

冯玲玲, 冯进, 李春阳. 海蜇 I 型胶原蛋白的提取及结构特性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 15–21. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050237

FENG Lingling, FENG Jin, LI Chunyang. Extraction and Structural Characteristics of Type I Collagen from *Rhopilema esculenta*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 15–21. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050237

· 研究与探讨 ·

海蜇 I 型胶原蛋白的提取及结构特性研究

冯玲玲^{1,2}, 冯 进², 李春阳^{1,2,*}

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 江苏省农科院农产品加工所, 江苏南京 210014)

摘 要: 以海蜇为原料, 采用盐酸-胃蛋白酶法提取胶原蛋白, 并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、紫外光谱 (UV-visible spectroscopy, UV)、氨基酸分析、红外光谱 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)、圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 以及扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 对其结构特性进行了系统全面的研究。结果显示, 海蜇胶原蛋白在 135 kDa 左右有一条 α -链, 在 245 kDa 以上有一条 β -链和 γ -链, 紫外吸收峰在 233 nm 处, 符合 I 型胶原蛋白的特征, 其亚基组成可能为 $[\alpha_1(I)]_3$ 。海蜇胶原蛋白中含量最高的氨基酸为甘氨酸, 占氨基酸总量的 25.99%, 且含有 15.94% 的亚氨基酸。红外光谱和圆二色谱均表明海蜇胶原蛋白分子排布紧凑, 具有主要由氢键构成的完整三螺旋结构。扫描电镜结果显示海蜇胶原蛋白具有多层聚集、以纤维为主的无规则网状结构。

关键词: 海蜇, 胶原蛋白, 胃蛋白酶, 氨基酸组成, 结构特性

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)07-0015-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050237

Extraction and Structural Characteristics of Type I Collagen from *Rhopilema esculenta*

FENG Lingling^{1,2}, FENG Jin², LI Chunyang^{1,2,*}

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, collagen was extracted from *Rhopilema esculenta* using hydrochloric acid-pepsin methodology, and its detailed structure were characterized by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), UV-visible spectroscopy (UV), amino acid analysis, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), circular dichroism (CD), and scanning electron microscope (SEM). The SDS-PAGE pattern of *Rhopilema esculenta* collagen presented an α -chain at about 135 kDa with a β -chain and γ -chain above 245 kDa. In addition, the UV absorption peak of *Rhopilema esculenta* collagen was centered at 233 nm, revealing that the *Rhopilema esculenta* collagen herein adopted the features of type I collagen with a possible subunit composition of $[\alpha_1(I)]_3$. The most abundant amino acid in *Rhopilema esculenta* collagen was glycine, accounting for 25.99% of the total amino acids. Besides, the collagen in this work contained 15.94% imino acid. Results of Fourier transform infrared spectroscopy and circular dichroism suggested that the *Rhopilema esculenta* collagen presented a compact triple helix structure that maintained primarily by hydrogen bonds. The images of *Rhopilema esculenta* collagen under SEM observation showed mainly irregular networks consist mainly of multilayered fibers.

Key words: *Rhopilema esculenta*; collagen; pepsin; amino acid composition; structural characteristics

收稿日期: 2020-05-22

基金项目: 2017 年江苏省农业科技自主创新资金 (CX (17) 2014)。

作者简介: 冯玲玲 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: fenglinglingwjs@163.com。

* 通信作者: 李春阳 (1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 营养与健康, E-mail: lichunyang968@126.com。

胶原蛋白是普遍存在于动物结缔组织中的一类纤维状蛋白,也是构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要成分,占动物总蛋白的 25%~30%^[1]。它具有由三条肽链相互缠绕而成的三螺旋稳定结构,在维持组织结构和功能的完整性方面起着至关重要的作用。目前,研究人员已根据胶原蛋白的序列同源性和分子结构将其分为 29 种类型(I-XXIX 型)^[2-3],其中, I 型胶原蛋白在研究中最为常见,它含有 3 条 α -链,组成方式一般为 $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ 或 $[\alpha_1(I)]_3$ ^[4]。因其具有优良的生物相容性、生物降解性以及低抗原性,而在食品、材料以及化妆品等领域有着较为广泛的应用。目前,胶原蛋白的制备来源主要为陆生哺乳动物的皮肤和骨骼,但由于多种人畜共患病的爆发以及宗教信仰等问题,使得该种胶原蛋白在实际生产应用中受到了极大的限制^[5]。因此,许多研究人员开始将注意力集中在水生胶原蛋白上,例如鲷鱼^[6]、海参^[7]、金枪鱼^[8]等,都已被认为是天然胶原蛋白的提取来源。

海蜇是海蜇属的统称,目前普遍分布于热带、亚热带以及温带沿海地区。随着人工繁育的成功,海蜇数量不断增加,但由于其收获期短、易腐败,大多因并未得到及时处理而失去商品价值,造成了严重的经济和社会影响。海蜇中蛋白质含量约占干物质的 60%^[9],其中胶原蛋白为主要蛋白,占总蛋白的 50% 左右^[10]。因此,海蜇可作为一种天然安全的胶原蛋白提取来源,极具开发价值。目前,国内外对海蜇胶原蛋白的提取研究较多^[11-13],但对其结构特性的相关研究比较少。基于此,本研究采用胃蛋白酶从海蜇中提取胶原蛋白,并通过紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、圆二色谱等分析手段对海蜇胶原蛋白结构特性进行系统研究,旨在提高海蜇的产品附加值,减少资源浪费,并为利用海蜇胶原蛋白进一步制备出生物材料和活性肽提供有利的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

沙海蜇加工下脚料(*Rhopilema esculentum* Kishinouye) 江苏海苑食品有限公司;胃蛋白酶(≥ 1200 U/g) 国药集团化学试剂有限公司;蛋白 Marker(11~245 kDa) SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、SDS-PAGE 上样缓冲液、羟脯氨酸含量检测试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;再生纤维素透析袋(50000 kDa) 上海源叶生物科技有限公司;硫酸、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醇、苯酚、三氯乙酸、正丁醇、尿素、石油醚、冰乙酸、考马斯亮蓝 G-250 以上试剂均为分析纯。

FDU-1200 真空冷冻干燥机 东京理化器械株式会社; Nicolet 傅里叶变换红外光谱仪 美国 Thermo 公司; J-1500 圆二色光谱仪 日本 JASCO 公司; AL104

电子分析天平 梅特勒托利多仪器有限公司; PHS-2C pH 计 上海智光仪器仪表公司; UV-6100 紫外分光光度计 上海美普达仪器有限公司; JY-SCZ2+垂直电泳槽、JY300HE 通用电泳仪电源 北京君意东方电泳设备有限公司; EUROSTAR 40 Digital 高速搅拌机 德国 IKA 公司; SU3500 扫描电子显微镜 日立高新技术公司; S-433D 全自动氨基酸分析仪 德国 Sykam 公司; Avanti J-26S XP 落地式高速冷冻离心机 美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基本成分分析 水分含量测定: GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》^[14]; 灰分含量测定: GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》^[15]; 总糖含量测定: 苯酚-硫酸法^[16]; 蛋白质含量测定 GB5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》^[17]; 总脂肪含量测定: GB5009.6-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》^[18]; 胶原蛋白含量测定: 羟脯氨酸含量检测试剂盒。

1.2.2 海蜇胶原蛋白提取 参考张雯等^[19]的方法对海蜇胶原蛋白进行提取,稍作修改。取适量海蜇洗净后,切成 1 cm×1 cm 的小块,以料液比 1:10 (w:v) 添加正丁醇溶液,搅拌浸泡 6 h 进行脱脂处理,处理结束后用去离子水清洗皮块至无异味,收集沉淀。所得沉淀以 1:15 (w:v) 比例置于 pH 2.0~2.5 的 HCl 溶液中浸泡 14 h,待膨胀均匀后,取出加适量去离子水打浆。皮浆中加入 4.0 wt% 胃蛋白酶,并用 1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 2.3 后酶解 48 h,酶解结束后于 10000 r/min 离心 20 min,取上清液缓慢加入 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7 灭酶后,持续搅拌并加入粉末状 NaCl 至溶液终浓度为 1 mol/L,待 NaCl 完全溶解后静置过夜,随后将盐析液于 10000 r/min 离心 60 min,收集沉淀复溶于 0.1 mol/L 冰乙酸溶液中,先将其置于 0.05 mol/L 冰乙酸溶液中透析 24 h,再置于去离子水中透析 48 h,冻干即得海蜇胶原蛋白样品。以上操作均在 4 ℃ 条件下进行。

1.2.3 氨基酸组成分析 参照 GB5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》^[20],取 40 mg 海蜇胶原蛋白样品溶解于 15 mL 6 mol/L HCl 溶液中,加入苯酚 3 滴,抽真空封口后于 110 ℃ 条件下水解 22 h,采用氨基酸自动分析仪对其进行分析。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 参考 Laemmli 等^[21]的方法,稍作修改。取适量海蜇胶原蛋白样品溶解于 0.02 mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液(含 1% SDS、3.5 mol/L 尿素)中,配制浓度为 3 mg/mL 的胶原蛋白溶液,按 4:1 比例与 5×样品缓冲液(非还原性电泳的样品缓冲液中不含巯基乙醇)混合均匀,沸水浴 5 min

后取 10 μL 进行测定。聚丙烯酰胺凝胶由 5% 的浓缩胶和 8% 的分离胶组成, 先将电压调至 80 V, 待样品被压缩为一条线后, 调整电压至 120 V, 待样品至凝胶底部 0.5 cm 左右时停止。电泳结束后将胶条置于三氯乙酸溶液中固定 15 min, 考马斯亮蓝 G-250 中染色 1 h, 随后反复脱色至胶条上的条带清晰可见即可。

1.2.5 紫外全波长扫描(UV)分析 取适量海蜇胶原蛋白样品溶解于 0.5 mol/L 冰乙酸溶液中, 配制浓度为 1 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液进行扫描分析。扫描波数为 200~400 nm, 速度为 2 nm/s, 同时以 0.5 mol/L 冰乙酸溶液为空白对照。

1.2.6 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析 参考 Zhu 等^[22] 的方法, 稍作修改。取适量海蜇胶原蛋白样品与干燥的 KBr 混合均匀并压成薄膜, 置于样品室内进行扫描分析。扫描波数为 500~4000 cm^{-1} , 次数为 64 次, 速度为 0.2 cm/s , 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.2.7 圆二色谱(CD)分析 参考 Wang 等^[23] 的方法, 稍作修改。取适量海蜇胶原蛋白样品溶解于 50 mmol/L 冰乙酸溶液中, 配制浓度为 0.3 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 取少量上述溶液置于光程为 1 mm 的样品池中进行扫描分析。扫描波数为 190~260 nm, 温度为 4 $^{\circ}\text{C}$, 同时以 50 mmol/L 冰乙酸溶液为空白对照。

1.2.8 扫描电子显微镜(SEM)分析 取适量胶原蛋白样品置于载物台上, 经离子溅喷金处理后, 用扫描电镜在 10.0 kV 的加速电压下放大 50、100、250、500、1000 倍观察海蜇胶原蛋白微观结构。

1.3 数据处理

采用 Excel、Origin 软件对数据进行处理和作图, 每次实验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 基本成分分析

由表 1 可知, 海蜇中大部分都是水分, 仅含有不到 10% 的干物质。在海蜇干物质中, 蛋白质含量最大, 可达 73.03%, 羟脯氨酸是胶原蛋白特有的一种氨基酸^[24], 常被用于计算胶原蛋白的含量。因而根据海蜇中羟脯氨酸的含量, 计算得出胶原蛋白的含量为 1.96%, 占蛋白质总量 39.12%。可见海蜇中胶原蛋白含量较为丰富, 是一种优质的水生胶原蛋白来源。

表 1 海蜇基本成分分析
Table 1 Analysis of basic ingredients of *Rhopilema esculenta*

成分	水分	灰分	粗蛋白	粗脂肪	糖	胶原蛋白
含量(%)	93.14	0.78	5.01	0.14	0.93	1.96

2.2 氨基酸组成分析

由表 2 可知, 海蜇胶原蛋白中含有 7 种必需氨基酸(Val、Ile、Leu、Phe、Met、Thr、Lys), 占总氨基酸总量的 20.19%。主要氨基酸为 Gly, 占氨基酸总量的 25.99%。Gly 对于胶原蛋白超螺旋结构的形成至关重要, 它具有由单个氢原子构成的极小侧链, 可存在于超螺旋的中心且不会发生链变形, 从而使三个 α 螺旋紧密堆积在一起, 形成具有疏水性的超螺旋结构^[25-26]。据相关文献报道, 由于亚氨酸(Pro+Hyp)的吡咯环会限制肽链二级结构变化^[27], 同时 Hyp 还通过羟基形成链间氢键^[28], 维持胶原的三螺旋稳定结构, 因此胶原蛋白的亚氨酸含量对其稳定性有很大的影响。海蜇胶原蛋白中亚氨酸含量为 15.94%, 略低于花鳗鲡鱼(18.9%)^[29] 和鳗鱼(20%)^[30], 与鲤鱼(15.4%)^[31] 胶原蛋白含量相似。此外, 海蜇胶原蛋白中还含有丰富的 Glu、Asp、Ala 和 Arg。其中, Glu 和 Asp 是酸性氨基酸, 二者对胶原蛋白的等电点影响较大^[32]。His 和 Met 含量较低, 未检测到半胱氨酸和色氨酸。

2.3 SDS-PAGE 分析

海蜇胶原蛋白的 SDS-PAGE 图谱如图 1 所示。海蜇胶原蛋白中主要含有一条 135 kDa 左右的 α -链, 以及由 α -链的分子内和分子间交联所形成的一些二聚体 β -链和三聚体 γ -链。通过比较海蜇胶原蛋白在还原和非还原条件下的图谱, 发现二者条带完全一致, 说明海蜇胶原蛋白中不存在二硫键, 即不存在含硫氨基酸, 这是 I 型胶原蛋白的一个特点^[33]。另外, 在 48~100 kDa 之间还观察到少量条带, 这些小分子片段可能是由于胃蛋白酶对胶原蛋白的肽酶区域进行部分切割而得到的降解片段^[34]。由图可初步判断所提胶原蛋白为 I 型胶原蛋白, 亚基结构为 $[\alpha_1(\text{I})]_3$, 符合大多数水生胶原蛋白的结构特征^[35]。

2.4 紫外全波长扫描分析

海蜇胶原蛋白在 200~400 nm 处的 UV 谱图如图 2 所示。其最大吸收峰位于 233 nm 处, 这主要与

表 2 海蜇胶原蛋白的氨基酸组成分析
Table 2 Amino acid composition of *Rhopilema esculenta* collagen

氨基酸	天冬氨酸(Asp)	谷氨酸(Glu)	丝氨酸(Ser)	组氨酸(His)	甘氨酸(Gly)	苏氨酸(Thr)	精氨酸(Arg)
氨基酸含量(%)	8.21	10.68	4.58	0.51	25.99	3.68	6.36
氨基酸	丙氨酸(Ala)	酪氨酸(Tyr)	缬氨酸(Val)	蛋氨酸(Met)	苯丙氨酸(Phe)	异亮氨酸(Ile)	亮氨酸(Leu)
氨基酸含量(%)	6.01	1.53	3.84	0.43	1.43	2.84	3.74
氨基酸	赖氨酸(Lys)	羟脯氨酸(Hyp)	脯氨酸(Pro)	亚氨基酸	总氨基酸		
氨基酸含量(%)	4.23	8.68	7.26	15.94	100		

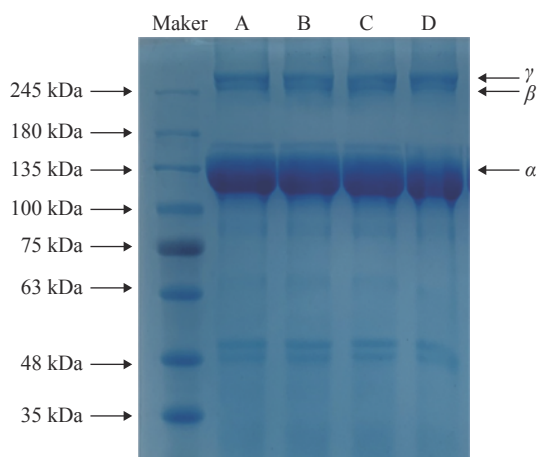


图1 海蜇胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis pattern of *Rhopilema esculenta* collagen

注: A、B 为还原性, C、D 为非还原性。

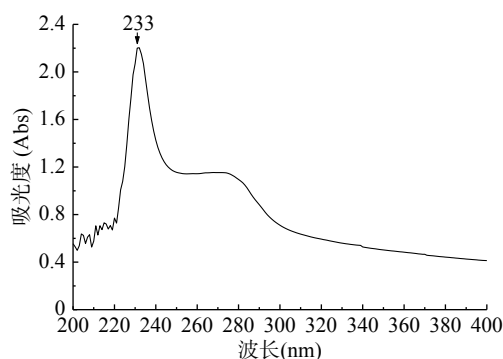


图2 海蜇胶原蛋白的紫外吸收光谱图

Fig.2 UV spectrum of *Rhopilema esculenta* collagen

肽链中含有的 $-C=O$ 、 $-COOH$ 和 $CO-NH_2$ 等生色基团在 230 nm 附近具有明显的吸收峰有关^[30]。此外,在 275 nm 处还可观察到一较弱的吸收峰,结合氨基酸分析,这可能是由于分子内部仍含有少量的酪氨酸,存在共轭双键引起的^[36]。以上结果符合 I 型胶原蛋白的紫外吸收特征,与 Zhang^[37]、蔡路昀^[38] 等报道的水生胶原蛋白的特性基本相似。

2.5 傅里叶变换红外光谱分析

海蜇胶原蛋白在 500~4000 cm^{-1} 处的 FTIR 谱图如图 3 所示。在酰胺 I、II、III 以及 A、B 带均可观察到明显的特征峰,说明海蜇胶原蛋白具有典型的胶原蛋白红外光谱特征吸收峰。其中,酰胺 A 带位于 3272.06 cm^{-1} 处,该峰与胶原蛋白中 N-H 的伸缩振动以及羰基形成的氢键相关^[30]。通常, N-H 伸缩振动范围为 3400~3440 cm^{-1} ^[30],但当其与肽链中含有的羰基形成的氢键结合时,其波数会蓝移至 3300 cm^{-1} 左右^[39]。由此可说明海蜇胶原蛋白中存在氢键。此外,在 2920.18 cm^{-1} 处还观察到由 CH_2 的不对称伸缩振动引起的酰胺 B 带^[40]。

酰胺 I、II 和 III 带的伸缩振动与胶原蛋白的氨基酸序列及三螺旋结构直接相关^[41-42]。海蜇胶原蛋

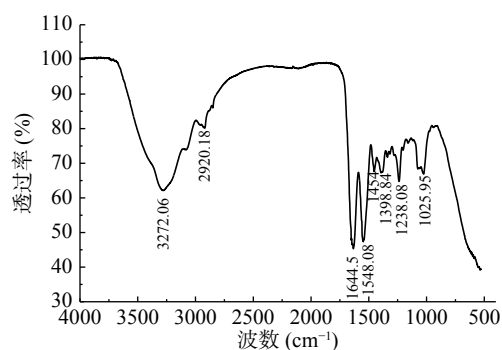


图3 海蜇胶原蛋白的红外吸收光谱图

Fig.3 FTIR spectrogram of *Rhopilema* collagen

白的酰胺 I 带位于 1644.5 cm^{-1} 处,且吸收最强,该峰与肽链的 $C=O$ 伸缩振动有关^[43-44],说明海蜇胶原蛋白处于交联状态。由 N-H 弯曲振动与 C-N 伸缩振动相耦合引起的酰胺 II 带通常出现在 1550~1600 cm^{-1} 之间^[45-46],当肽链中有氢键存在时波数蓝移^[47]。海蜇胶原蛋白的酰胺 II 带位于 1548.08 cm^{-1} 处,进一步证明了其肽链中存在氢键。特征频率在 1200~1320 cm^{-1} 之间,称为酰胺 III 带^[48],主要与酰胺键的 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动,以及 Gly 主链和 Pro 侧链的 CH_2 的摇摆振动有关^[22]。有研究称,当酰胺 III 带的峰值与 1400~1454 cm^{-1} 范围内的峰值比例为 1.0 时,胶原蛋白的三螺旋结构是完整的^[49]。由图知海蜇胶原蛋白酰胺 III 带的波数为 1238.08 cm^{-1} ,其与 1454 cm^{-1} 谱带之间的峰值比约为 1.0,说明所提胶原蛋白具有较完整的三螺旋结构。

2.6 圆二色谱分析

圆二色谱是一种利用生物大分子对左旋和右旋圆偏振光的吸收差异来进行立体结构分析的方法^[50],根据电子跃迁能级能量的大小,蛋白质的 CD 谱可分为远紫外(190~250 nm)、近紫外(250~340 nm)和紫外-可见(400~700 nm)三个区域,远紫外区是肽键所在的吸收范围,对胶原蛋白在此范围内的谱带位置和吸收强弱进行分析,可较直观的反映肽链的立体结构信息^[51]。因此,利用远紫外圆二色谱对海蜇胶原蛋白的二级结构进行深入分析,如图 4 示,海蜇胶原蛋白

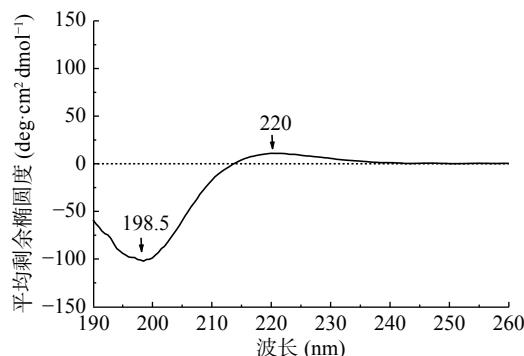


图4 海蜇胶原蛋白的远紫外圆二色谱图

Fig.4 Far-UV CD spectra of *Rhopilema* collagen

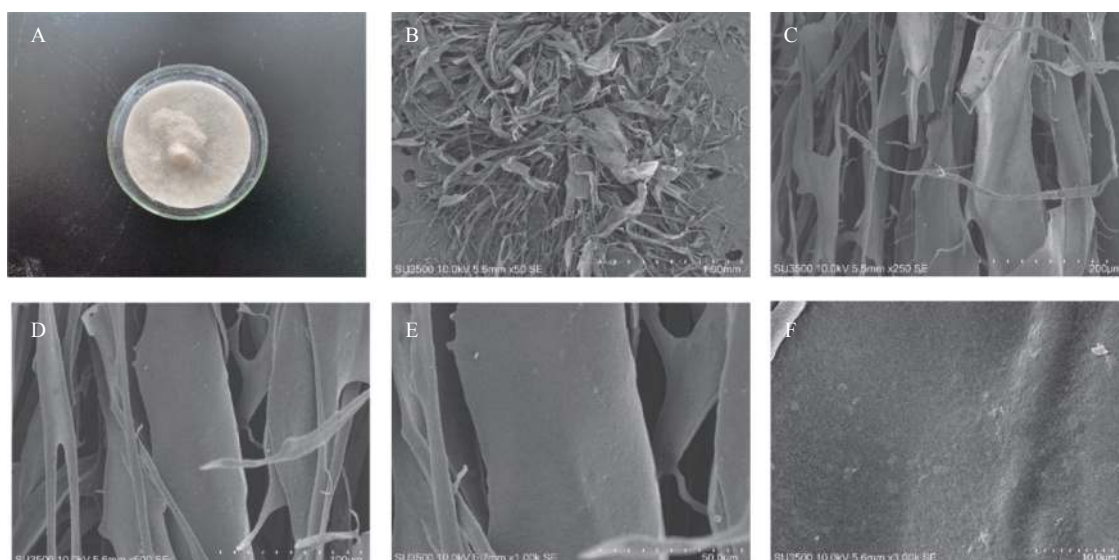


图 5 海蜇胶原蛋白的外观(A)和扫描电镜图(B~F)

Fig.5 *Rhopilema collagen* (A) as viewed in naked eye, and (B~F) SEM micrograph

注: B 50×, C 100×, D 250×, E 500×, F 1000×。

在 198 nm 附近出现明显的负吸收峰,在 221 nm 处有一较弱的正吸收峰,在 213 nm 处有一交叉点,这是左旋聚脯氨酸构型的典型 CD 特征,主要表现为 β -折叠和无规则卷曲的叠加吸收。此外,圆二色谱的正负峰强度比称为 RPN, RPN 值是胶原三螺旋结构的特征性指标^[52],非变性胶原的 RPN 值一般在 0.12 左右^[53],观察到海蜇胶原蛋白的 RPN 值为 0.11。以上光谱数据进一步说明了海蜇胶原蛋白保持了较完整的三螺旋结构,与红外吸收光谱分析结论一致。

2.7 微观结构分析

胶原蛋白的微观结构对其生物学功能有着关键性的影响。由图 5 可知,冻干的海蜇胶原蛋白在肉眼下呈白色海绵状固体,表面有均匀孔隙,触之弹性较好。由 SEM 图像,观察到海蜇胶原蛋白具有多层聚集、以纤维为主的无规则网状结构。在更高的放大倍数下,发现该结构由相互缠绕的细丝和薄片构成,且表面光滑细腻、疏松多孔,与 Arumugam 等^[54]观察到的龙利鱼胶原蛋白的微观结构相似,说明海蜇胶原蛋白保留了较完整的纤维结构,排布比较疏松,可作为伤口敷料、止血剂或细胞增殖的基质等广泛应用于生物医学工程。

3 结论

采用盐酸-胃蛋白酶法对海蜇胶原蛋白进行制备并分析了其结构特性。氨基酸组成分析表明海蜇胶原蛋白中甘氨酸含量最高,为 25.99%,亚氨基酸含量为 15.94%,未检测到半胱氨酸和色氨酸;紫外光谱和 SDS-PAGE 表明,所提取的海蜇胶原蛋白纯度较高,亚基结构为 $[\alpha_1(I)]_3$,符合 I 型胶原蛋白结构特征;傅里叶变换红外光谱和圆二色谱说明海蜇胶原蛋白具有较为完整的三螺旋结构;扫描电镜结果显示其保留了较完整的纤维结构,且疏松多孔,可作为良好

的药物载体。海蜇胶原蛋白具备替代陆生哺乳动物胶原蛋白的潜力,在食品、化妆品、生物医药及组织工程等领域有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Maroušek J, Maroušková A, Myšková K, et al. Techno-economic assessment of collagen casings waste management[J]. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2015, 12(10): 3385-3390.
- [2] Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 43: 708-716.
- [3] Ricard-blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane[J]. *Pathologie Biologie*, 2005, 53(7): 430-442.
- [4] Li J, Wang C M, Qiao Y Y, et al. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 74: 156-163.
- [5] Jonathan P W, Alex J P, Valerie V, et al. *In vivo* comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices[J]. *J Biomed Mater Res B*, 2018, 106(4): 1524-1533.
- [6] 姚行行, 郭妍, 庄永亮. 云南鲟鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 35-40.
- [7] Li P H, Lu W C, Chan Y J, et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics[J]. *Aquaculture*, 2020: 515.
- [8] Ahmed R J, Hap M, Chun B S. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*)[J]. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 2019, 315: 668–676.

[9] 张玉莹, 柴彦萍, 秦磊, 等. 海蜇不同组织营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 151–156.

[10] Khong N M H, Yusoff F M, Jamilah B, et al. Nutritional composition and total collagen content of three commercially important edible jellyfish[J]. Food Chemistry, 2015, 196: 953–960.

[11] Zhang J J, Duan R, Huang L, et al. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye)[J]. Food Chemistry, 2014, 150: 22–26.

[12] Khong N M H, Yusoff F M, Jamilah B, et al. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes[J]. Food Chemistry, 2017: S0308814617320526.

[13] 庄永亮, 李八方, 赵雪, 等. 高压辅助提取海蜇胶原蛋白的工艺[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 79–81.

[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 5009.3-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–2.

[15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中灰分的测定: GB 5009.4-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–4.

[16] 孙鑫, 刘希光, 李海, 等. 新鲜海蜇不同部位总糖含量的测定[J]. 海洋科学, 2014(8): 34–38.

[17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 5009.5-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–3.

[18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 5009.6-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–2.

[19] 张雯. 基于胶原蛋白/细菌纤维素多孔微球的制备及药物吸附释放行为研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019: 24–25.

[20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定: GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–2.

[21] Laemmli B U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.

[22] Zhu S C, Yuan Q J, Yang M T, et al. A quantitative comparable study on multi-hierarchy conformation of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Materials science & engineering, 2019, 96(MAR.): 446–457.

[23] Wang J, Pei X L, Liu H Y, et al. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017: 106.

[24] 高玲玲, 侯成立, 高远, 等. 胶原蛋白热稳定性研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 200–212.

[25] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised

fishes[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 49–54.

[26] Regenstien J M, Zhou P. Collagen and gelatin from marine by-product[M]// Maximising the Value of Marine By-Products. 2007.

[27] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 500–507.

[28] 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.

[29] 卢珍华, 郭彩华, 叶鹏, 等. 养殖花鳗鲡鱼皮胶原蛋白的特性分析[J]. 淡水渔业, 2019, 49(6): 100–106.

[30] Veeruraj A, Arumugam M, Balasubramanian T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*)[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(10): 1592–1602.

[31] Duan R, Zhang J J, Du X Q, et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 702–706.

[32] Sun L L, Li B F, Song W K, et al. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible, biomedical material[J]. Process Biochemistry, 2017, 63(dec.): 229–235.

[33] Lassoued I, Jridi M, Nasri R, et al. Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41: 309–318.

[34] Bairati A, Gioria M. Collagen fibrils of an invertebrate (*Sepia officinalis*) are heterotypic: immunocytochemical demonstration[J]. Journal of Structural Biology, 2004, 147(2): 159–165.

[35] Foegeding E A, Lanier T C, Hultin H O. Characteristics of edible muscle tissues. In: Owen Fennema R (Ed.)[J]. Food Chemistry, 1996, 3(15): 879–942.

[36] 沈同, 王镜岩. 生物化学(第二版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007: 320–323.

[37] Zhang M, Liu W T, Li G Y. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 826–831.

[38] 蔡路昀, 史航, 曹爱玲, 等. 鲮鱼骨胶原蛋白的结构及流变学特性[J]. 中国食品学报. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.TS.20200218.1719.004.html>.

[39] Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen[J]. Food Chemistry, 2004, 84(1): 65–69.

[40] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325–332.

[41] Heu M S, Lee J H, Kim H J, et al. Characterization of acid-

- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin[J]. *Food Science & Biotechnology*, 2010, 19(1): 27–33.
- [42] Chiaramaria S, Lisa V, Elisa M, et al. FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 229: 118006.
- [43] Jeong h S, Venkatesan J, Kim S K. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*)[J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2013, 18(6): 1185–1191.
- [44] Payne K J, Veis A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies[J]. *Biopolymers*, 1988, 27(11): 1749–1760.
- [45] Zanaboni G, Rossi A, Angèle M T O, et al. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: influence of pH and chaotropic nature of three anions[J]. *Matrix Biology*, 2000, 19(6): 511–520.
- [46] Barth A, Zscherp C. What vibrations tell about proteins[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002, 35(4): 369–430.
- [47] Jackson M, Choo L P, Watson P H, et al. Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1995, 1270(1): 1.
- [48] Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L, et al. Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)10]3[J]. *Protein Science*, 2002, 11(2): 262–270.
- [49] Plepis A M D G, Goissis G, Dilip K. Das-Gupta. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen[J]. *Polymer Engineering & Science*, 1996: 36.
- [50] Chapter 6-Biopharmaceutical applications of protein characterization by circular dichroism spectroscopy biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals (Second Edition)[M]. 2020: 123-152.
- [51] Kikuchi H, Wako H, Yura K, et al. Significance of a two-domain structure in subunits of phycobiliproteins revealed by the normal mode analysis[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 79(3): 1587–1600.
- [52] Fathima N N, Bose M C, Rao J R, et al. Stabilization of type I collagen against collagenases (type I) and thermal degradation using iron complex[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(11): 1774–1780.
- [53] Gaidau C, Petica A, Marin M. Progresses in treatment of collagen and keratin-based materials with silver nanoparticles[J]. *Central European Journal of Chemistry*, 2013, 11(6): 901–911.
- [54] Arumugam G K, Sharma D, Balakrishnan R M, et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin[J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2018, 9: 19–26.