

草鱼鱼鳞胶原蛋白酸酶分步提取工艺研究

Combinated use of enzyme and acid for collagen extraction from fish scales

陈铁壁¹ 刘冬敏¹ 鹿康² 王建辉²

CHEN Tie-bi¹ LIU Dong-min¹ LU Kang² WANG Jian-hui²

周强¹ 邓胜国¹ 李梦群¹

ZHOU Qiang¹ DENG Guo-sheng¹ LI Meng-qun¹

(1. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199;

2. 长沙理工大学湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

(1. Department of Biology and Chemistry, Hunan University of Science and Technology, Yongzhou, Hunan 425100, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for Food Processing of Aquatic Biotic Resources, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:为实现鱼鳞胶原蛋白的高效提取,在优化脱钙、混酸法和酶法提取工艺基础上,对鱼鳞胶原蛋白的酸酶进行分步提取。研究发现,鱼鳞最佳脱钙工艺为料液比 8:100(g/mL),盐酸浓度 1.0 mol/L,反应时间 1.0 h,反应温度 20 ℃;混合酸法提取鱼鳞胶原蛋白的最佳条件为醋酸料液比 1:12(g/mL),柠檬酸料液比 1:10(g/mL),乳酸料液比 1:12(g/mL),即混合酸料液比为 1:34(g/mL),其中,0.8 mol/L 柠檬酸、1 mol/L 乳酸、0.8 mol/L 醋酸的体积比为 6:5:6,提取时间 2 d,胶原蛋白的提取率为 48.14%;最佳酶法提取条件为胃蛋白酶用量 450 U/g,提取温度 30 ℃,提取时间 72 h,该条件下提取率为 45.26%。酸酶耦合法优于单一方法或同种方法两次提取的效果,可实现酸溶性和酶溶性胶原蛋白的连续提取,先酸后酶法胶原蛋白的提取率达 84.61%,SDS-PAGE 凝胶电泳发现其为 I 型胶原蛋。

关键词:草鱼;鱼鳞;酸提;酶提;胶原蛋白

Abstract: In order to realize the efficient extraction of collagen from fish scales, acid-enzyme coupling methods was used for collagen extraction based on the optimized decalcification, mixed-acid and enzy-

matic extraction. The optimum decalcification of fish scales was as follows. The solid to liquid ratio was 8:100, soluted in 1.0 mol/L hydrochloric acid, and then reaction at 20 ℃ for 1.0 h. The best conditions for collagen extraction using mixed acid were 1:12 of acetic acid, 1:10 of citric acid, and 1:12 of lactic acid for 3 d extraction and the extraction yield of it was 48.14%. The best enzymatic extraction conditions were shown to be 450 U/g of pepsin at the extraction temperature of 30 ℃ for 72 h and the yield was 45.26%. Acid-enzyme coupling method showed better effect than acid or enzymatic extraction only, even though repeating them twice respectively was not as effective as the coupled one, in spite of relatively high cost and time-consuming ($P < 0.05$). We could obtain 84.61% of the collagen using mixed acid followed by enzymatic extraction, and the extracted collagen was identified to be type I one using SDS-PAGE.

Keywords: Grass carp; fish scale; acid extraction; enzymatic extraction; collagen

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31301564);湖南省自然科学基金项目(编号:2015JJ2011);湖湘青年英才支持计划项目(编号:2015RS4051);永州市科技局科技计划项目(编号:永科发[2009]20号);湖南省高校科技创新团队支持计划资助(编号:2012-318);湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心开放基金资助项目(编号:2016GCZX02,2015GCZX08)

作者简介:陈铁壁,男,湖南科技学院实验师,硕士。

通讯作者:王建辉(1980—),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail:wangjh0909@163.com

收稿日期:2016-05-11

中国是世界上水产品产量最大的国家,也是世界上唯一养殖量超过捕捞量的国家,水产品产量占世界总产量的 1/3 左右。2014 年中国水产品总量达 6 461.52 万 t,淡水产品产量 3 165.30 万 t,占总产量的 48.98%,同比增长 4.36%^[1],其中,淡水养殖鱼类中,草鱼产量最高,为 537.68 万 t。据统计,中国每年鱼的废弃物总量达 200 万 t 左右^[2],其中 15% 是鱼鳞,约 30 万 t^[3],若处理不当,浓烈的鱼腥味或发臭气味势必给周围环境带来巨大影响。对其副产物进行精细加工,不但可提高水产品加工的附加值,安置渔区部分剩余劳动力,而且可带动如加工机械业等相关行业的发展,具有明显的经济和社会效益。

鱼鳞胶原蛋白因其多功能性,已逐渐受到广大研究者的关注,对鱼鳞胶原蛋白的研究和应用业已渗入多个行业和领域。然而,目前中国该产业尚处于初级收集阶段,其中,鱼鳞胶原蛋白提取工艺耗时长,成本高,提取率不高是主要的瓶颈难题^[4-5]。是故,更为安全、高效、低成本的提取方法的研究已成为实现其高值利用的关键。国内外对于鱼鳞胶原蛋白的提取及其功能性研究颇多,但均以单一酸法或酶法提取为主。研究发现,酸溶性胶原蛋白和酶溶性胶原蛋白之间在分子构型、氨基酸组成等方面的差异不明显^[6]。本研究拟采用酸酶分步法提取草鱼鱼鳞胶原蛋白,旨实现鱼鳞胶原蛋白的高效提取,为其高效利用提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草鱼鱼鳞:湖南省益阳益华水产品有限公司,经清水反复清洗后晾干,用万能粉碎机磨成粉状后,于4℃以下保存,备用。

1.2 化学试剂

柠檬酸、醋酸、乳酸、氯化钠、乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

高氯酸:分析纯,北京兴瑞达化工厂;

EDTA:分析纯,长沙湘科精细化工厂;

铬黑 T:分析纯,上海迈坤化工有限公司;

盐酸:分析纯,衡阳市凯信化工试剂有限公司;

氢氧化钠:分析纯,津市风船化学试剂科技有限公司;

L-羟脯氨酸:分析纯,上海安耐吉化学有限公司;

胃蛋白酶:≥1 200 U/g,国药集团化学试剂有限公司。

1.3 主要仪器

数显恒温水浴锅:HH-6型,郑州佳创仪器设备有限公司;

紫外分光光度计:UV-100型,天津市普瑞斯仪器有限公司;

恒温磁力搅拌器:HJ-3型,苏州江东精密仪器有限公司;

台式pH计:DD-27-Delta320型,北京卓川电子科技有限公司;

电子分析天平:FA2004型,北京衡器厂有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1型,长沙太康仪器设备有限公司;

马弗炉:LX/10型,常州市兴光窑炉有限公司;

台式离心机:DT5-6A型,北京时代北利离心机有限公司;

万能粉碎机:FW100型,东西仪科技有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 草鱼鱼鳞的基本成分分析

(1)水分测定采用直接干燥法:按GB/T 5009.3—2003执行。

(2)粗蛋白测定采用量凯氏定氮法:按GB/T 5009.5—2003执行。

(3)粗脂肪测定采用索氏抽提法:按GB/T 5009.6—2003执行。

(4)灰分测定采用马弗炉灰化法:按GB 5009.4—2003执行。

1.4.2 胶原蛋白含量的测定 采用 Woessner 比色法^{[7]157-158}。胶原蛋白的含量由所测羟脯氨酸含量乘以相关系数即得,同一种鱼鳞相关系数一定,胶原蛋白的提取率可表示为:

$$\text{提取率} = \frac{\text{酸(酶)水解液中羟脯氨酸的含量}}{\text{鱼鳞羟脯氨酸含量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.3 鱼鳞脱钙工艺研究 Ca^{2+} 标准曲线的绘制参照王信苏等^[8]的方法,以铬黑 T 为指示剂,用 0.075 mol/L EDTA 溶液滴定,得 EDTA 消耗量与 Ca^{2+} 浓度关系的标准曲线 $y = 2.711x + 0.1849$ ($R^2 = 0.9982$)。根据以往研究报告^{[7]1-81[8-10]},脱钙工艺研究按表 1 因素水平表进行正交试验,根据 EDTA 消耗量计算溶液中 Ca^{2+} 浓度,以脱钙率为指标,筛选出最佳脱钙工艺。

表 1 脱钙因素水平表

Table 1 The factor and level graph for decalcification

水平	A 料液比 (g/mL)	B 时间/h	C 盐酸浓度/ (mol·L ⁻¹)	D 温度/℃
1	6:100	0.5	0.6	20
2	8:100	1.0	0.8	25
3	10:100	1.5	1.0	30

1.4.4 酸法提取胶原蛋白 胶原蛋白的酸法提取中以往多以柠檬酸、乳酸、醋酸等单一酸水解,提取时间需 3d^[3,10];本试验在鱼鳞脱钙处理后,采用浓度为 0.8 mol/L 柠檬酸、1 mol/L 乳酸、0.8 mol/L 醋酸,在 20℃ 下,磁力搅拌提取 2 d,按表 2 因素水平表采用混合酸法进行胶原蛋白的提取,以胶原蛋白的提取率为评价指标,筛选最佳酸法提取工艺。

表 2 酸法提取胶原蛋白因素水平表

Table 2 The factor and level graph for acid extraction of collagen from fish scales (g/mL)

水平	A 柠檬酸料液比	B 醋酸料液比	C 乳酸料液比
1	1:8	1:8	1:8
2	1:10	1:10	1:10
3	1:12	1:12	1:12

1.4.5 酶法提取胶原蛋白 鱼鳞脱钙后,根据以往研究^[11-14],分别选取提取温度、提取时间、胃蛋白酶用量为考察因素,按表 3 因素水平表进行正交试验,以胶原蛋白的提取率为评价指标,筛选最佳酶法提取工艺。

1.4.6 酸酶分步法提取胶原蛋白 选取上述两种提取胶原蛋白的最优方案,分别采用酸—酸、酸—酶、酶—酶、酶—酸二次提取法,以胶原蛋白提取率为判断标准筛选最优试验方案。

表 3 酶法提取胶原蛋白因子水平表

Table 3 The factor and level graph for enzymatic extraction of collagen from fish scales

水平值	A 温度/℃	B 时间/h	C 酶用量/ (U · g ⁻¹)
1	30	24	150
2	25	48	300
3	20	72	450

1.4.7 胶原蛋白的纯化 参考段宙位等^[15]的方法,并稍作修改。取 1.4.6 中所得粗蛋白,加入 NaCl 至溶液终浓度为 3.0 mol/L,于 4 ℃ 条件下 6 000 r/min 离心 10 min,重复两次,透析,冷冻干燥,所得样品即为纯化后的胶原蛋白。

1.4.8 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分析 参考周爱梅等^[16]的方法略加改进。先配制 2.0 mg/mL 的胶原蛋白溶液,与添加有 SDS、甘油、溴酚蓝、 β -巯基乙醇的 Tris—HCl 缓冲液混合,在沸水里加热 3 min,冷却备用。用 7.5% 的丙烯酰胺对胶原蛋白进行电泳分析,电泳条件为 200 V、2.0 h。采用考马斯亮蓝 R250 染色,用体积分数为 7.5% 的醋酸和 5% 的甲醇脱色。

1.5 数据分析

结果以平均值表示,显著性统计采用 SAS 9.2 统计软件的单因素方差分析,并进行 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 鱼鳞的基本成分

由表 4 可知,草鱼鱼鳞中粗脂肪含量为 0.51%,蛋白质含量丰富,达 60.02%,其灰分含量高达 24.37%。因鱼鳞中的灰分和脂肪均可能阻碍提取液与鱼鳞间的接触,直接影响到鱼鳞胶原蛋白的提取,且鱼鳞灰分中钙质多以羟基磷灰石形式存在,黏附于胶原纤维的表面^[17-18],因此,在提取鱼鳞胶原蛋白过程中,首先必须使胶原蛋白脱离磷灰石晶格的束缚而溶出^[19-20]。因鱼鳞中粗脂肪含量较低,本试验提取前的预处理主要对鱼鳞进行脱钙处理。

表 4 鱼鳞中各组分的含量[†]Table 4 Content of each component of fish scales ($n=5$) %

水分	灰分	粗脂肪	粗蛋白
13.05±1.45	24.37±2.34	0.51±0.02	60.02±4.65

† 各组分均以干基计。

2.2 鱼鳞脱钙工艺优化

选定料液比、时间、温度、盐酸浓度 4 因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,由表 5 可知,影响鱼鳞脱钙效果各因素中主次关系依次为:温度(D) > 料液比(A) > 盐酸浓度(C) > 时间(B),脱钙最优方案为 $A_2B_2C_3D_1$,即以 1.0 mol/L 盐酸为脱钙液,料液比为 8 : 100(g/mL),在 20 ℃ 下提取 1.0 h。

表 5 脱钙正交试验表

Table 5 Data and analysis of orthogonal test for decalcification

试验号	A	B	C	D	脱钙率/%
1	1	1	1	1	5.07
2	1	2	2	2	4.96
3	1	3	3	3	4.37
4	2	1	2	3	4.52
5	2	2	3	1	6.08
6	2	3	1	2	4.69
7	3	1	3	2	3.93
8	3	2	1	3	2.16
9	3	3	2	1	4.87
k_1	4.80	4.51	3.97	5.34	
k_2	5.10	4.40	4.78	4.53	
k_3	3.65	4.64	4.79	3.68	
R	1.45	0.24	0.82	1.66	

2.3 胶原蛋白的酸法提取工艺优化

当前用于鱼鳞胶原蛋白提取的试剂多以可食用的柠檬酸、醋酸、乳酸为主,因此提取法无需严格的后续脱酸工艺。但在以往研究中,胶原蛋白的提取研究均用单一酸,其得率均不高。本研究分别以柠檬酸、乳酸和醋酸的料液比三因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。由表 6 可知,影响混合酸法提取鱼鳞胶原蛋白的主次因素依次为:醋酸(B) > 柠檬酸(A) > 乳酸(C),其最佳混合酸的料液比为 1 : 34 (g/mL),其中,0.8 mol/L 柠檬酸、1 mol/L 乳酸、0.8 mol/L 醋酸的体积比为 6 : 5 : 6。验证实验发现,按最优混酸提取方案,磁力搅拌提取时间 2 d,胶原蛋白的提取率达 48.14%。

表 6 酸法提取胶原蛋白正交试验表

Table 6 Data and analysis of orthogonal test for acid extraction of collagen from fish scales

试验号	A	B	C	D	胶原蛋白 (空列) 提取率/%
1	1	1	1	1	31.85
2	1	2	2	2	36.11
3	1	3	3	3	35.80
4	2	1	2	3	31.75
5	2	2	3	1	41.71
6	2	3	1	2	34.16
7	3	1	3	2	36.95
8	3	2	1	3	40.59
9	3	3	2	1	36.48
k_1	34.59	3.52	35.53	36.68	
k_2	35.87	39.47	34.78	35.74	
k_3	38.01	35.48	38.15	36.05	
R	3.42	5.95	3.37	0.94	

2.4 胶原蛋白的酶法提取工艺优化

胶原蛋白变性温度较低,在 32 ℃ 左右,因胃蛋白的易获得性,且价格不高,最适温度相近,同时,胃蛋白酶对胶原蛋白的有限水解可增大胶原蛋白的溶解度。是故,本研究选用胃蛋白酶,在正交试验设计时,选择反应温度小于 32 ℃。由表 7 可知,影响酶法提取鱼鳞胶原蛋白的主次因素依次为:A(温度)>C(酶用量)>B(时间),最佳提取条件为:酶用量 450 U/g,于 30 ℃ 条件下提取 72 h,此时提取率为 45.26%。

表 7 酶法提取胶原蛋白正交试验表

Table 7 Data and analysis of orthogonal test for enzymatic extraction of collagen from fish scales

试验号	A	B	C	D (空列)	胶原蛋白 提取率/%
1	1	1	1	1	32.91
2	1	2	2	2	38.14
3	1	3	3	3	43.41
4	2	1	2	3	35.16
5	2	2	3	1	34.28
6	2	3	1	2	36.18
7	3	1	3	2	35.55
8	3	2	1	3	32.89
9	3	3	2	1	34.23
k_1	38.15	34.54	33.99	33.81	
k_2	35.21	35.10	35.84	36.62	
k_3	34.22	37.94	37.75	37.15	
R	3.93	3.40	3.75	3.35	

2.5 胶原蛋白的酸酶分步法提取

由表 8 可知,酸酶分步法均显著提高了鱼鳞胶原蛋白的提取率($P < 0.05$),且先酸后酶法优于先酶后酸法($P < 0.05$),其提取率分别为 84.61%,76.65%。可能缘于先酸后酶法通过破坏鱼鳞的表面结构,使胃蛋白酶更容易渗入到鱼鳞中,有利于胃蛋白酶发挥酶解作用,从而提高了胶原蛋白的提取效率。

2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

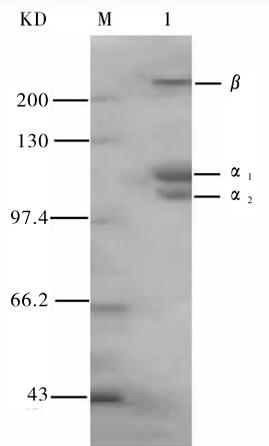
由图 1 可知,酸酶分步法提取的鱼鳞胶原蛋白含有两条 α 肽链(α_1 、 α_2 ,分子量分别约为 120,110 kD)和一条 β 聚合链(α 的二聚体,分子质量约为 200 kD),与钟朝辉等^[14]的研

表 8 酸酶耦合法试验方案及其结果[†]

Table 8 Experimental program and results of acid-enzyme coupling extraction of collagen

试验号	第一次提取	第二次提取	胶原蛋白提取率/%
1	酸法提取	酸法提取	54.21±2.36 ^c
2	酸法提取	酶法提取	84.61±5.35 ^a
3	酶法提取	酶法提取	49.64±3.32 ^c
4	酶法提取	酸法提取	76.65±4.56 ^b

† 同列上标不同表示差异显著($P < 0.05$)。



M. 次高分子量标准蛋白 Marker

1. 酸酶分步法提取的鱼鳞胶原蛋白样品

图 1 SDS-PAGE 凝胶电泳

Figure 1 SDS-PAGE of fish scale collagen

究结果相似,可初步确定酸酶分步法提取的鱼鳞胶原蛋白为 I 型胶原蛋白,图谱中无其他条带,可见酸酶分步法所提胶原蛋白纯度较高,且未变性。

3 结论

本研究以草鱼鱼鳞为研究对象,探索鱼鳞胶原蛋白的高效提取工艺,系列研究发现:鱼鳞最佳脱钙工艺为料液比 8:100(g/mL),盐酸浓度 1.0 mol/L,20 ℃ 条件下反应 1.0 h;采用三酸(柠檬酸、乳酸、醋酸)联用,胶原蛋白的提取率为 48.14%,较单一酸法提取大大节省了提取时间;酶法提取在胃蛋白酶活性范围之内,其最佳提取工艺为:酶用量为 450 U/g,于 30 ℃ 条件下提取 72 h;采用酸酶分步法鱼鳞胶原蛋白的提取率均显著高于单一提取方法或同种方法两次提取的效果($P < 0.05$)。本研究实现了酸溶性胶原蛋白和酶溶性胶原蛋白的连续提取,能保持胶原蛋白原有结构不变,能更为有效地利用鱼鳞蛋白,减少资源浪费和环境污染,对鱼鳞蛋白乃至淡水鱼加工副产物的高效利用具有很好的技术和理论指导意义。

参考文献

- [1] 农业部渔业局. 2015 年全国渔业经济统计公报[Z]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 1-2.
- [2] 杨叶辉. 利用水产品加工副产物开发羟基磷灰石的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 263-268.
- [3] 张丰香, 许时婴, 王璋. 鱼鳞明胶生产的浸酸脱钙工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 28(3): 199-204.
- [4] 陈丽丽, 赵利, 刘华, 等. 有机酸提取鲟鱼皮胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 118-121.
- [5] 任婷婷, 董秀萍, 朱蓓薇, 等. 响应面法优化海参胶原蛋白肽的制备条件[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 120-123.
- [6] 张俊杰, 段蕊, 陈玲, 等. 鱼皮 ASC、PSC 的提取和性质比较[J]. 食品科技, 2008(10): 173-177.
- [7] 将挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

(下转第 219 页)

食品物流中的薄弱环节,定期进行评估、监测,减少食品在物流运输和仓储期间对食品的质量造成的破坏。其中首要的是增强食品物流中影响食品质量风险来源的识别。在食品的运输和仓储过程中,影响食品质量的风险存在很多种可能,每种风险发生的概率或者危害程度,以及发生危险的方式各不相同,食品物流企业应当根据风险种类的不同,寻找应对不同风险的解决方案,不断减少、化解影响食品质量、安全的各种风险。在判断食品物流中的风险时,应当主要参考危险物的数量和剂量的描述、对食品各个环节可能发生风险的程度及可能造成的后果进行分别评测^[10]。

另外,应当逐步建立食品物流的风险监管机制,让企业食品物流的风险管理和评估常态化,多方协调社会各方力量,包括政府、媒体、企业协会以及消费者等多方力量,利用整个社会的机制来约束和规范食品物流企业的行为^[11]。以政府和企业协会为例,政府应当建立统一的食物物流监管机制,避免不同监管部门执法间的冲突,不断加强对于食品物流企业的资格审查,逐步疏通食品物流行业的准入机制和退出机制,全面整顿食品物流业的市场秩序。企业协会则是逐步建立行业的内部约束规则,同时注重食品物流行业的宣传,做好行业的内部监管。

4 结语

为保障食品行业的健康发展以及危害食品消费者的合法权益,应当大力发展食品物流行业,加大食品物流基础设施投入,不断提高食品物流技术,建立食品物流安全的保障体系,完善食品物流现代化管理体系,注重食品物流配送过程中的安全监测与监控技术,不断引进先进的食品物流管理

经验,完善中国食品物流的法律法规,充分发挥政府、行业协会及社会大众对食品物流的监督作用,不断满足消费者对食品的更高要求,逐步奠定食品物流行业的坚实基础,促进中国食品物流行业快速、持续、健康发展。

参考文献

- [1] 关锐捷, 龙文军. 中国现代农产品物流: 战略构想与政策建议[J]. 中国农垦, 2007(4): 50-53.
- [2] 王之泰. 物流如何面对食品安全问题[J]. 中国储运, 2011(8): 39-42.
- [3] 赵飞, 王中东, 潘鸿, 等. 我国食品物流的发展现状及对策[J]. 安徽农业科学, 2008(8): 34-35.
- [4] 李作战. 我国食品物流业发展的特征、瓶颈及其突破[J]. 中国酿造, 2009(1): 186-187.
- [5] 重大农产品物流政策概述[J]. 中国农民合作社, 2011(11): 17-18.
- [6] 叶勇, 张友华. 中国冷链物流的最新发展和对策研究[J]. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2009(1): 23-26.
- [7] 陈蓝荪. 现代食品物流学科专业建设与教学改革的探索[J]. 高等农业教育, 2008(7): 50-53.
- [8] 徐亚妮, 张仁颐. 第三方冷链物流企业运营发展策略[J]. 物流科技, 2011(6): 118-120.
- [9] 曾丽. 食品安全法律体系的缺陷及完善路径[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 274-276.
- [10] 张峰学. 中国食品安全监管体系改革的法律思考[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 255-257.
- [11] 虞巧颖. 区域物流对区域经济增长的作用分析——以长沙三角洲为例[D]. 北京: 北京交通大学, 2007: 15-32.

(上接第 162 页)

- [13] 夏俊松, 阎淳泰, 葛向阳. 利用活性干酵母制备酵母抽提物的工艺研究[J]. 中国酿造, 2010(4): 83-88.
- [14] 晏志云. 酵母抽提物的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1999.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SB/T 1031—1999 蛋白酶活力测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [16] MORESI M, ORBAN K. Effect of enzymes industry[M]. New

York: The Nature Press, 1979: 21-23.

- [17] 谢晓航, 韩宏明, 卢国伟. 啤酒酵母复合酶法生产酵母抽提物工艺的研究[J]. 中国调味品, 2012, 38(5): 62-67.
- [18] 林美丽, 许倩倩, 宋焕禄, 等. 酵母抽提物香气活性化合物的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 259-262.
- [19] 孙伟峰. 酵母活性肽制备及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009: 19, 24.

(上接第 166 页)

- [8] 王信苏, 汪之和. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 148-150.
- [9] 吴波, 陈运中, 律佳雪, 等. 响应面分析法优化鱼鳞脱钙条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 181-184.
- [10] 潘杨, 许学勤. 酸碱法提取鱼鳞胶的工艺研究[J]. 食品科技, 2008(3): 183-186.
- [11] 王屹, 刘剑虹, 李可伟. 胃蛋白酶法提取草鱼鱼鳞胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(4): 134-136.
- [12] 张俊杰, 段蕊, 潘秀楼. 鲤鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白提取工艺的应用[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2006, 15(4): 55-58.
- [13] 刘艳, 刘章武, 唐婧苗, 等. 酶解淡水鱼鳞制备水解胶原蛋白的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(2): 11-17.
- [14] 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白的提取

及基本特性[J]. 水产科学, 2007, 26(2): 91-94.

- [15] 段宙位, 申铨日, 陈秀明, 等. 罗非鱼尾胶原蛋白的提取与鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 59-64.
- [16] 周爱梅, 张培丽, 刘欣, 等. 淡水鱼皮胶原蛋白提取优化工艺研究(II)[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 113-117.
- [17] IKOMA T, KOBAYASHI H, TANAKA J, et al. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pafurus major* [J]. Journal of Structural Biology, 2003, 142: 327-333.
- [18] 刘文涛, 李国英, 缪煜清, 等. 鱼鳞的研究现状及应用前景[J]. 水利渔业, 2006, 6(1): 20.
- [19] 刘艳, 刘章武, 唐婧苗, 等. 淡水鱼鳞水解胶原蛋白的酶法制备[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 99-103.
- [20] 张俊杰, 曾庆孝. 鱼鳞盐酸脱钙过程中胶原蛋白含量的变化[J]. 食品与发酵工艺, 2004, 30(4): 40-43.