

酶法制备明胶提胶前处理条件

林月华, 刘海英, 过世东*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡, 214122)

摘要: 作者采用酶法制备明胶。以罗非鱼骨为提取明胶的原料, 优化了鱼骨的盐酸脱盐工艺和脱盐骨素利用木瓜蛋白酶酶解工艺。研究表明, 盐酸脱盐条件为: 鱼骨用 0.6 mol/L 盐酸脱盐, 液料比为 5 mL/g, 浸酸时间为 6 h, 期间每隔 1.5 h 换酸一次; 木瓜蛋白酶预处理工艺最优条件为: 温度为 46.5 ℃, pH 5.3, 反应时间为 72 min, 液料比为 3 mL/g, 酶的添加量为 2 480 U/g (鱼骨)。经过提胶, 得到了质量和产率都较高的明胶产品。酶法制取明胶减少了工业废水的产生, 缩短了生产周期, 并为罗非鱼的综合利用提供了新途径。

关键词: 罗非鱼; 鱼骨; 木瓜蛋白酶; 酶解; 明胶

中图分类号: TS 254.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0189—06

Study on Pretreatment Processing of Gelatin Extraction from Tilapia Bones

LIN Yue-hua, LIU Hai-ying, GUO Shi-dong*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This paper is designed to extract gelatin from tilapia bone with the method of Enzymatic Hydrolysis. The effect of demineralizing and hydrolyzing conditions on extraction were analysed. In this research we can show the demineralizing condition is tilapia bone added to 0.6 mol/L HCl with solution-to-bone ratio 5 mL/g for 6 h and change the acid solution every 1.5 h. the optimal conditions of enzymolysis is the temperature 46.5 ℃, pH 5.3, time 72 min, the protease solution-to-bone ratio was 3 mL/g, amount of enzyme 2480 U/g (bones).

Keywords: tilapia, fish bone, papain, enzymolysis, gelatin

明胶是动物的皮或骨结缔组织中的结构蛋白胶原经部分降解的产物^[1], 由于其优良的理化性质广泛应用于食品、医药、工业等领域^[2]。随着应用范围的不断扩大, 明胶需求量也逐年递增, 目前世界的明胶年产量已经达到大约 326 000 t^[3-4]。明胶工业传统的原料是猪和牛的皮与骨, 近年来由于牛、猪

等动物所携带传播的各种传染病如疯牛病、口蹄疫在全球范围内肆虐, 有不少国家减少或禁止了牛、猪来源的明胶的生产、使用和进口^[1], 陆生动物胶原蛋白的应用受到限制。水产明胶被公认为是无病毒感染危险^[5], 而且可以被伊斯兰教、犹太教等特殊群体消费者所接受^[6]。因此人们开始寻求从水产动物

收稿日期: 2012-04-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP21010)。

* 通讯作者: 过世东(1953—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事水产资源的深加工与动物饲料品质调控研究。E-mail: guosd@jiangnan.edu.cn

如鱼类组织中提取胶原蛋白。我国是水产养殖大国,罗非鱼养殖量大。目前我国大多将罗非鱼做成冻鱼片大量出口,而加工鱼片时产生的大量下脚料中鱼骨占很大比例,一般将鱼下脚料干燥做成饲料,但该饲料适口性差、消化率低^[10],资源得不到充分利用,利用鱼骨提取明胶有望大幅度提高其经济效益。然而鱼源明胶还处于起步阶段,仅仅占明胶年产量的1%^[14],鱼源性明胶有很大的发展前景。传统制备明胶有酸法和碱法,但由于生产工艺周期长、卫生条件难以控制、设备改进困难以及对环境造成污染等原因,难以满足日益增长的明胶市场的需求,迫切需要改进^[7]。而且酸碱切断胶原分子随机性大,导致明胶凝冻强度低,质量较差^[11]。到目前为止,酶法生产明胶虽然还没有大规模应用于明胶生产中,但其潜在的生产周期短、设备易于控制及环境污染少等优势正逐渐显现出来。可见,酶法制胶工艺是一种颇具发展前途的制胶方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料与试剂 生产冻鱼片的罗非鱼下脚料:广西南宁百洋集团;木瓜蛋白酶(12.5万U/g):南宁庞博生物;铬黑T(BS),羟脯氨酸(BR),牛血清白蛋白(BR),N,N-二甲基-4-氨基苯甲醛,乙二胺四乙酸二钠等化学试剂,均为分析纯。

1.1.2 主要实验仪器 TA-XT2i 质构仪:英国 STABLE MICROSYSTEMS 公司;PW100 型高速万能粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司;IKA-RV 05-basic 旋转蒸发器:GMBH&CO.KG;Micro Modulyo-230 真空冷冻干燥器:Thermo Savant 公司;DL-5-B 型离心机:上海安亭仪器厂;DELTA 320S pH 计:梅特勒-托利多仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验流程 冷冻罗非鱼→水解鱼肉制备鱼骨→浸酸除盐→酶处理骨素→水洗→提胶→离心、过滤→浓缩、干燥。

1.2.2 操作要点

1)水解脱肉:冷冻罗非鱼在室温下解冻后利用碱性蛋白酶水解鱼肉条件为:50℃、pH 10,液料比 1.5 mL/g,时间 3 h,加酶量 1 000 U/g。水解结束后沸水浴 10 min 灭酶,过滤并用自来水冲洗至得到洁净鱼骨,自然条件下风干。

2)浸酸除盐:在室温条件下,采用盐酸浸泡鱼骨去除骨中的矿物质,每浸酸 1.5 h 换酸一次,通过考察鱼骨除盐情况和提取的明胶产率和凝胶强度选择适宜的盐酸浓度、液料比和浸酸次数。

3)酶处理骨素:在浸酸单因素条件研究中,选取实验中酶解条件统一为温度 50℃、pH 6.5、时间 1 h、加酶量 4 000 U/g,液料比 5 mL/g,在恒温水浴锅中振荡频率 70 r/min。酶解完成后沸水浴 10 min 灭酶,过滤,用去离子水清洗除残酶,产物待提胶使用。

在酶解处理骨素条件的优化中。对酶反应温度、pH、时间、液料比、加酶量各因素做单因素实验,然后对这 5 个因素做均匀优化实验,优化实验各因素水平见表 1。

表 1 酶反应各因素水平条件

Table 1 Variables levels of enzymolysis

水平	A ₁ (温度/℃)	A ₂ (pH)	A ₃ (时间/h)	A ₄ (液料比/mL/g)	A ₅ (加酶量/U/g)
1	40	5.5	1	3	1 000
2	50	6.5	2	5	2 500
3	60	7.5	3	7	4 000

因为提取明胶的指标包括每道胶的产率和明胶强度不容易直接比较,所以选用一个综合评价指标作为最终考察指标^[8],计算方法如下:

$$M = \sum 25 \times F_i / (F_{\max} - F_{\min}) + \sum 25 \times G_i / (G_{\max} - G_{\min})$$

其中: M 为综合评价指标; F_i 为某道胶的产率; $F_{\max}$ 和 $F_{\min}$ 分别为对应该道胶的最大和最小产率; G_i 为某道胶的凝胶强度; $G_{\max}$ 和 $G_{\min}$ 分别为对应该道胶的最大和最小凝胶强度;“25”是对明胶产率和凝胶强度的权重系数,因为合并后的两道胶在产率和凝胶强度上都同样重要,故占重要性的 25%所以权重系数选为 25。

4)提胶:参考 Jan Arne Arnesen 的从鲑鱼头骨提取明胶的方法^[13],分五道提胶,各道提胶 pH 和温度分别为一道:5.6、60℃;二道:4.6、70℃;三道:3.6、80℃;四道:2.6、85℃;五道:2.0、90℃。每道胶提取时间 2 h,液料比 1:5 mL/g,搅拌速度 70 r/min。

5)离心、过滤:提取得到的胶液在 4 000 r/min 条件下离心 10 min,得到澄清胶液。

6)浓缩、干燥:离心后,胶液用旋转蒸发器在 50℃下浓缩至原体积的 1/2,然后冷冻干燥。

1.3 测定方法

1.3.1 Ca²⁺、Mg²⁺总含量测定方法 以浸酸液中

Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量变化计算骨中矿物质去除率。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 去除率等于浸酸液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 总含量除以骨料中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量。参考相关钙离子等金属离子测定的文献[9],结合本实验情况得测量 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 总含量方法如下:取 0.5 mL 浸酸液于 100 mL 三角瓶,加 10 mL 体积的 pH 10.0 氨-氯化铵缓冲液和 2 滴铬黑 T 指示剂,用 $\text{EDTA}-\text{Na}_2$ 标定使其颜色由红色变为蓝色为止。

0.5 mL 浸酸液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 总摩尔数=

$$c_{\text{EDTA}-\text{Na}_2} \times V_{\text{EDTA}-\text{Na}_2} \times 1000$$

式中: $c_{\text{EDTA}-\text{Na}_2}$ 为 $\text{EDTA}-\text{Na}_2$ 浓度(0.0216 mol/L); $V_{\text{EDTA}-\text{Na}_2}$ 为滴定时所用 $\text{EDTA}-\text{Na}_2$ 量(mL);浸酸次数为横坐标,对应浸酸次数结束后 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 总的浸出率为纵坐标,作图得浸酸曲线,从曲线上确定所需浸酸时间次数条件。

1.3.2 凝胶强度测定方法 将制得的明胶配制成质量分数为 6.67%胶液,取 10 mL 胶液分装于内径 2.7 cm 的圆形玻璃瓶中,在(10±0.1) °C 静置 16~18 h,用 TA-XT2i 质构仪采用 P5(直径 5 mm)探头压入 4 mm 测定其凝胶强度。

在这里将前两道胶合并作为前道胶,第三道胶作为后道胶,四五道胶因其产率低质量差而不作为提胶指标。

2 结果与讨论

2.1 浸酸条件的单因素实验

从鱼骨中提取明胶过程中的浸酸除盐条件对明胶产率和质量都有较大影响。由于骨中的胶原和羟基磷灰石结合较紧密,直接提胶非常困难,而且 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的存在对明胶性质也有影响,所以利用盐酸除盐既有利于其后的酶反应和提胶操作,又可以避免金属离子影响明胶产品质量。作者分别研究浸酸浓度、液料比对除盐率、明胶产率和凝胶强度的影响。

2.1.1 盐酸浓度对明胶制备的影响 分别选用 0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L HCl 于 20 °C 对鱼骨浸酸除盐处理,盐酸浓度对除盐效果、明胶产率和凝胶强度的影响见图 1 和表 2。

浸酸的主要目的是使盐酸将磷酸钙中的钙溶出又不影响明胶产品的质量,由图 1 可以看出盐酸浓度从 0.6~1.0 mol/L 浸酸 4 次都能较完全的除盐,比 0.4 mol/L 浸酸 5 次好。

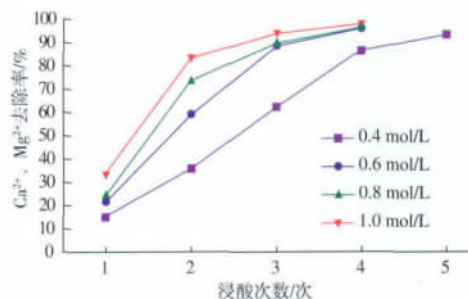


图 1 盐酸浓度对除盐效果的影响

Fig. 1 Influence on demineralization with different concentration of HCl

表 2 表明,0.6 mol/L~0.8 mol/L 盐酸处理能得到产率和凝胶强度的都很高的明胶。综合考虑明胶得率、品质和盐酸利用率,选用 0.6 mol/L 盐酸浸酸 4 次以除去骨中的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。

表 2 盐酸浓度对提取明胶产率和凝胶强度的影响

Table 2 Influence on gelatin yield and gel strength with different concentration of HCl

盐酸浓度/ (mol/L)	前道胶		后道胶	
	产率/%	凝胶强度/g	产率/%	凝胶强度/g
0.4	3.59±0.11	54.0±2.13	6.82±0.18	65.8±3.14
0.6	4.08±0.17	63.8±2.63	7.65±0.22	61.4±2.23
0.8	4.14±0.11	53.4±0.98	7.55±0.38	65.1±2.10
1.0	4.54±0.34	50.2±3.13	8.42±0.29	56.3±1.27

2.1.2 浸酸液料比对明胶制备的影响 浸酸液料比对除盐效果、明胶产率和质量的影响见图 2 和表 3。

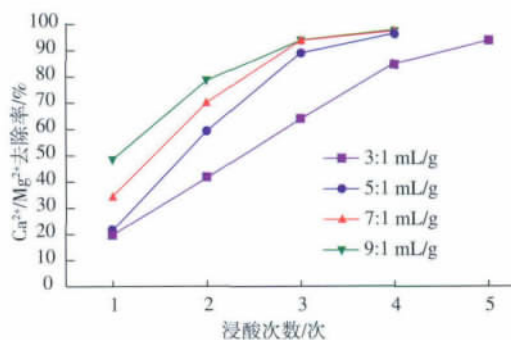


图 2 液料比对除盐效果的影响

Fig. 2 Influence on demineralization with different HCl - to- bone ratio

由图 2 可以看出,液料比从 5 mL/g 到 9 mL/g 浸酸 4 次后除盐率都较高。根据表 3,液料比为 5 mL/g 时得到的明胶产率和凝胶强度均较高。综合考虑选用液料比是 5 mL/g 的条件浸酸除盐。

表3 浸酸液料比对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Table 3 Influence on gelatin yield and gel strength with different HCl to- bone l ration

液料比/ (mL/g)	前道胶		后道胶	
	产率/%	凝胶强度/g	产率/%	凝胶强度/g
3	3.94±0.08	46.6±2.33	6.79±0.12	60.5±2.38
5	4.08±0.15	63.8±1.65	7.65±0.24	61.4±2.93
7	4.07±0.24	60.5±2.77	7.86±0.24	63.2±1.01
9	4.44±0.26	57.1±2.01	7.42±0.45	61.8±2.11

2.2 酶反应条件对明胶提取的影响 浸酸后得到的骨素主要是胶原,由于胶原分子之间以末端次级键相互交联使胶原分子比较稳定,不容易提胶。韩军曾用氢氧化钙悬浮液预处理骨素以提取明胶,但是需要处理 3~12 d 才能破坏胶原的次级键提取出明胶^[10]。碱处理不仅时间长还会产生大量工业废水,同时碱处理对胶原的作用不均匀,所以提取出的明胶相对分子质量分布也很广,对明胶品质有影响。胶原属于结构蛋白,普通的酶不能使其分解,只有高温、酸、碱或胶原酶才能使胶原发生分子内分解。胶原间的交联都是在胶原分子末端的 1/4 处,而木瓜蛋白酶的作用位点也在这一位置。作者选用木瓜蛋白酶代替碱处理步骤可以打开交联键且胶原分子不会分解,既有利于下一步的热水提胶又可以使明胶凝胶强度保持较高水平。

2.2.1 温度对提取明胶产率与凝胶强度的影响 反应温度对明胶提取的影响见图 3。酶溶液的温度适合,酶活高,有利于酶解的进行。温度过高,骨素受高温作用,明胶的品质下降。在温度为 50 ℃时能得到较高产率和品质的明胶。

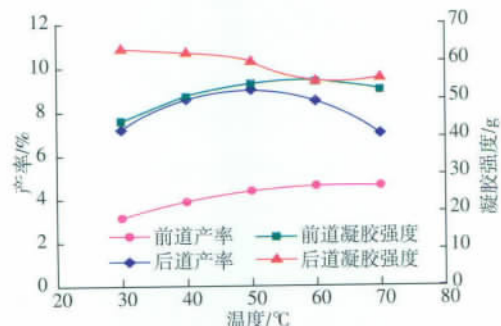


图3 温度对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Fig. 3 Temperature effect on gelatin yield and gel strength

2.2.2 pH 对提取明胶产率与凝胶强度的影响 酶解 pH 对明胶提取的影响见图 4。酶的最适 pH 为 6.5, pH 过高或过低对明胶的提取率和品质都有影响,过高提取率低,过低虽然提取率较大,但是明胶在低 pH 条件下品质较差。pH 是 5.5 时可以得到提取率和品质都较高的明胶。

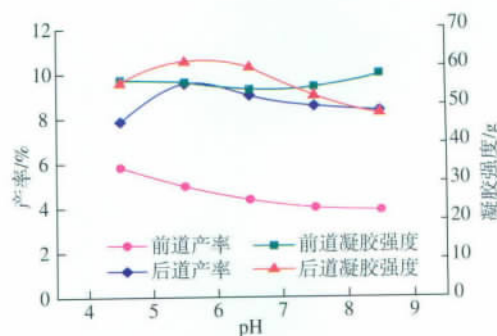


图4 pH 对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Fig. 4 Solution pH effect on gelatin yield and gel strength

2.2.3 时间对提取明胶产率与凝胶强度的影响 酶解反应时间对明胶提取的影响见图 5。反应时间适合可以充分的打开胶原的交联键,反应时间短酶解反应不充分,交联键打开的不完全明胶的提取率和品质都不高,反应时间长,酶解反应过度,胶原水解为小分子多肽,明胶品质下降。反应时间为 1 h 时可以得到产率和品质较理想的明胶。

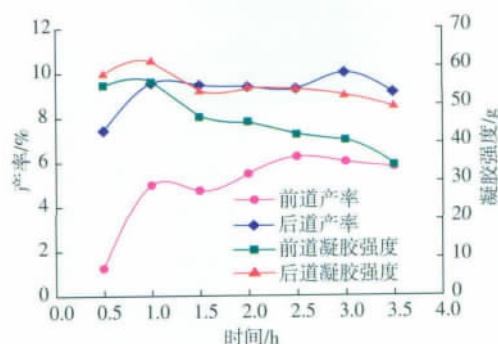


图5 时间对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Fig. 5 Time effect on gelatin yield and gel strength

2.2.4 液料比对提取明胶产率与凝胶强度的影响 液料比对明胶提取的影响见图 6。液料比小于 3 mL/g 时,反应液不能完全浸没鱼骨素,影响酶解反应进行。液料比大于 3 mL/g 时对明胶提取的影响不显著。

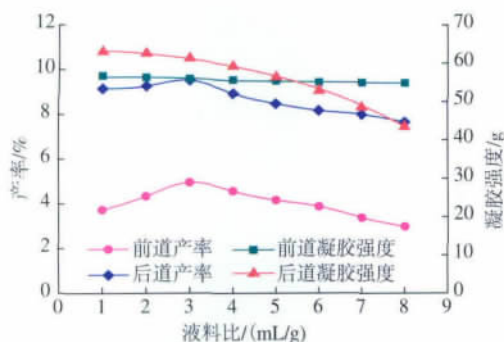


图6 液料比对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Fig. 6 Solution-to-bone ratio effect on gelatin yield and gel strength

2.2.5 加酶量对提取明胶产率与凝胶强度的影响
加酶量对明胶提取的影响见图7。加酶量对前后两道胶的产率影响不显著,前道胶的凝胶强度虽加酶量增大而逐渐升高,加酶量达到2 200 U/g后升高不明显,后道凝胶强度随加酶量增大而升高,当加酶量达到1 000 U/g时又逐渐降低。

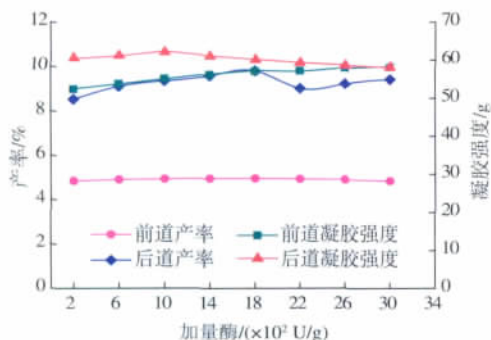


图7 加酶量对提取明胶产率与凝胶强度的影响

Fig. 7 Amount of protease effect on gelatin yield and gel strength

2.3 酶反应条件的优化实验

对各因素水平做均匀实验对提取明胶的各道产率和凝胶强度分析,确定酶反应的最佳条件,实验见表4。

将实验结果利用DPS数据处理软件得到回归方程:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_5X_5 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 + a_{55}X_5^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 - a_{14}X_1X_4 + a_{15}X_1X_5 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{25}X_2X_5 + a_{34}X_3X_4 + a_{35}X_3X_5 + a_{45}X_4X_5$$

回归模型分析见表5。回归方程显著,响应值Y相关系数 R^2 达到0.99以上,表明回归模型适用于酶处理代替浸灰法处理罗非鱼骨素制备明胶的理论预测。从表5中可以看出,一次项中, X_4 影响不显

著其它因素均显著;二次项中, X_1^2 影响显著;交互项中, X_2X_4 、 X_3X_4 、 X_3X_5 、 X_4X_5 影响显著。

表4 酶反应优化实验

Table 4 Optimizing Experiment of protease hydrolysis

实验号	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	综合评价指标(Y)
1	1	1	1	2	3	204.40
2	1	2	2	1	1	200.07
3	1	2	3	3	2	219.03
4	2	1	1	1	2	244.25
5	2	3	1	3	1	194.01
6	2	3	3	1	3	186.04
7	3	1	3	2	1	209.75
8	3	2	2	3	3	165.16
9	3	3	2	2	2	171.73

表5 均匀设计回归系数取值

Table 5 Regress models and factors value

系数	取值	系数	取值
a_0	227.208 54 ^a	$a_1^*a_2$	-3.832 58
a_1	47.364 95 ^a	$a_1^*a_3$	-0.419 36
a_2	-27.775 32 ^a	$a_1^*a_4$	-7.010 66
a_3	-58.706 90 ^b	$a_1^*a_5$	-4.760 38
a_4	-18.940 92	$a_2^*a_3$	2.265 25
a_5	43.796 06 ^b	$a_2^*a_4$	6.636 19 ^b
a_1^2	-4.862 73 ^b	$a_2^*a_5$	-0.224 72
a_2^2	3.134 70	$a_3^*a_4$	7.138 85 ^b
a_3^2	11.248 79	$a_3^*a_5$	-2.924 85 ^b
a_4^2	1.728 03	$a_4^*a_5$	-1.835 53 ^b
a_5^2	-6.699 98		
R^2	0.999 7		

注:a表示 $P \leq 0.01$,b表示 $P \leq 0.05$ 。

2.4 最优酶解条件的确定及验证

由回归方程得到最高指标时各因素组合为:温度46.5℃,pH 5.3,时间72 min,液料比3 mL/g,加酶量2 480 U/g,其综合评价指标理论值为269.40。实验测得最佳条件下的综合评价指标为265.43,与回归方程拟合结果非常接近。而且这时前后道胶产率和凝胶强度分别是4.63%、10.72%和61.3、67.3 g,结果较理想。

3 结 语

作者分别研究了浸酸除盐和酶解条件对明胶提取工艺的影响。研究表明,利用 0.6 mol/L 盐酸,液料比 1:5 浸泡 6 h,每 1.5 小时换酸液一次,能够较充分的除去骨中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (去除率 96.1%), 有利

于提胶,明胶质量又不会受影响;酶解条件为 46.5 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.3,酶解时间 72 min,液料比 3 mL/g,加酶量 2 480 U/g 能够得到产率和质量均较高的最终产品,与传统方法相比,本法生产周期大大缩短,环境污染小,具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 王卫东,李超,孙月娥. 鱼皮明胶的制备、特性及应用[J]. 食品科学,2009,30(23):484-488.
WANG Wei-dong, LI Chao, SUN Yue-e. Preparation, properties and applications of fish gelatin[J]. **Food Science**, 2009, 30(23): 484-488. (in Chinese)
- [2] 张锋,施辉阳,张鹏. 酶法制备明胶的新工艺研究[J]. 北京化工大学学报,2003,30(1):9-12.
ZHANG Feng, SHI Hui-yang, ZHANG Peng. A new process for preparation of gelatin with enzyme [J]. **Journal of Beijing University of Chemical Technology**, 2003, 30(1): 9-12. (in Chinese)
- [3] 宋小岩,黄雅钦,黄明智. 酶法制胶工艺研究[J]. 化工科技,2003,11(3):1-3.
SONG Xiao-yan, HUANG Ya-qin, HUANG Ming-zhi. Study on the enzymatic processing technology for gelatin[J]. **Science and Technology in Chemical Industry**, 2003, 11(3): 1-3. (in Chinese)
- [4] 刘海英,何磊,过世东. 用差示扫描量热法分析明胶品质[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):1-4.
LIU Hai-ying, HE Lei, GUO Shi-dong. A new assay method on quality of gelatin with small sample size using DSC [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 1-4. (in Chinese)
- [5] C S Cheow, M S Norizah, Z Y Kyaw, et al. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) [J]. **Food Chemistry**, 2007(101): 386-391.
- [6] J H Muyonga, C G B Cole, K G Duodu. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin[J]. **Food Hydrocolloids**, 2004(18): 581-592.
- [7] 刘海琴,赵利,刘建涛,等. 盐酸溶液液料比及浓度对鳗鱼骨中钙溶出的影响[J]. 食品科技,2009,22-24.
LIU Hai-qin, ZHAO Li, LIU Jian-tao, et al. demineralization. The effect of HCl solution ratio to eel bone and HCl solution concentration for dissolve calcium from eel bone[J]. **Food Science & Technology**, 2009, 22-25. (in Chinese)
- [8] 金良超. 正交设计与多指标分析[M]. 北京:中国铁道出版社,1988:11-52.
- [9] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:615-624.
- [10] 韩军,袁信华,过世东,等. 从斑点叉尾鲷鱼头中提取明胶的预处理工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(12):88-93.
HAN Jun, YUAN Ain-hua, GUO Shi-dong, et al. Study on effects of pretreatment technology on the gelatin extracted from channel catfish head[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2007, 33(12): 88-93. (in Chinese)
- [11] Koli, J M. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger-toothed croaker (*Otolithes ruber*) and pink perch (*Nemipterus japonicus*) [J]. **Food Bioprod Process**, 2011: 2-8.
- [12] Rafik Balti, Mourad Jridi, Assaad Sila, et al. Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process[J]. **Food Hydrocolloids**, 2011(25): 943-950.
- [13] Jan Arne Arnesen, Asbjorn Gildberg. Extraction of muscle proteins and gelatine from cod head [J]. **Process Biochemistry**, 2006(41): 697-700.
- [14] A A Karim, Rajeev Bhat. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins [J]. **Food Hydrocolloids**, 2009(23): 563-576.
- [15] 钱飞,刘海英,过世东. 木瓜蛋白酶水解克氏原螯虾壳提取虾青素的研究[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(2):237-243.
QIAN Fei, LIU Hai-ying, GUO Shi-dong. The application of papain in astaxanthin extraction from crayfish shell [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(2): 237-243. (in Chinese)