器有限公司产品;分散均质机 T25:德国 IKA 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡肺除杂 鸡肺杂蛋白质去除参照李越[9]的方法,并加以修改。

1.2.2 常规热水提取鸡肺明胶 参考张思琦[10]的方法提取明胶,并作改进。

1.2.3 超声辅助酶解提取鸡肺明胶 取 10 g 脱杂鸡肺,溶于 0.5 mol/L 乙酸,200 W 超声处理 10 min,超声处理器工作 2 s,停歇 3 s。随后于 42 ℃恒温水浴锅中 150 r/min 磁力搅拌,加胃蛋白酶 1 mL,

酶提 4 h，反应结束后 100 ℃灭酶 10 min。放置室温,再将样品通过真空抽滤瓶抽滤,收集滤液,倒入干净的表面皿，于–40 ℃冰箱冷冻，最后冷冻干燥 24 h,收集样品。

1.2.4 明胶得率的计算 明胶的得率根据 Nagarajan[11]等报道的方法测定,以去杂原料与制得样品经冷冻干燥后的质量的比值计。

1.2.5 热稳定性 明胶的玻璃转化温度用差示扫描量热(DSC)仪测定,参考汲聪玲[12]的方法。精准称量 8 mg 样品蛋白于铝坩埚中,加盖密封,设置温度的扫描范围为 20~200 ℃,升温速率为 2 ℃/min。以空铝坩埚为参比。

1.2.6 圆二色谱（CD） 明胶溶液的近紫外圆二光谱变化通过圆二色谱仪测定。将制备的样品配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 蛋白溶液，注入 1 mm 厚的样品池。设置扫描范围为 190~260 nm,扫描速度为 50 nm/min,光谱间隔为 1.0 nm。CD 数据以平均椭圆率表示,采用 CD Pro 软件分析明胶的二级结构。

1.2.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS–PAGE)分析 配制分离胶(12 g/dL)和浓缩胶(5 g/dL),明胶的亚基组分测定参照汲聪玲[12]的方法并作改进。将明胶溶液与 pH 8.8 的 0.06 mol/L Tris–HCl 缓冲液、质量分数 25%甘油、2% SDS、0.1%溴酚蓝、5% β–巯基乙醇混合,沸水煮 10 min 后 10 000 *g* 离心 3 min,取 10 μL 上清液上样。用相对分子质量为 11 000~135 000 的蛋白 Markers 做对照。加入电泳缓冲液（质量分数 0.1% SDS、0.192 mol/L 甘氨酸、0.025 mol/L Tris–HCl),在 16 mA 电流下进行 30 min 电泳后,调节电流强度为 32 mA 继续进行 1.5 h。电泳结束后,取用 R–250 考马斯亮蓝对其染色 30 min,然后用混合液（体积分数 20%乙醇与 80%蒸馏水）脱色至能辨清条带为止。

1.2.8 紫外吸收光谱扫描 鸡肺明胶的紫外吸收光谱采用紫外分光光度仪测定。取适量明胶水解液,在 190~500 nm 波长范围内,设置分辨率为 0.5 nm,用紫外分光光度仪对明胶溶液进行扫描。以去离子水为参比。

1.2.9 粒径分布 采用马尔文激光粒度分析仪检测明胶颗粒的分布。设置高稳定氦–氖激光器的光源为 633 nm,固体蓝光光源波长为 466 nm,扫描速度为 1 000 次/秒，重复性误差≤±0.5%，准确性误差≤±1.0%。取 0.5 mol/L 乙酸的多分散系数（Polydispersity Index）为 1.320，明胶的散射指数（refractive index of the scatterers)为 1.500。以湿法进样,每个样品测 3 次,取平均值。

1.2.10 扫描电镜(SEM) 取冻干后的明胶切片,置于 EVO–LS10 型扫描电子显微镜的样品舱中,在 15 mA 的电流下喷金 90 s。取出置于扫描电镜观察室,以 200 倍的放大倍数,选取不同位置的数点,调节图像至清晰,观察并拍摄鸡肺明胶的微观结构。

1.2.11 乳化性 利用浊度法测定明胶的乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)。用磷酸钠盐缓冲溶液(PBS,0.1 mol/L)配制 10 g/L 明胶溶液 12 mL,并调节 pH 至 3.0,加入花生油 5 mL。采用均质机将混合液于 10 000 *g* 下均质 1 min,制得乳状液,分别在 0 min 和 10 min 时从容器底部取 50 μL,加入 5 mL 质量分数 0.1%的 SDS，混匀后以质量分数 0.1%的 SDS 溶液作参比，立即测定其在 500 nm 处的吸光度 A_0,10 min 后,测吸光度值 A_{10}。

1.3 数据统计与分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,样品作 3 次平行试验。用组间 ANOVA 进行统计分析,Turkey 检验用于组间数据分析,$P<0.05$,表示两组之间差异显著,并用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 明胶得率和效率

明胶的得率为干燥后明胶干质量(g)与脱杂鸡肺干质量(g)的比例。本试验中,胃蛋白提取的鸡肺明胶得率为 30.08%,比常规热水提取的鸡肺明胶得率(8.77%)提高了 2.43 倍。通常,鱼皮明胶的得率为 50%左右[13],鸡肺中的杂蛋白较多,并且鸡肺的韧性及分子内与分子间的交联程度较高，导致鸡肺明胶的提取率较低，仅高于经常规热水提取法制得的军曹鱼（13.8%）[14]、舌鳎（10.3%）[14]、罗非鱼鱼鳞(7.08%)[15]等少数鱼源明胶。

2.2 热稳定性

明胶的热变性温度通过差示量热扫描(DSC)法进行测定。加热过程的 DSC 曲线中的吸热峰所对应的转变斜线中点即为明胶的热变性温度,它表示明胶分子的结构由螺旋向卷曲转变[16]。图 1 显示,明胶胃蛋白酶提取的热变性温度为 90.22 ℃，略低于常规热水提取,这一结果与陈日春[17]的研究相符,通常

酸法提取的胶原蛋白变性温度稍高于酶法提取的胶原蛋白。明胶分子的交联作用越多,其变性温度越高[18],表明胃蛋白酶提取的明胶分子间的交联程度较高。试验提取的鸡肺明胶的热变性温度高于一般的鱼类明胶,如黄华双[19]提取的鱼鳞明胶(27 ℃)以及刘全娇[20]提取的罗非鱼皮明胶(76.36 ℃)。因此鸡肺明胶具有热变性温度高的优势,可通过复合改性制备可食性膜用于食品的天然包装中,因为其既不会因为温度的升高在保存期内熔化,又方便产品的运输。此外也可作为稳定剂和增稠剂添加至对温度敏感的冷品,如冰淇淋、酸奶等食品中,能更好地抑制结晶[21],降低熔化速度,使产品组织更坚实细腻。

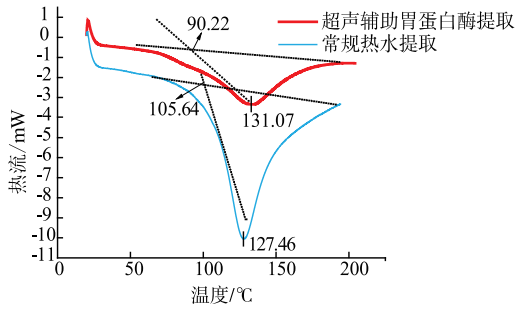


图 1　鸡肺明胶的 DSC 曲线

Fig. 1　DSC curves of chicken lung gelatin films

2.3　圆二色谱(CD)

通常，胶原在 CD 光谱图中会表现出典型的三股螺旋结构的分子特征，即在 220~230 nm 和 200 nm 处分别出现正吸收峰和负吸收峰[22]。由图 2 可见，超声辅助酶提明胶在 201 nm 波长处存在负吸收峰,在 223 nm 波长出现了一定程度的正吸收峰。220~230 nm 波段的正值吸收对应蛋白质 α-螺旋[23],胃蛋白酶切断胶原分子的 N 及 C 端的非胶原性肽[24],对胶原的三螺旋结构无明显影响,但会导致 α 链的降解[25],导致正吸收峰不明显。有研究表明,负峰强度越大,无规则卷曲程度越大[26],图 2 中胃蛋白酶提取的明胶的负峰强度明显小于常规热水提取的明胶,胶原的三螺旋结构较为完好,与郑雅交等[27]的测试结果相符。利用胃蛋白酶提取的明胶形成类胶原三股螺旋结构[28]，天然胶原的 α-螺旋部分解链,但仍维持着胶原的三螺旋结构,说明超声辅助酶提明胶的二级结构更加有序。

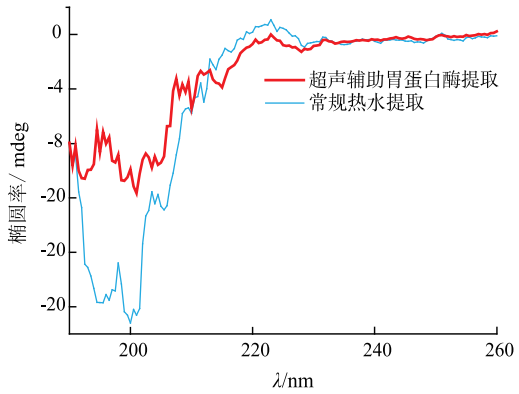
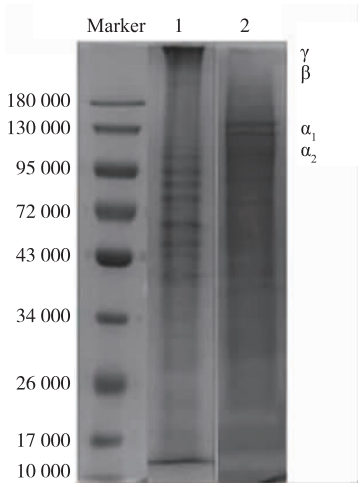


图 2　鸡肺明胶的 CD 图

Fig. 2　The CD spectra of gelatin extracted from chicken lung films

2.4　SDS-PAGE 分析

采用 SDS-PAGE 检测明胶样品的亚基组成与相对分子质量分布,明胶分子包含 α1、α2、β 这 3 条链,相对分子质量在 130 000~250 000 之间[9]。鸡肺胶原转变为明胶的过程涉及次级键的断裂,随机断裂的键造成了胶原水解产物组分的多样化,明胶分子既可能是单链,也可能是 α 链片段的共价交联体[29]。如图 3,电泳条带 2 显示,常规热水提取的鸡肺明胶组分包括 α1、α2 链,以及不清晰的小分子片段,与李越[9]在 SDS-PAGE 图谱中观察到的市售明胶类似。鸡肺胃蛋白酶提取的明胶电泳条带 1 没有明显的 α1、α2、β 这 3 条链对应的电泳条带中出现 45 000~95 000 之间的一些占绝大部分的蛋白降解条带,没有明显的 α1、α2、β 这 3 条链对应的电泳条带。在酸性条件下用胃蛋白酶处理可切断胶原分子 N 及 C 端的非胶原性肽[24],导致 α1、α2 链的展开。超声波可以对鸡肺胶原的三螺旋结构造成轻微降解,氢键的断裂使得肽链变得松散,利于后期酸性 pH 条件下的酶处理。随着酶解时间的延长,加热过程中胶原的肽端受到破坏，分子间的共价键断裂,高分子组分更容易降解,明胶分子游离出来。孙艺等[30]在提取大目金枪鱼皮明胶中的发现,内源性蛋白酶的存在使明胶降解为小分子,电泳条带 1 中出现了低于 45 000 的几条模糊的小分子蛋白条带,可能是由于进一步的酶解，明胶断裂为更小的分子。也可能是在酸性条件下浸提使明胶发生了热降解[26],溶胀的胶原由于其疏松的结构在热水提取时更容易降解。



电泳条带 1:超声辅助胃蛋白酶提取法;条带 2:常规热水提取法

图 3 鸡肺明胶的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis pattern of gelatin from chicken lung

2.5 紫外吸收光谱图

明胶中由于存在 C=O、$CONH_2$、—COOH 等发色基团,紫外特征吸收峰通常出现在 220 nm 波长左右[31],结果见图 4。与图中曲线吸收峰(229 nm)吻合,证明明胶肽链分子中存在酰胺键[32],鸡肺明胶溶液的紫外吸收光谱与 Chandra[32]等的结果类似。大多数蛋白质中存在的一些芳香族氨基酸残基在波长 270~280 nm 处存在紫外吸收峰,在一般经纯化的明胶中不会出现,超声辅助酶提明胶与常规热水提取的明胶在 280 nm 处有微量吸收,说明明胶样品中只含有少量芳香族氨基酸,可以初步判断试验提取的鸡肺明胶具有较高的纯度。超声辅助酶提明胶的杂峰较常规热水提取的明胶杂峰更明显。

2.6 粒径分布

由图 5 可知,超声辅助胃蛋白酶提取的明胶平均粒径为 396 nm,小于常规热水提取。超声波处理会改变明胶的二级结构,Yu 等[33]的研究表明超声波处理过的明胶,其平均粒径显著下降。可能是由于超声波的物理效应对分子间静电作用的破坏以及气穴效应产生的强剪切力[34],使得后续酶解过程中胶原的三螺旋结构解链程度较高,分子间的交联键断裂更为彻底,大分子蛋白进一步降解得到明胶亚基,与 SDS-PAGE 分析所得结果一致。

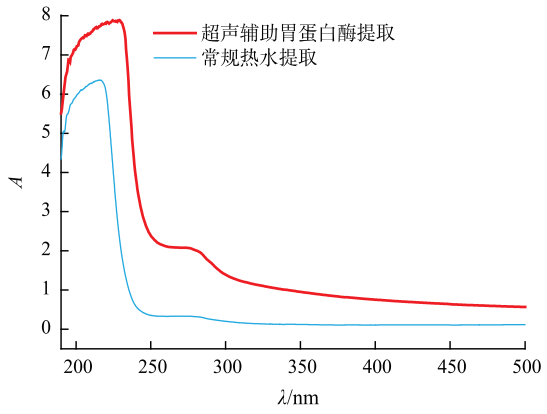


图 4 鸡肺明胶的紫外图谱

Fig. 4 Ultraviolet absorption spectra of gelatin from chicken lung

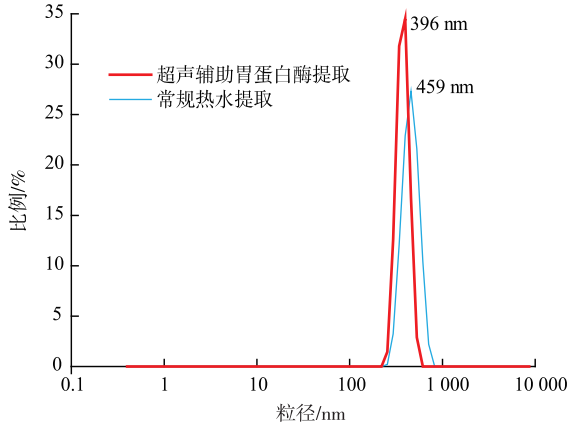


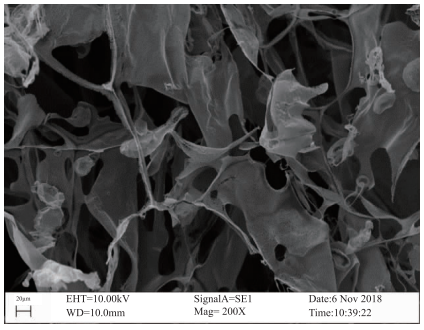
图 5 鸡肺明胶的粒径分布

Fig. 5 Particle size distribution of gelatin from chicken lung

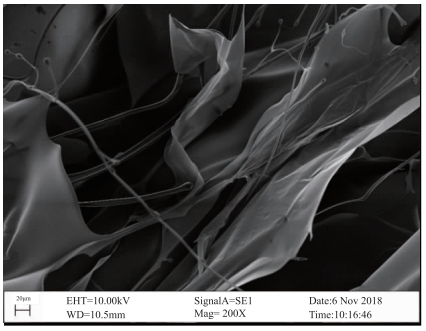
2.7 扫描电镜(SEM)

鸡肺明胶的微观结构利用 SEM 观察,与常规热水提取的鸡肺明胶(图 6(b))相比,经过超声辅助酶提取的明胶化胶原(图 6(a)),表面有较大程度的破碎,甚至出现较多的孔洞,这一变化与陈书霖等[35]研究的不同酸预处理下鲢鱼皮明胶的表观类似。在酸性条件下胶原分子间的排斥力会增强,结果导致胶原在乙酸浸泡过程中逐渐发生溶胀,胶原表观被明显破坏。超声波对明胶的分子结构起到疏松的效果[36],鸡肺胶原蛋白间原本紧密的交联变得松散,有利于后期在酸性条件下进行的酶解,使分子间的共价交联和非共价键断裂,大分子的胶原蛋白绝大多数被降解为小分子的胶原亚基,可能导致分子间疏水基团的暴露,明胶化胶原呈无规则卷曲状。超声

辅助酶提明胶具有疏松孔洞的结构特点,在糖果工业中,可作为搅打剂应用于软糖的生产,起吸水、增大体积、维持形态的作用。



(a)超声辅助酶提取的明胶



(b)常规热水提取的明胶

图 6　鸡肺明胶的微观结构(×200)

Fig. 6　Microstructure of gelatin from chicken lung (×200)

2.8　乳化性

明胶作为一种亲水、亲油的表面活性剂,肽链的疏水基团使其具有一定的乳化性[37],可以阻止晶体或离子的聚集,稳定非均相悬浮液。高速匀浆机的分散作用使得明胶分子与油滴界面接触的数量增多,溶液中的明胶蛋白覆在油滴表面形成水包油的状态。制备的两种明胶的乳化活性无明显差异,其中超声辅助酶提明胶的乳化稳定性((139.92±9.8) min)略低于常规热水提取明胶((148.72±11.3) min),但仍显著高于鲶鱼皮明胶[38](<60 min)。乳液中分子间的吸引力与运动碰撞形成了较大的液滴,其表面的解吸附作用使得液滴变得不稳定,均质后的明胶会出现一些较大的乳液液滴。明胶分子与油滴界面间的疏水平衡随着明胶溶解度的降低而被破坏,超声辅助酶提明胶的乳化稳定性由于乳液粒径的增大而出现下降,可通过添加表面活性剂或修饰侧链基团对酶提明胶进行改性。

3　结　语

以鸡肺为原料提取明胶,通过分析其结构和乳化性,探究超声辅助酶法的影响。研究发现,在超声波和胃蛋白酶的作用下,鸡肺明胶的相对分子质量降低,表面微观结构疏松破碎,平均粒径减小13.7%。试验结果表明,鸡肺明胶具有较高的纯度,与常规热水法相比,超声辅助酶提明胶的生产周期显著缩短,得率显著提高,具有良好的热稳定性与乳化稳定性,二级结构更为有序,可作为鱼源明胶的替代品。

参考文献:

[1] 辛翔飞,王济民. 2017 年我国肉鸡产业发展报告及政策建议[J]. 中国家禽,2018,40(7):68-72.
[2] 李小勇,李洪军. 猪肺胶原蛋白含量的测定[J]. 肉类研究,2006(7):35-37.
[3] 王春焕,刘学军,吴雪,等. 牛肺管营养成分的测定[J]. 农产品加工(学刊),2012(8):131-134.
[4] 韩军,朱天虹,袁信华,等. 斑点叉尾鮰鱼头明胶性质的研究[J]. 大连水产学院学报,2008(1):42-46.
[5] 周梦柔,马良,张宇昊. 超高压诱导胶原蛋白明胶化机制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(5):1313-1317.
[6] 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.
[7] LI D F,MU C,CAI S,et al. Ultrasonic irradiaton in the enzymatic extraction of collagen [J]. **Ultrasonics Sonochemistry**,2009,16(5):605-609.
[8] KIM H K,KIM Y H,KIM Y J,et al. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from the skins of seabass lateolabraxjaponicas[J]. **Fisheries Science**,2012,78(2):485-490.
[9] 李越,刘志伟,张国秀,等. 鲢鱼皮、鱼鳞胶原的制备及理化特性的研究[J]. 现代食品科技,2016,32(3):232-238.
[10] 张思琦,马月,罗永康,等. 鲢鱼皮明胶的提取制备工艺优化及其成膜性能研究[J]. 食品科技,2016,41(11):202-208.
[11] NAGARAJAN M,BENJAKUL S,PRODPRAN T,et al. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid

（Loligoformosana）skin as affected by extraction temperatures[J]. **Food Hydrocolloids**，2012，29（2）：389-397.
[12] 汲聪玲，陆剑锋，吕顺，等. 不同提取温度对白鲢鱼皮明胶理化性质的影响[J]. 食品科学，2016，37（9）：117- 122.
[13] DUAN R，ZHANG J J，XING F F，et al. Study on the properties of gelatins from skin of carp （*Cyprinus carpio*）caught inwinter and summer season[J]. **Food Hydrocolloids**，2011，25（2）：368-373.
[14] KALA P K，MATHEWS. Extraction and characterization of gelatin from skin of cobia（*Rachycentron canadum*）and cynoglossus（*Cynoglossus cynoglossus*）[J]. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**，2017，4（3）：1719-1727.
[15] 李鹏. 罗非鱼鱼鳞明胶的高值化利用[D]. 海口：海南大学，2014.
[16] NORZIAH M H，AL-HASSAN A，KHAIRULNIZAM A B，et al. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes：thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties[J]. **Food Hydrocolloids**，2009，23（6）：1610-1616.
[17] 陈日春，郑宝东. 鲢鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白理化特性研究[J]. 中国食品学报，2013，13（12）：83-88.
[18] PIETRUCHA K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**，2005，36（5）：299-304.
[19] 黄华双. 罗非鱼鱼鳞明胶改性及其应用研究[D]. 湛江：广东海洋大学，2012.
[20] 刘全娇. 鱼皮明胶—海藻酸钠复合膜的制备、性质和应用研究[D]. 合肥：合肥工业大学，2018.
[21] 翟丽丽. 明胶在乳制品中的应用现状及发展前景分析[J]. 农产品加工（学刊），2014（2）：54-55.
[22] OGAWA M，POTIER R J，MOODY M W，et al. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum（*Pogonias cromis*）and sheepshead seabream（*Archosargus probatocephalus*）[J]. **Food Chemistry**，2004，88（4）：495-501.
[23] NIKOO M，BENJAKUL S，OCEN D，et al. Physical and chemical properties of gelatin from the skin of cultured Amur sturgeon（*Acipener schrenckii*）[J]. **Journal of Applied Ichthyology**，2013，29（5）：943-950.
[24] 永井裕，藤本大三郎，刘平. 胶原蛋白实验方法[M]. 上海：上海中医学院出版社，1992：10.
[25] 胡胜，李志强，陈敏. 皮胶原蛋白的酶法提取及在高附加值领域的应用[J]. 皮革科学与工程，2002，10：38- 43.
[26] 姚峰，陈书霖，唐兰兰，等. 鱼皮质量分数对热水浸提明胶的性质及其成膜性能的影响 [J]. 食品工业科技，2015，36（10）：114-118.
[27] 郑雅爻，马月，罗永康，等. 鲢鱼皮明胶提取方法和谷氨酰胺转氨酶改性对明胶结构和膜性能的影响[J]. 食品科学，2017，38（19）：92-99.
[28] USHA R，RAMASAMI T. The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation：using DSC，circulardicroism and viscosity [J]. **Thermochimica Acta**，2004，409：201-206.
[29] 张丰香，王璋，许时婴. 鱼鳞明胶的提胶工艺[J]. 食品与发酵工业，2008（9）：96-100.
[30] 孙艺，韩霜，马良，等. 大目金枪鱼皮胶原明胶化过程中酸碱浓度对明胶理化性质的影响[J]. 食品与发酵工业，2018，44（4）：73-78.
[31] 韩霜，马良，杨晖，等. 大目金枪鱼皮明胶的理化性质及结构分析[J]. 食品科学，2018，39（10）：40-45.
[32] CHANDRA M V，SHAMASUNDAR B A. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of fresh waterfishcatla[J]. **Food Hydrocolloids**，2015，48：47-54.
[33] YU Z L，ZENG W C，ZHANG W H，et al. Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and its mechanism[J]. **Ultrasonics Sonochemistry**，2016，29：495-501.
[34] 李双，涂宗财，陈雪岚. 鱼明胶提取及其品质影响因素[J]. 食品与发酵工业，2019，45（2）：252-259.
[35] 陈书霖，郝更新，翁武银. 酸预处理时间对鲢鱼皮明胶理化性质的影响[J]. 现代食品科技，2016，32（6）：239-245.
[36] 曾小芳，赵伟，杨瑞金，等. 超声波辅助酶法提取骨明胶研究[J]. 食品工业科技，2017，38（14）：167-170.
[37] 杨晖，马良，于玮，等. 兔皮明胶功能特性及其影响因素[J]. 食品科学，2016，37（23）：7-12.
[38] 李从虎，孙秀芳，王慧婷，等. 鲶鱼皮明胶的功能性质分析[J]. 食品与发酵工业，2018，44（8）：114-119.