

水产品副产物胶原蛋白制备方法及应用

黄可承¹, 宫 萱¹, 唐嘉诚¹, 陈彦婕¹, 包建强^{1,2,3*}

[1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306; 3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306]

摘要: 胶原蛋白作为动物体内重要的大分子蛋白质, 是参与动物组织和器官机械保护的重要细胞外蛋白。水产品副产物是胶原蛋白行业关注的重点, 传统的胶原蛋白提取方式在得率、环保等方面的缺点逐渐显现。该文综述了胶原蛋白形成机理、类型、胶原蛋白来源以及胶原蛋白提取方法; 比较了原料、传统提取工艺(酸、碱、酶)对胶原蛋白得率与功能的影响; 对水产品胶原蛋白在食品品质、食品保鲜、医药领域的应用现状以及新型胶原蛋白提取方法(亚临界水、超临界流体萃取)的工业可行性进行了分析。对胶原蛋白得率低、原料结构影响大的副产物提出了“物理/生物-酸-复合酶”的水产品副产物胶原蛋白工艺优化方案。

关键词: 胶原蛋白; 水产品; 副产物; 高值化利用; 提取工艺

中图分类号: S937.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2022)09-1757-10

Preparation and application of collagen from aquatic by-products

HUANG Kecheng¹, GONG Xuan¹, TANG Jiacheng¹, CHEN Yanjie¹, BAO Jianqiang^{1,2,3*}

[1. College of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 3. Aquatic Products Processing and Storage Shanghai Engineering and Technology Research Center, Shanghai 201306, China]

Abstract: An essential macromolecular protein extracellularly expressed in animals, collagen is involved in the mechanical protection of tissues and organs. Aquatic by-products are the focus of collagen industry. The disadvantages of traditional collagen extraction methods in terms of yield and environmental protection have gradually emerged. Herein, the formation mechanism, types, sources and extraction methods of collagen were summarized, followed by discussions on the influence of raw materials, traditional extraction processes (acids, bases, enzymes) on the yield and function of collagen. The current application status of aquatic collagen in food quality, food preservation, pharmaceuticals as well as the industrial feasibility of new collagen extraction methods (subcritical water, supercritical fluid extraction) were then analyzed. In the end, optimization *via* physical/biological-acid-compound enzyme scheme was proposed for by-products with low collagen yield and great influence on raw material structure.

Key words: collagen; aquatic products; by-products; high value utilization; extraction technology

水产品凭借着丰富的口感以及较高的营养价值受到国内外消费者的青睐。近年来, 中国水产品年产量提升至近 200 万 t^[1], 并呈现稳步上升趋势。在中国消费者对水产品需求量不断攀升、水产品养殖及捕捞量不断增加的大背景下, 大量副产物出现了利用率低、污染环境等问题。目前, 主要的解决方式是进一步加工副产物, 提取其中的营养成分, 减

少损失的同时提升产品综合利用率。胶原蛋白作为副产物中提取量最大的营养物质, 已成为水产品副产物可加工利用的重要判断指标。

近年来, 胶原蛋白作为一种天然材料, 被广泛应用于医学和制药工业^[2]。其中, 运动食品、皮肤修复、肠道菌群调节等是当前研究热点^[3]。

胶原蛋白占人体蛋白总质量的 30%, 是个体必

不可少的蛋白质之一^[4]。近年来,陆生动物出现的疯牛病、禽流感等疾病导致传统陆生动物胶原蛋白受到质疑和限制,鱼类副产物则成为胶原蛋白等有价值的生物复合物的优良和可持续原料^[5]。据研究表明,水产动物的表皮、内脏、壳、鳞片中均具有含量丰富、类型多样的胶原蛋白^[6],以水产品副产物为原料提取胶原蛋白在规避陆生动物原料缺点的同时减少了水产品加工过程中所带来的营养成分损失,提升产品利用率。

胶原蛋白得率是判断蛋白提取工艺可行性的重要指标。综合国内外研究现状发现,水产源胶原蛋白的主要提取方法为酸提取或酶提取,主要研究方向在蛋白的功能性质上,对蛋白得率优化的研究较为缺乏。本文在综述国内外水产品副产物中胶原蛋白的提取方法的基础上,概括了水产品副产物胶原蛋白在各领域的应用现状,分析了不同提取方法的优缺点,对比不同提取方法对胶原蛋白功能性

质的影响,针对得率低和风味差的副产物原料提出了“物理/生物-酸-复合酶”的方案,为水产品副产物胶原蛋白提取工艺的优化提供理论支撑。

1 胶原蛋白形成机理与类型

1.1 形成机理

胶原蛋白是胶原的降解产物,也是动物体内参与组织和器官机械保护的重要细胞外蛋白。其形成过程示意图如图 1 所示,其中 X 与 Y 位点多为脯氨酸和羟脯氨酸^[2]。

氨基酸残基形成的肽链通过链内部以及链间分子力共同作用形成的超螺旋结构经过进一步的多级聚合,最终形成胶原蛋白分子。脯氨酸与甘氨酸形成的氢键以及羟脯氨酸合成的氢键是维持胶原蛋白分子结构的重要分子力,而提高氢键数量是维持胶原蛋白稳定性的关键环节。

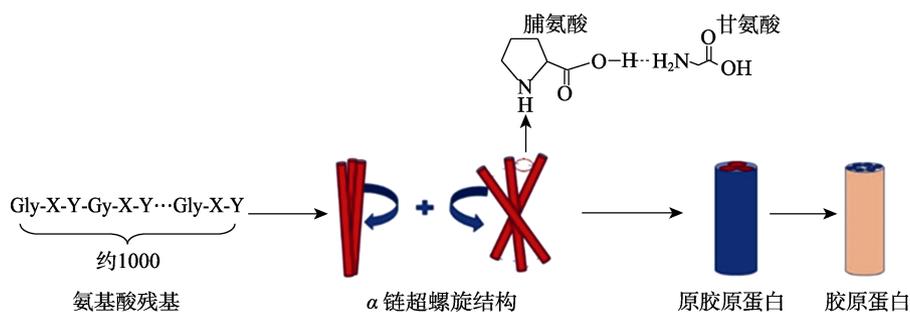


图 1 胶原蛋白分子合成流程示意图

Fig. 1 Flow chart of collagen molecule synthesis

1.2 类型

在现有研究中,胶原蛋白含有 28 种不同类型,组成原胶原蛋白分子的每种 α 肽链可以分成若干亚型,每一条链至少有 45 个不同的基因编码,通过排列组合构成各种胶原蛋白分子^[6]。当前,水产品副产物中含量较多的是 I 型、II 型与 III 型胶原蛋白, I 型胶原蛋白是由两条相同的 α_1 链与一条 α_2 链组成的三螺旋结构,分布在动物骨骼、肌腱和皮肤中^[7], I 型胶原蛋白由于原料丰富、抗原性低和细胞黏附能力强而被广泛地提取和应用。II 型胶原蛋白由 3 条相同的 α_1 (II) 链组成; III 型胶原蛋白由 3 条 α_1 (III) 链构成; II 型与 III 型胶原蛋白多存在于动物软骨与内脏中^[8]。

蛋白质结构决定其功能性,而胶原蛋白在合成过程中 α 链、氨基酸组成、相对分子质量(简称分子量)、多肽链结合形成的超二级结构均是影响胶原蛋白功能性质的主要因素。在目前已知的 28 种胶原蛋白中,每种蛋白的结构域均含有固定特征,用以

产生不同的功能,有研究表明,IV 型胶原蛋白三螺旋结构域中存在中断,III 型胶原蛋白在与金属蛋白酶结合位点处具有高度柔韧性,两者结构域存在力学性能上的差异,导致它们能在不同的场景下发挥不同的功效^[9],而氨基酸组成、蛋白分子量以及多肽链的超二级结构的异同或将成为判断蛋白功能性质和应用范围的主要参考依据。

2 水产品胶原蛋白来源

随着水产品资源的大量开发,鱼、虾、蟹等水产动物加工副产物中含有的多不饱和脂肪酸、胶原蛋白、虾青素均能作为添加成分用于各类加工行业。与陆生动物原料相比,鱼皮、鱼骨、鱼鳞等副产物产量大、安全性高;此外,水产品胶原蛋白在氨基酸组成和生物相容性方面与传统的陆源性胶原蛋白相似,能够作为牛、猪等陆源蛋白原料的替代品^[10]。表 1 概括了水产品胶原蛋白的来源和类型。

表1 水产品胶原蛋白来源及类型

Table 1 Sources and types of collagen in aquatic products

来源	胶原蛋白类型	组织部位	参考文献
鲶鱼	I型	表皮	[11]
鳗鱼	I型	表皮	[12]
大西洋鲑鱼	I型	鱼鳔	[13]
中华鳖	I型	肌肉、裙边	[14]
大鲵	I、II、III型	鱼骨	[15]
水母	II型	口器	[16]
鲟鱼	II型	软骨	[17]
巨型鱿鱼	I、IV型	表皮	[18]
软珊瑚	I、II型	组织	[19]

水生动物表皮被认为是胶原蛋白含量最高的部分,对鱼类而言,鱼皮通常含有高纯度(约70%)的I型胶原蛋白^[11-12]。鱼鳞作为鱼类加工中产量最大的废料,从中获得的胶原蛋白也具有典型的I型胶原蛋白的特征^[20]。鱼骨中的II型胶原蛋白含量丰富,但原料存在质构硬、灰分含量多等问题^[15],需从前处理以及提取方法上降低提取难度,才能有效提升鱼骨原料胶原蛋白的提取效率。

不同产品的同种副产物胶原蛋白性质存在差异。在硬骨鱼和软骨鱼鱼皮胶原蛋白的对比研究中发现,不同种类鱼皮提取得到的胶原蛋白均为I型成纤维蛋白,但电泳条带结果显示软骨鱼鱼皮胶原蛋白中 α_2 链含量略低于硬骨鱼皮,并且两者胶原蛋白溶解度的差异与所含亚基链的含量与强度密切相关^[21]。同属头足类的章鱼与巨型鱿鱼触手中的胶原蛋白均具有II型胶原蛋白特征,但巨型鱿鱼胶原蛋白热变性温度达到117℃,远高于章鱼胶原蛋白^[22],这是因为巨型鱿鱼中还存在与II型胶原蛋白不同的另一种类型的胶原蛋白,才会导致蛋白变性温度发生改变。胶原蛋白凝胶性能的研究指出, α_1 与 α_2 链比值与胶原蛋白储能模量呈正相关^[23],说明硬骨鱼与软骨鱼、章鱼与巨型鱿鱼胶原蛋白性质的差别与蛋白亚基密切相关。而蓝鳍金枪鱼皮胶原蛋白研究显示,虽然其蛋白一级结构与鲑鱼几乎相同,但在蛋白的抗体表现上却有明显差异^[24]。

水产品原料不同决定了胶原蛋白组成成分的差异,包括氨基酸含量、亚基、结构域等,在一定程度上体现胶原蛋白性质的差异(热稳定性、蛋白凝胶强度、蛋白结构),但是这并不代表胶原蛋白的诸多特性均由蛋白来源与组成成分决定,即使是一级结构相同的同类型胶原蛋白,它们在对同一抗体的反应性上依旧存在差异。因此,对于不同来源的胶原蛋白的相同点与特异性还需进行深入的探究。

3 胶原蛋白提取方法

胶原蛋白的提取效率取决于两大因素:原料的预处理和提取方法的选择。脂类、色素、非胶原蛋白、灰分杂质存在于各种水产品副产物中影响提取后胶原蛋白的纯度^[10]。通常在原料经过切割分组后,进行物理或温和化学预处理,以提高提取效率并去除非胶物质。

针对鱼皮等软组织原料,常用酸、碱进行预处理,而骨和鳞等含有大量矿物质的原料,在提取前需用乙二胺四乙酸(EDTA)和盐酸来完成脱盐过程^[10]。预处理试剂的选取往往会影响终产品的种类。在对鲤鱼鱼皮胶原蛋白的研究中发现,氯化物预处理得到的羟脯氨酸含量高于酸法和碱法,胶原蛋白肽含量增长明显。对于明胶而言,氯化物具有更强的肽链聚合能力,对于小分子肽与明胶的提取具有更好的效果,但对大分子蛋白的提取不友好^[25]。

为提高胶原产物提取效率,除了通过酸、碱、盐等预处理方式,研究人员也着手研究物理、生物预处理对胶原产物提取效率的影响。经过发酵处理后的罗非鱼皮,胶原蛋白产量提升了0.5%,蛋白分子的热变性温度也有一定程度的提升^[26]。在探究预处理对胶原蛋白损失程度的研究中,生物酶在保证较高的脂肪清除率外,极大程度地降低了原料中胶原蛋白的流失^[27]。WAN等^[28]研究表明,超声波与热的参与能使肉类胶原纤维变柔软。在对大鲵皮胶原蛋白的提取中^[29],超声破碎能有效破坏大鲵表皮细胞,使溶液能够与内部组织充分接触,达到提高提取效率的目的,超声辅助处理增大了鲵皮表面结构的孔隙度,有助于胶原蛋白溶出;超声处理使鲵皮胶原蛋白的二级结构组成发生了改变,空间网状结构、亚基组成和三螺旋结构则无明显变化。另外,科学家在超声波辅助提取水母胶原蛋白的研究中也得到了相似的结论,经过超声处理后样品的胶原蛋白得率是未经超声处理的5~7倍^[16]。由此可见,水产品原料预处理工艺的选择会极大程度影响胶原蛋白甚至胶原蛋白水解产物(明胶)的产量及性质,需要根据目标产物特性选择合适的预处理工艺。

合理的预处理能够降低后续胶原蛋白的提取难度,提升胶原蛋白的提取效率。水产品副产物胶原蛋白提取流程示意图如图2所示。目前,水产品胶原蛋白主要提取方法可分为:酸法、碱法、酶法3类^[30]。随着水产品副产物原料的不断开发与研究,以这3类方法为主的复合提取法,如:酸-酶复合提取、酶-碱复合提取等,在简化工艺、提高效率方面提供了宝贵的实践经验。

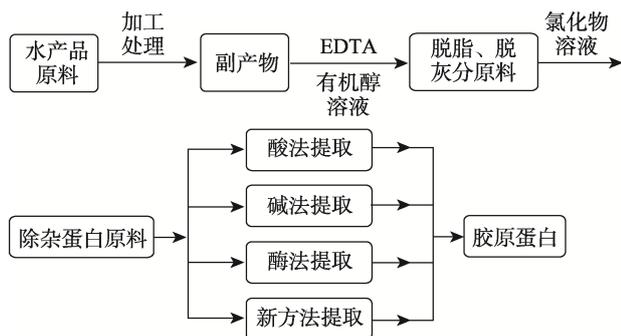


图 2 水产品副产物胶原蛋白提取工艺流程示意图

Fig. 2 Schematic diagram of collagen extraction process of by-products of aquatic products

3.1 酸法提取

动物结缔组织具有交联性，经稀酸处理后，发生部分水解，既降低了胶原蛋白的交联程度也保持了胶原蛋白单链的完整性^[31]。原料被浸泡在酸性溶液中，胶原被稀酸溶液渗透，使体积膨胀到初始体积的 2~3 倍，从而导致分子间和分子内非共价键的断裂。由于胶原蛋白呈三维纤维状结构，酸性溶液增加了原胶原蛋白分子之间的排斥力，破坏胶原蛋白分子间的离子键与 Schiff 键，酸性溶液中大量的 H⁺ 帮助水分子进入胶原纤维，使原料中蛋白分子出现足够的溶胀，在保证胶原结构完整的前提下促进胶原蛋白的溶解^[31]。同时，在小鼠胶原蛋白动力特性的研究中发现，通过乙酸提取的胶原蛋白溶液具有较高的特性黏度（溶剂效率的量度：特性黏度值越大，表明聚合物与溶剂分子结合能力越强）^[32]。为了解胶原分子和酸性溶剂之间的相互作用，YANG 等^[33]研究了胶原溶液与乙酸浓度的函数流变行为。所有样品在稳定剪切实验下均表现出剪切变稀行为。即随着乙酸浓度的增加，胶原蛋白的流动能力与其呈现正相关。因此，乙酸凭借优秀的蛋白溶解性被广泛应用在水产品胶原蛋白提取中。表 2 列举了水产品副产物酸法提取工艺与胶原蛋白得率。从表 2 可以看出，对于水产品而言，乙酸提取并不是唯一的工艺选择。柠檬酸提取的鳕鱼鱼骨胶原蛋白，与乙酸相比，蛋白结构并无明显差异，但具有较高的蛋白得率^[34]。

由于酸介质在废液排放阶段需要投入更多的成本来避免水体环境的污染，酸法提取已不作为商业提取蛋白的首选。但酸在胶原蛋白的提取上具有其他介质不具备的优势，需要其作为辅助手段参与蛋白提取。

3.2 碱法提取

碱法提取是利用强碱或强碱盐，如 NaOH、Na₂CO₃ 等破坏胶原蛋白螺旋结构，再通过浸泡、冲洗、离心等步骤提取胶原蛋白。碱法破坏性较强，在提取过程中会造成胶原蛋白中含有羟基、巯基的氨基酸不稳定，碱液浓度、提取时间控制不当会导致样品蛋白变性、氨基酸被破坏、性能变差^[35]，水

解过度进而影响成品品质。使用 NaOH 与 Ca(OH)₂ 进行碱处理的时间比酸处理长，一般在几天到几周，时间不等。韩玮等^[36]对罗非鱼鱼皮采用 4 种不同的提取方法进行提取，得到了相似的结果，即碱法提取到的胶原蛋白纯度低，效果差。所以，工业上碱处理多作为预处理方式与酶法进行联用提取。

3.3 酶法提取

胶原蛋白分子中的赖氨酸、羟赖氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸所形成的氢键是维持胶原蛋白稳定的重要的分子间作用力，蛋白酶的水解作用在保证胶原蛋白三螺旋结构稳定的前提下，使肽链展开，使氨基酸更易溶于提取介质，在提高胶原蛋白得率^[37]的同时，也减少了酸、碱法提取胶原蛋白所导致的环境污染。

目前，酶法提取胶原蛋白的方式分为两种：单一酶法或复合酶法。酶法提取需要考虑原料酶的来源，不同来源的酶会对胶原蛋白的品质造成影响。BENJAKUL 等^[38]从鲷鱼内脏和猪胃中分别提取到胃蛋白酶，同时对鲷鱼鱼皮胶原蛋白进行提取后发现：鲷鱼胃蛋白酶提取到的胶原蛋白产量较高，两种胃蛋白酶提取到的胶原蛋白热稳定性相似，但溶解度差别较大，利用鲷鱼皮肤制成的蛋白酶溶解度更大，这说明鲷鱼皮胶原蛋白在自身蛋白酶的处理下具有较弱的键组成，更易于和其余组分结合，但由于从鲷鱼内脏提取蛋白酶费时费力，工业上一般采用成本较低的猪胃蛋白酶进行提取。

表 2 列举了水产品副产物酶法提取工艺与胶原蛋白得率。对于同一原料，在优化提取工艺后，单一酶解提取到的胶原蛋白得率较酸法多^[37]。复合酶解蛋白得率均优于单一酶解，复合酶能降低胶原蛋白分子量，实现对胶原蛋白的多位点分解，使酶解产物的水解度、底物转化率更高，水解时间更短。同时，水产品副产物在酶解过程中由于疏水氨基酸含量较高，造成的酶解液的苦味、腥味较重等结果不利于后续胶原产品的开发^[39]。通过风味蛋白酶的复配添加，能够更好地避免由单一酶解所造成的胶原蛋白风味劣变问题。

表 3 列举了目前市面上主流提取方式对胶原蛋白得率以及性质的影响。不同提取方式最直观的差异表现在胶原蛋白得率上，酶、酸的种类是造成得率不同的主要原因。针对同一原料，酸、酶可能会导致提取的蛋白类型不同，并且肽链强度会发生变化，具体表现在与金属离子螯合率、抗氧化、热变性温度等指标上。针对酸法与酶法提取得率的差异，胶原蛋白的 N 端和 C 端两端的端肽区是一种非螺旋部分的交联结构^[51]，这种交联结构限制了胶原蛋白在无蛋白酶的情况下在酸介质中的溶解度。在这种情况下，经过蛋白酶特异性地切割端肽，能够得到较高的蛋白得率^[52]。

表 2 水产品副产物酸、酶法提取胶原蛋白得率
Table 2 Yield of collagen extracted by acid and enzymatic methods from by-products of aquatic products

方法	原料	提取参数 ^①	胶原蛋白得率/%	蛋白性质	参考文献
酸法提取	军曹鱼皮	0.5 mol/L 乳酸连续搅拌 24 h	19.10	溶解度、热稳定性与乳酸浓度有关	[40]
	蓝鳍金枪鱼皮	0.5 mol/L 乙酸持续搅拌浸提 24 h	5.40	胶原蛋白结构类型与鲑鱼皮类似, 但抗体识别能力不同	[24]
	小丑刀鱼皮	0.5 mol/L 乙酸浸提 4 d	16.40	小丑刀鱼红外谱图酰胺特征峰与胶原蛋白三螺旋结构稳定性有关	[41]
	鲶鱼皮		13.81	—	
	罗非鱼皮		12.50	—	
	大鲢皮	0.5 mol/L 乙酸 4 °C 冰箱提取	18.29	胶原蛋白呈致密网状结构, 完整度较酶法更好	[42]
	中华鳖裙边	0.5 mol/L 乙酸 4 °C 冰箱提取	26.79	酸溶性胶原蛋白热变性温度高于一般鱼皮	[14]
单一酶法提取	比目鱼皮	0.1 mol/L 乙酸 10 °C 下浸提 24 h	19.27	FTIR 显示胶原蛋白存在螺旋排列	[43]
	海鲈鱼粉	碱性蛋白酶 47 °C 提取 2.5 h	48.65	促进小鼠成纤维细胞增殖	[44]
	大鲢皮	碱性蛋白酶酶解 7 h	17.90	—	[45]
	鳙鱼鱼鳞	料液比 20 (g/mL), 添加样品质量 2% 的木瓜酶, 28 °C 提取 36 h	56.23	—	[46]
	青鱼鱼皮	超声处理 50 min, 胰蛋白酶提取	45.30	超声处理对胶原蛋白溶出具有显著影响	[47]
	中华鳖裙边	质量浓度 4 g/L 胃蛋白酶	60.87	I 型胶原蛋白特征明显	[48]
	鲟鱼鱼骨	胃蛋白酶	78.86	胃蛋白酶提取胶原蛋白得率最高	[49]
		木瓜蛋白酶	5.00		
		碱性蛋白酶	20.00		
	复合酶法提取	青鱼鱼鳞	木瓜、菠萝、碱性蛋白酶复配提取	47.00	比单一酶提取蛋白得率高 13%
大鲢皮		风味、木瓜、中性蛋白酶复配提取	46.86	比单一酶解提高 30% 得率, 改善胶原蛋白挥发性风味成分	[45]

注: ①溶液均为水与乙酸或水与酶混合得到; “—”表示文献无蛋白性质描述。

表 3 水产品副产物不同提取方法的对比
Table 3 Comparison of different extraction methods for by products of aquatic products

原料	处理方法	胶原蛋白得率	蛋白性质	参考文献
大眼金枪鱼鱼皮	乙酸提取 乙酸辅助+酶(胃、木瓜、菠萝、胰蛋白酶)	乙酸+酶(52.05%)>乙酸(3.05%)	溶解度、电泳条带无明显差异; 官能团、抗氧化性存在明显差异	[52]
蜥蜴鱼鱼骨	乙酸 乳酸 柠檬酸	柠檬酸(2.59%)>乳酸(1.88%)>乙酸(1.73%)	α 链强度顺序: 柠檬酸<乳酸 \approx 乙酸; 红外光谱、溶解度无显著差异	[34]
斑点叉尾鱼鱼皮	酸法提取 均质辅助提取 胃蛋白酶提取	胃蛋白酶(64.19%)>均质辅助(60.38%)>酸法(42.36%)	辅助蛋白链组分相同, 强度不同; 酸法 β 链强度更高, 酶法所得 β/α 值更高; 凝胶强度: 酸法>酶法, 具有显著差异	[53]
罗非鱼鱼皮	风味、碱性、中性、胰蛋白酶	—	胰蛋白酶提取胶原蛋白与铁离子具有更快的螯合速率, 能够形成含量更加丰富的铁螯合肽	[54]
鳕鱼	多酚氧化酶 脂肪氧化酶 胶原蛋白水解酶	—	胶原蛋白水解酶促进鳕鱼脂肪香气、酸味、腥味物质的分解	[55]
鲟鱼软骨	酸法提取 酶法提取	酸法(27.13%)>酶法(14.69%)	酸法提取得到 I 型胶原蛋白, 酶法得到 II 型胶原蛋白	[56]
软壳龟龟甲	乙酸 乙酸+胃蛋白酶	乙酸+酶(2.8%)>乙酸(1.0%)	乙酸+胃蛋白酶胶原蛋白分子交联度更大, 热稳定性更好	[57]

注: “—”表示无胶原蛋白得率的比较数据。

目前,酶法提取工艺遇到的问题在于:酶发挥作用需要合适的反应参数,导致酶无法单独进行作用,酸是酶法工艺调节 pH 的必要物质,并且酸酶复合在鱼皮^[58]原料胶原蛋白得率优化上具有优势,是商业化程度较高的提取方式。但对于鳖甲^[57]等矿物质含量高的原料,即使采用酸酶复合的提取方法,蛋白得率仅为 2.8%,极大限制了鳖甲副产品的商业发展。所以,针对此类原料,采用超声波、发酵等预处理成为提高胶原蛋白得率的关键操作,蛋白酶活性、酶的适配性是影响复合酶作用的关键因素,而低功率超声能有效破坏胶原蛋白结构,提高蛋白酶活性^[59],发酵处理能提高胶原蛋白得率、改善蛋白腥臭味^[60]。虽然水产复合酶工业化程度与陆生动物蛋白^[61]相比还有差距,但以物理、生物法为辅,酸与复合酶为主构建的“物理/生物-酸-复合酶”提取体系能为胶原蛋白工业面临的得率低、风味等问题提供新的解决思路。

3.4 新型蛋白提取技术

除去传统的酸、酶法提取工艺,一些更环保、得率更高的方法正在逐步应用在水产品加工行业。超临界流体萃取技术目前已在有机物富集、原料化合物分离上取得了不错的进展^[62]。CO₂ 是超临界流体萃取中最常用的气体,具有低毒性、低成本、高可用性、稳定性、环境可接受性和温和的操作条件等优点。此外,CO₂ 在从含水介质中提取后会被释放,残留度较低^[12],通过 CO₂ 酸化水提取的胶原蛋白对成人纤维细胞不存在毒害作用,具备研究价值^[30]。

亚临界水是水在一定压力与温度条件下依旧保持液体进行提取的方法。水体在亚临界条件下,极性随温度升高而降低,通过温度参数的调整提取不同成分,由于蛋白侧链 R 基团的亲水性不同,亲水性强的基团与亚临界水结合紧密,更易提取。但在实际提取过程中,明胶、肽等小分子含量较胶原蛋白更高^[64]。

目前,气泡分子主要运用在灭菌、材料分解中,蛋白提取领域应用较少,主要原因是提取机制还处于研究阶段。在现有研究中,气泡分子对鱼鳞副产品胶原蛋白的提取具有促进效果,其中 CO₂ 气泡分子相比于 O₃ 和 O₂ 具有更高的蛋白得率^[65]。

随着低碳、可持续发展理念的提出,类似亚临界水、气泡分子、超临界流体萃取等新型提取技术逐步成为研究的主流方向,虽具备一定的工业化潜力,但依旧存在许多问题:超临界流体法与亚临界法提取技术的关键在临界温度与压力等参数的设定,过高的温度会使胶原蛋白变性,更易获得小分子肽和明胶物质,而大分子胶原的提取受到抑制;新型提取方法尚未独立应用在胶原蛋白提取中,加

上成本等问题,导致推广应用存在较大阻碍。与传统方法相比,新型提取方式除绿色环保以外,还具有提取的胶原蛋白肽具有更高的抗炎活性^[66],不用加工直接应用等优点,是获取胶原蛋白活性成分的有效手段。

目前,就得率而言,传统酸、酶法仍然是胶原蛋白主要提取方式,新技术亟需解决提取参数与胶原蛋白降解之间的问题,添加茶黄素等高熔点、高沸点的蛋白交联剂,能有效抑制胶原蛋白降解,提升蛋白得率^[67]。

4 水产品副产物胶原蛋白的应用

胶原蛋白的提取与应用已构成完备的商业体系,水产品副产物胶原蛋白的独特性能更是不断应用在各领域。图 3 归纳了主流水产品副产物胶原蛋白的功能特性。胶原蛋白具有吸水聚合性、生物相容性、低免疫原性、生物降解性、高孔隙率、无脂界面穿透性等特点,已作为食品、药品和生物医学行业的关键添加物^[66]。本节重点介绍胶原蛋白及衍生肽在食品加工、保鲜、医药行业中的应用。

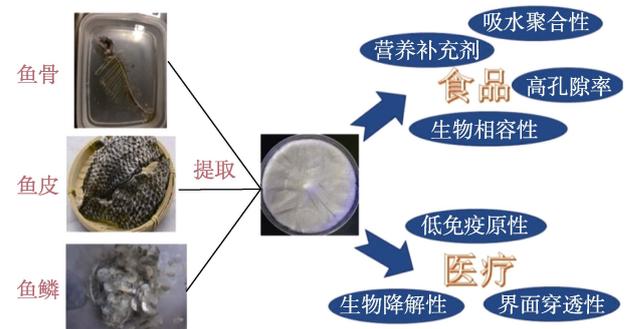


图 3 水产品副产物胶原蛋白功能性质及应用
Fig. 3 Functional properties and application of collagen from by-products of aquatic products

4.1 胶原蛋白及其降解产物在食品中的应用

图 4 列举了胶原蛋白及其降解产物在肉制品、乳制品、烘焙、生鲜食品、医疗行业上的主要作用。随着健康发展理念逐渐深入市场,饮料以及乳制品行业逐渐转向发展低糖、营养强化等功能性产品。水产品胶原蛋白肽能够防止乳制品乳清沉淀,提高产品凝胶强度^[68],小分子蛋白降解物能通过氢键以及与冰晶的结合减少产品内部冰晶大小^[69],也能改变酸奶微观结构,影响产品的硬度、黏度以及口感^[70]。

抗冻肽主要来源于胶原蛋白分子的降解,通过抑制高分子蛋白的交联,提高可溶性蛋白得率,形成抗性更强的面筋网络,减少冷冻过程中冰晶形成造成的损害,同时限制了水分迁移,提升面团冷冻后的烘焙性能,是冷冻烘焙产品中的优良添加成分

[35]。目前, 水产蛋白肽在烘焙产品中显现出良好的保水性[37]以及品质改善性[71], 抗冻性研究却较为匮乏, 未来研究需要朝向水产品以及多肽分子量对冷冻面团的影响上。

近年来, 生鲜食品频繁出现保鲜性能下降, 有害物质残留等问题, 可食用性薄膜技术能有效防止食品表面有害物质累积和内部氧化等问题, 目前已成为食品包装的重点研究领域。壳聚糖作为涂层、薄膜包装的主要成分, 壳聚糖的质子化胺与微生物表面上的阴离子电荷之间的静电相互作用, 使细胞成分泄漏, 导致细胞坏死[72]。因此, 壳聚糖能够防止食品的微生物变质, 这是影响保质期和食品质量的主要因素。胶原蛋白的延展性和抗菌性是涂层、薄膜技术极佳的辅助手段, 工业上已经开始出现壳聚糖与胶原蛋白联用的可食用涂层, 逐步应用在食品运输、储藏等环节, 延长了产品货架期。

除上述应用外, 胶原蛋白以及小肽分子已作为原料或配料为食品、保健品提供特定功能。目前, 市场将抗衰老、抗炎、营养补充剂等产品作为研发、销售的重点。成纤维细胞含量是影响人体衰老的主要指标, 经过紫外线照射后, 皮肤胶原蛋白流失, 细胞线粒体活性下降, 活性下降不仅导致机体衰老, 还会引发许多疾病[73]。胶原蛋白肽复合饮品能显著提高成纤维细胞活性, 上调弹性蛋白的基因表达, 紫外造成的 DNA 损伤可通过胶原蛋白肽饮品进行修复, 起到延缓衰老, 防止病变的功效[74]。

随着胶原蛋白功能的不断发掘, 口服小剂量胶原蛋白肽类营养补充剂对关节炎[75]、皮肤创口[76]具有治疗作用, 同时, 在海洋无脊椎动物的胶原蛋白中提取到的抗氧化、抗高血压、抗病毒等生理活性物质[77]推动了蛋白与食品、医疗产业的结合, 为进一步挖掘胶原蛋白功能性物质提供了理论支撑。

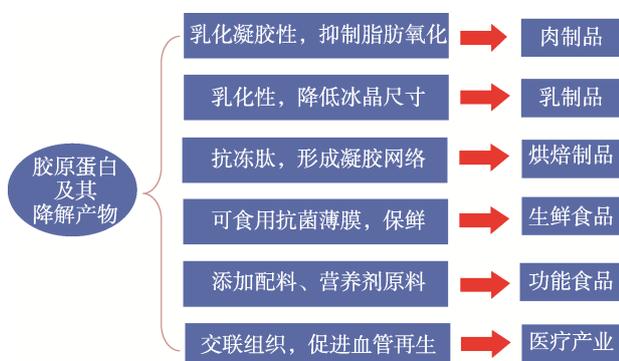


图4 胶原蛋白及其降解产物在食品、医疗上的应用

Fig. 4 Collagen and its degradation products in food and medical applications

4.2 胶原蛋白及其降解产物在医疗行业的应用

胶原蛋白本质上是蛋白类大分子, 从海洋生物

中所提取到的胶原蛋白毒性低, 加上其生物相容性强, 在骨组织工程、皮肤组织工程和再生、软骨组织工程、伤口敷料中大范围使用[54]。

高强度运动带来的肌腱、软骨、半月板、韧带机械性损伤是运动医学领域重大的研究课题。这类损伤无法自行愈合, 当前最佳治疗手段是通过手术更换组织结构, 重新构建结缔网络。胶原蛋白在修复人体肩部肌腱组织的过程中, 在植入支架6个月后, 支架中的蛋白成分被天然肌腱组织完全替代[78]。虽然目前胶原支架在组织工程中广泛应用, 但面对软骨、韧带的大面积损伤, 支架固定困难, 软骨、韧带处存在较大剪切力与压缩力是此类支架的局限性。尽管如此, 胶原蛋白分子在组织学中存在的功能转变能力是其他原料所不具备的, 以I型胶原蛋白支架为例, 在软骨组织修复过程中能够浸润足够多的软骨细胞再转变为II型胶原蛋白进行修复[79]。

当前烧烫伤、痤疮以及其他疾病导致的皮肤创伤越发难以治愈, 治疗涉及炎症的抑制、血管的形成、细胞的分裂分化等方面。海洋胶原蛋白已被证明是治疗皮肤伤口愈合的有效生物材料, 蛋白肽中的羟基化物、纤维成分是起到修复作用的关键成分[80]。ZHANG等[81]采用体外划痕的方法探究海洋胶原蛋白肽(MCPs)对受伤兔子皮肤愈合速度的影响(图5), 治疗6h, 胶原蛋白肽质量浓度与愈合程度无显著相关性, 从12h后, 蛋白肽质量浓度与创面愈合程度呈正相关, 胶原蛋白肽质量浓度越高, 创面愈合越快, 治疗24h, 12.5 mg/L的胶原蛋白肽就能使划痕愈合。

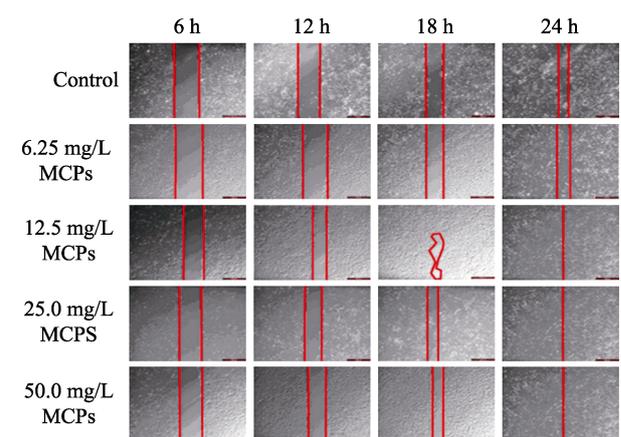


图5 不同质量浓度胶原蛋白肽对兔子皮肤划痕闭合的影响[81]

Fig. 5 Effect of different mass concentrations of collagen peptides on closure of skin scratches in rabbits[81]

糖尿病神经性足底溃疡是糖尿病患者最为常见的并发症之一, 越来越多的患者由于足底溃疡导致非外伤性截趾或截肢, 截肢后的患者在5年内的死

亡率上升至 70%^[82], 因此, 寻找治愈糖尿病足底溃疡, 减少糖尿病并发症对于临床医学具有重要意义。赵紫熙等^[83]发现, I 型与 III 型胶原蛋白中含有的 2, 9 金属蛋白酶具有加速创面愈合、形成肉芽的功效。目前, 针对足底溃疡的研究还在深入, 聚甲基丙烯酸、纤维素、透明质酸等成分均能够促进血管再生, 与胶原蛋白分子形成的敷料具有较好的生物降解性, 极大减少了材料在生物体中的留存量, 具有良好的工业发展前景。

从近期的研究发现, 胶原蛋白不再以主要原料用于食品与医药行业, 更多的生物活性成分开始逐步抢占胶原蛋白原料市场, 但根据食品口感、产品质量、治愈时效综合考虑, 胶原蛋白依旧作为不可或缺的重要组分而被应用于现代食品与医疗产业中。

5 结束语与展望

在中国淡水资源不断开发的背景下, 已经出现许多区别于传统水产品副产物(皮、鳞、骨等)的原料(大鲵黏液、中华鳖鳖甲等), 这些副产物含有的胶原蛋白以及其他生物活性成分已投入大规模的商业化生产。并且与传统废弃物相比, 黏液、裙边等预处理时间短、活性物质丰富、应用广泛的原料, 是未来水产品加工业研究的首要目标。

在可持续发展理念的持续推动下, 对水体环境造成不可逆损害的酸法、碱法提取工艺开始逐渐被酶法所取代。对于当前的胶原蛋白提取工艺, 无论是从得率, 还是蛋白提取后的综合性能, 酶法都要优于酸、碱法。在进一步提高胶原蛋白、蛋白肽、胶原明胶得率上, 复合酶通过多种酶对胶原蛋白不同位点进行切割, 能有效提高胶原蛋白及其水解产物的产量, 并且使用风味蛋白酶进行复配提取, 能有效扩大胶原蛋白的应用范围。经过分析, 水产品副产物酶解过程中选用较多的胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等均属于酸性酶类, 通过采用酸溶液预处理或者酸辅助提取的方式能够使酶解过程处于一个合适的 pH 区间, 并且在超声、发酵等预处理技术的加持下, 在未来能够合理构建“物理/生物-酸-复合酶”的水产品副产物胶原蛋白的提取体系, 进一步提升水产品副产物的胶原蛋白提取产量。

酶法虽已成为胶原蛋白提取的首选方法, 但依旧要面对新型提取工艺的冲击。面对全球变暖的严峻考验, 气泡分子、超临界流体、亚临界水等绿色提取技术需要添加胶原蛋白交联剂防止大分子蛋白降解、维持提取介质稳定性、控制提取成本, 以此提升工业化可行性。

以胶原蛋白肽、明胶为主要功能成分的产品已

在功能食品、食品保藏、医疗领域广为销售。癌症、心脑血管等慢性疾病是人类面临的重大健康难题, 挖掘更多对人体健康有益的重要生理功能是除提取工艺外水产品胶原蛋白领域需要关注和研究的重要方向。

参考文献:

- [1] ZHOU R (周睿), LI G H (李光华), JIN F P (金方彭). Research and prediction analysis of factors influencing fish production in China[J]. *Jiangsu Agricultural Science* (江苏农业科学), 2020, 48(10): 327-332.
- [2] XIANG Z X, GONG J S, LI H, *et al.* Heterologous expression, fermentation strategies and molecular modification of collagen for versatile applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 22(1): 21-22.
- [3] LIU C Y (刘春雨), YI D L (衣大龙), YANG Y L (杨玉亮), *et al.* *In vitro* regulation of intestinal flora by yak bone collagen peptides[J]. *Food and Fermentation Industry* (食品与发酵工业), 2021, 47(16): 59-65.
- [4] LEE J M, NG W L, MA W C, *et al.* Bioprinting of collagen: Considerations, potentials, and applications[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2020, 21(1): e2000280.
- [5] FEREDOON S, VAMADEVAN V, HAN P, *et al.* Utilization of marine by-products for the recovery of value-added products[J]. *Journal of Food Bioactives*, 2019, 6(6): 10-61.
- [6] MEYER M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2019, 18(1): 24.
- [7] ALBERTA T, NUNZIA G, SIMONAET B, *et al.* Sub- and supramolecular X ray characterization of engineered tissues from equine tendon, bovine dermis, and fish skin type- I collagen[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2020, 20(5): e2000017.
- [8] ARORA S, GORDON J, HOOK M. Collagen binding proteins of grampositive pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12(1): 628798.
- [9] ALSHAER A, LYONS A, ISHIKAWA Y, *et al.* Sequence-dependent mechanics of collagen reflect its structural and functional organization[J]. *Biophysical Journal*, 2021, 120(18): 4013-4028.
- [10] HAFEZ J, ALBERTO L, MAFOSSO S M, *et al.* Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering[J]. *Polymers*, 2020, 12(10): 2230.
- [11] ABBAS A A, SHAKIR K A, WALSH M K. Functional properties of collagen extracted from catfish (*Silurus triostegus*) waste[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 633.
- [12] GOVINDHARAJ M, ROOPAVATH U K, RATH S N. Valorization of discarded marine eel fish skin for collagen extraction as a 3D printable blue biomaterial for tissue engineering[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 230: 412-419.
- [13] RITA O S, MARTINS E, CARVALHO D U, *et al.* Collagen from atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO₂ acidified water with potential application in healthcare[J]. *Journal of Polymer Research*, 2020, 27(12): 2001-2014.
- [14] ZHANG Q (张强), HUANG X (黄鑫), WANG H X (王洪新), *et al.* Extraction, identification and physicochemical properties of collagen from the skirt of chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. *Food and Fermentation Industry* (食品与发酵工业), 2019, 45(12): 176-182.
- [15] HE G D, YAN X X, WANG X D, *et al.* Extraction and structural characterization of collagen from fishbone by high intensity pulsed electric fields[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2019, 42(6): e13214.
- [16] KHONG N, YUSOFF F, JAMILAH B, *et al.* Improved collagen

- extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes[J]. Food Chemistry, 2018, 251: 41-50.
- [17] HU Y (胡艺), ZHENG P A (郑平安). Extraction of type II collagen from sturgeon cartilage and its structural identification[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection (食品安全质量检测学报), 2021, 12(6): 2433-2438.
- [18] GUERRA R, ENRIQUE M, GUADALUPE S J, et al. Physicochemical and structural properties of recovered elastin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by-products[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2019, 28(3): 275-286.
- [19] AZIZUR M. Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications[J]. Marine Drugs, 2019, 17(2): 118.
- [20] CHINH N T, MANHV Q, TRUNG V Q, et al. Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence[J]. Natural Product Communications, 2019, 14(7): 1-12.
- [21] BLANCO M, NOELIA S, JESÚS V, et al. Does subunit composition influence the intermolecular crosslinking of fish collagen? A study with hake and blue shark skin collagens[J]. Polymers, 2020, 12(8): 1734.
- [22] TAPIA V, EZQUERRA B, MARQUEZ R, et al. Proteomic identification and physicochemical characterisation of paramyosin and collagen from octopus (*Octopus vulgaris*) and jumbo squid (*Dosidicus gigas*)[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 55(10): 3246-3253.
- [23] LEIGH S, NICOLE D, JONGKIL K, et al. Mechanical performance of collagen gels is dependent on purity, α_1/α_2 ratio, and telopeptides [J]. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 2021, 110(1): 11-20.
- [24] TANAKA T, TAKAHASHI K, TSUBAKI K, et al. Isolation and characterization of acidsoluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2018, 21(2): 1-8.
- [25] JOANNA T, MALGORZATA M, PIOTR K, et al. Characterization of carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatin extracted using different pretreatments method[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81: 169-179.
- [26] SONG Z L, LIU H M, CHEN L W, et al. Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pretreatment[J]. Food Chemistry, 2021, 340(5): 128139.
- [27] TAN J (谭佳), WANG Y X (王雅欣), ZHEN D W (甄大卫), et al. Pretreatment process for defatting and removing protein from chicken feet[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(1): 138-146.
- [28] WAN Y F, GAO Y F, SHAO J H, et al. Effects of ultrasound and thermal treatment on the ultrastructure of collagen fibers from bovine tendon using atomic force microscopy[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 128985.
- [29] LI G (李根), REN G Y (任国艳), LI Q (李倩), et al. Optimization and characteristic analysis of ultrasonic assisted extraction of collagen from salamander skin[J]. Food Industry Science and Technology (食品工业科技), 2021, 42(22): 1-15.
- [30] SOUSA R O, ALVES A L, CARVALHO D N, et al. Acid and enzymatic extraction of collagen from atlantic cod (*Gadus morhua*) swim bladders envisaging health-related applications[J]. Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 2020, 31(1): 20-37.
- [31] CAO S M, WANG Y, XING L J, et al. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin[J]. Food and Bioproducts Processing, 2020, 121: 213-223.
- [32] LEWANDOWSKA K, SZULC M, SIONKOWSKA A, et al. Effect of solvent on the hydrodynamic properties of collagen[J]. Polymers, 2021, 13(21): 3626.
- [33] YANG H, DUAN L, LI Q, et al. Experimental and modeling investigation on the rheological behavior of collagen solution as a function of acetic acid concentration[J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2018, 77: 125-134.
- [34] JAZIRI A A, SHAPAWI R, HUDAN N, et al. Biochemical analysis of collagens from the bone of lizardfish (*Saurida tumbil bloch*, 1795) extracted with different acids[J]. Clarivate Analytics Web of Science, 2022, 10(8): e13103.
- [35] CAO C W, XIAO Z C, GE C R, et al. Animal by-products collagen and derived peptide, as important components of innovative sustainable food systems-A comprehensive review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 52(1): 21-25.
- [36] HAN W (韩玮), XING H W (邢瀚文), SHI W Z (施文正), et al. Comparative study on four preparation methods of tilapia collagen[J]. Journal of Henan Agricultural University (河南农业大学学报), 2020, 54(1): 102-108.
- [37] ZHAO R (赵然), CAO M J (曹敏杰), WANG J (王晶), et al. Advances in the extraction and application of aquatic animal-derived collagen[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection (食品安全质量检测学报), 2020, 11(22): 8157-8165.
- [38] BENJAKUL S, YAO W P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(1): 132-138.
- [39] ZHANG Y (张崑), GUO S Y (郭思亚), XIONG W (熊伟), et al. Research progress of peptide preparation process by collagen enzymatic digestion[J]. China Flavoring (中国调味品), 2018, 43(2): 89-95.
- [40] NORZULAIHA S, SATYA S, ISMAIL S M, et al. Extractability and physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) skin collagen as influenced by lactic acid concentration[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 45(1): e15080.
- [41] LE T M T, NGUYEN V M, TRAN T T, et al. Comparison of acid-soluble collagen characteristic from three important freshwater fish skins in mekong delta region, vietnam[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(9): e13397.
- [42] DONG M Y (董梦尧), CHEN D J (陈德经), YANG H (杨慧), et al. Comparative study of collagen in muscle and skin of giant salamander (*Salamander davidianus*)[J]. Meat Research (肉类研究), 2020, 34(12): 11-17.
- [43] ARUMUGAM G K S, 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.
- [44] LIU L (刘磊), ZHU J (祝婧), ZHANG M W (张名位), et al. Optimization of collagen peptide preparation process of sea bass and comparison of its proliferation-promoting activity of fibroblasts[J]. Chinese Journal of Food (中国食品学报), 2016, 16(11): 89-95.
- [45] YE X (叶欣), RAN X (冉旭). Study on the extraction process of collagen peptides from human-reared giant salamander skin[J]. Meat Industry (肉类工业), 2014, (4): 29-33.
- [46] HUANG Y M (黄宇玫), LI M (李敏), ZENG F (曾芳), et al. Study on the continuous extraction process of collagen from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) by two-step acid extraction and enzymatic digestion[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2019, 44(2): 152-158.
- [47] WANG Z Y (王正云), JIANG H L (蒋慧亮). Ultrasound-assisted enzymatic extraction process of collagen from mackerel fish skin[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2020, 41(5): 133-137.
- [48] LU J F (陆剑锋), WAN Q (万全), YIN Z M (殷章敏), et al. Extraction and characterization of collagen from the skirt of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Journal of Aquaculture (水产学报), 2010, 34(6): 981-988.
- [49] LIAO T (廖涛), HUANG C X (黄晨曦), JIANG H Y (江洪有), et al. Response surface methodology to optimize the enzymatic digestion

- process of sturgeon skin collagen peptides[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2018, 43(1): 141-147.
- [50] ZHU J Y (朱俊颖), WANG Y S (王耀松), ZHAO L M (赵黎明), *et al.* Preparation of high-purity fish matrix collagen peptides by complex enzymatic method[J]. Chinese Journal of Food (中国食品学报), 2015, 15(12): 47-54.
- [51] LIN X H, CHEN Y Y, JIN H X, *et al.* Collagen extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin by isoelectric precipitation: Physicochemical properties, proliferation, and migration activities[J]. Marine Drugs, 2019, 17(5): 261.
- [52] DEVITA L, URILMALA M, LIOE H N, *et al.* Chemical and antioxidant characteristics of skin-derived collagen obtained by acid-enzymatic hydrolysis of bigeye tuna (*Thunnus obesus*)[J]. Marine Drugs, 2021, 19(4): 222.
- [53] TAN Y Q, CHANG S K C. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 147-155.
- [54] LIN S T, HU X, LI L H, *et al.* Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 149(3): 111796.
- [55] HAO Z L (郝卓莉), YANG M (杨萌), LIU Y M (刘亚敏), *et al.* Principal component analysis of the effect of different enzyme treatments on volatile flavor substances of codfish[J]. China Seasoning (中国调味品), 2021, 46(8): 57-59.
- [56] LUO Q B, CHI C F, YANG F, *et al.* Physicochemical properties of acid- and pepsin-soluble collagens from the cartilage of siberian sturgeon[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2018, 25(31): 31427-31438.
- [57] LI C Y, SONG W, WU J P, *et al.* Thermal stable characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Tissue and Cell, 2020, 67: 101424.
- [58] KOLOTOVA D, PETROVA L. Technology and physico-chemical properties of gelatin from atlantic cod skin[J]. International Applied Research Conference on Biological Resources Development and Environmental Management, 2020, 2020(1): 426-436.
- [59] ANAMARIA V, IOAN C, MIRCEA V, *et al.* A parameter study of ultrasound assisted enzymatic esterification[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 1421.
- [60] SHEN R M (沈瑞敏), LUO X (罗璇), LI H (李航), *et al.* Study on the process of removing fishy taste from fish scale collagen peptides by fermentation of microbial agents[J]. China Brewing (中国酿造), 2020, 39(2): 173-176.
- [61] DAI D Q (戴丹琴), WENG P F (翁佩芳). Preparation of bovine collagen peptides by complex enzymes[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2013, 30(5): 561-565.
- [62] BALÃO D, CAROLINA A A, MAURÍCIO R. Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 74: 105584.
- [63] SYAFINAZ R R, KHAIRINA I N, AMIRAHET R R, *et al.* Application of green technology in gelatin extraction: A review[J]. Processes, 2021, 9(12): 2227.
- [64] RODRIGO M, MARTA M, ALEXANDRE P, *et al.* Subcritical water extraction and hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) frames to produce bioactive protein extracts[J]. Foods, 2021, 10(6): 1222.
- [65] JOURNAL A, KUWAHARA J. Extraction of type I collagen from tilapia scales using acetic acid and ultrafine bubbles[J]. Processes, 2021, 9(2): 288.
- [66] SUBHAN F, HUSSAIN Z, TAUSEEF I, *et al.* A review on recent advances and applications of fish collagen[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(6): 1027-1037.
- [67] LIU H, GUO J, WANG R, *et al.* Theaflavins as a novel cross-linker quickly stabilize demineralized dentin collagen against degradation [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 19699.
- [68] SHORI A B, MING K S, BABA A S. The effects of lycium barbarum water extract and fish collagen on milk proteolysis and *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of yogurt[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 68(2): 221-229.
- [69] TIAN J, WALAYAT N, DING Y T, *et al.* The role of trifunctional cryoprotectants in the frozen storage of aquatic foods: Recent developments and future recommendations[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 21(1): 321-339.
- [70] DONG S R (董世荣), LI X (李欣), ZHANG C (张晨), *et al.* Effect of fermentation conditions on the textural properties of collagen peptide yogurt[J]. China Dairy Industry (中国乳品工业), 2019, 47(12): 14-18, 2.
- [71] KUMAR A, ELAVARASAN K, HANJABAMET M D, *et al.* Marine collagen peptide as a fortificant for biscuit: Effects on biscuit attributes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 109: 450-456.
- [72] ANDREA A, LUISA M M, ANDREA M, *et al.* Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan *versus* staphylococcus epidermidis[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 179: 273-281.
- [73] SRIVASTAVA S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders[J]. Genes, 2017, 8(12): 398.
- [74] LIN P, HUA N, CHEN J H, *et al.* Oral collagen drink for antiaging: Antioxidation, facilitation of the increase of collagen synthesis, and improvement of protein folding and DNA repair in human skin fibroblasts[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020(2): 1-9.
- [75] MOBASHERI A, MAHMOUDI A, KALVAITYTE U, *et al.* A white paper on collagen hydrolyzates and ultrahydrolyzates: Potential supplements to support joint health in osteoarthritis?[J]. Current Rheumatology Reports, 2021, 23(11): 78.
- [76] AINHOA I, IRATXE Z, MIREIA A, *et al.* The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116(13): 106633.
- [77] GANESAN A R, MOHANRAM M, BALASUBRAMANIAN B, *et al.* Marine invertebrates' proteins: A recent update on functional property[J]. Journal of King Saud University-Science, 2020, 32(2): 1496-1502.
- [78] SCHÜTTLER K F, GÖTSCHENBERG A, KLASAN A, *et al.* Cell-free cartilage repair in large defects of the knee: Increased failure rate 5 years after implantation of a collagen type I scaffold[J]. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2018, 139(1): 99-106.
- [79] YEUNG D A, KELLY N H. The role of collagen-based biomaterials in chronic wound healing and sports medicine applications[J]. Bioengineering, 2021, 8(1): 8.
- [80] CHEN J J, GAO K L, LIU S, *et al.* Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process *in vivo*[J]. Marine Drugs, 2019, 17(1): 33.
- [81] ZHANG H, YANG P, ZHOU C X, *et al.* Marine collagen peptides from the skin of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation[J]. Marine Drugs, 2017, 15(4): 102.
- [82] SEBASTIÁN F E, ÁLVAROAFONSO F J, GARCÍAÁLVAREZ Y, *et al.* Ultrasound-assisted wound (UAW) debridement in the treatment of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(7): 1911.
- [83] ZHAO Z X (赵紫熙), XU J (徐俊), DING M (丁敏), *et al.* Changes of type I and III collagen and matrix metalloproteinase 2,9 in diabetic foot ulcer wounds by external application of medical collagen sponge[J]. Chinese Tissue Engineering Research (中国组织工程研), 2022, 26(10): 1544-1550.