

高压脉冲电场辅助酶法提取鹿托盘胶原蛋白

姜 薇^{1*}, 金声琅¹, 殷涌光²¹黄山学院旅游学院, 黄山 245041; ²吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022

摘要: 为了提高鹿托盘中胶原蛋白的提取率, 采用高压脉冲电场技术辅助胃蛋白酶的方法提取胶原蛋白。以胶原蛋白提取率为指标, 通过对胃蛋白酶添加量、脉冲数和电场强度进行单因素考察, 采用正交实验对胶原蛋白提取条件进行优化。优选出鹿托盘胶原蛋白的最佳提取条件为: 胃蛋白酶添加量 2%、脉冲数 8、电场强度 20 kV·cm⁻¹, 在该条件下鹿托盘胶原蛋白的提取率可达到 (73.27 ± 0.73)%。与普通酶法相比, 高压脉冲电场辅助提取胶原蛋白的得率比普通酶法提高了 10.34%, 且处理时间较短。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明所提取的胶原蛋白由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 β -亚基组成, 结构特征表明胶原蛋白具有完整的螺旋结构和 I 型胶原蛋白的特性。该研究可为高压脉冲电场用于胶原蛋白的提取提供理论参考。

关键词: 鹿托盘; 胶原蛋白; 高压脉冲电场; 正交实验

中图分类号: R284.2; TS251.92

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.019

Optimization of Extraction of Pepsin-soluble Collagen from Antler Base Assisted by High Intensity Pulsed Electric Fields

JIANG Wei^{1*}, JIN Sheng-lang¹, YIN Yong-guang²¹College of tourism Huangshan University, Huangshan 245041, China;²College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China

Abstract: In order to find out the optimal extraction conditions of collagen from antler base, high intensity pulsed electric fields (PEF)-assisted pepsin methods were applied in this study. With the collagen withdrawal rate as the evaluation indicator, the effects of pepsin content, pulse number and electric field strength on extraction of collagen were studied, and the orthogonal test was designed to optimize the extraction conditions. The optimal collagen extraction conditions were determined: pepsin content 2%, pulse number 8 and electric field strength 20 kV·cm⁻¹, and the withdrawal rate of antler base collagen was (73.27 ± 0.73)%. Compared with enzymatic methods, PEF-assisted extraction was less time-consuming with higher extraction efficiency. The result of SDS-PAGE confirmed that the subunits structure of pepsin-soluble collagen from antler base using PEF was mainly of $\alpha 1$, $\alpha 2$ and β . The collagen from antler base greatly maintained the characteristics of type I collagen and with intact triple helix structure. This design can provide some reference to the extraction of collagen by PEF.

Key words: antler base; collagen; high intensity pulsed electric fields; orthogonal test

胶原蛋白在动物有机体中含量丰富且分布较广, 尤其在骨骼、皮肤和血管等组织中。胶原蛋白可被广泛的使用于医药材料、化妆品、食品和生物肥料等很多领域^[1]。目前主要从家畜、家禽(如牛、猪、兔、鸡等)以及水产鱼类的骨和皮等中提取胶原蛋白^[2], 由于各类禽流感病毒和疯牛病的屡次发生,

以及各类水域遭受污染, 用这类原料制备的胶原蛋白的安全性令人有所顾虑。鹿托盘含有丰富的胶原蛋白, 且作为中药料已有数千年, 具有安全的可食用性。

胶原蛋白是由两条 α 链和一条 β 链互相缠绕成三螺旋结构, 胶原蛋白的两端是非螺旋结构的端肽, 它们彼此结合形成抗原性结构^[3]。在制备胶原蛋白时, 需破坏胶原蛋白三螺旋结构两端的具有抗原性的部分, 将其拆分成三条单独的胶原多肽链。在提取过程中, 胶原蛋白的完整性很容易受外界环境的影响而遭到破坏, 一般都仅限于低温长时间提

收稿日期: 2018-01-08 接受日期: 2018-03-21

基金项目: 校级人才启动项目(2015xskq003); 安徽省教育厅自然科学基金研究项(KJ2014A243); 高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016304); 校级科研平台建设项目(kypt201811)

* 通信作者 Tel: 86-013955969095; E-mail: jlu_jw@163.com

取^[4]。在低温条件下胃蛋白的活性较低,从而降低了胃蛋白酶对胶原蛋白的消化,增加消化时间。Lin 等利用胃蛋白酶提取鸟掌胶原蛋白的消化条件为 12 ℃ 反应 24 h^[5]。高压脉冲电场(High intensity pulsed electric fields, PEF)是新兴的非热食品加工技术,具有处理温度低、耗时短、高效、低能耗等优良特性^[6,7]。Ho 等人研究表明,胃蛋白酶经电场强度 10 ~ 15 kV·cm⁻¹、脉冲宽度 30 μs 处理后活性可增加 2.6 倍^[8]。

本研究以鹿托盘为原料,采用超高脉冲电场辅助胃蛋白酶提取鹿托盘胶原蛋白。通过考察单因素和正交实验对鹿托盘胶原蛋白提取条件进行优化,旨在缩短提取时间和提高胶原蛋白的提取率,不仅为胶原蛋白的提取提供一种快速、高效的新技术,也为鹿产业发展提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鹿托盘,长春市中韩动物研究所提供;NaOH、Ethanol、NaCl、HCl:分析纯,北京化工厂;SDS、Tris、TEMED、(NH₄)₂S₂O₈、C₃H₅NO 等:分析纯,KBr(光谱纯),国药集团化学试剂有限公司;Pepsin(1:10000):酶活 800 ~ 2500 U/mg,ALDRICH Chemical CO.。

高压脉冲电场,实验室自制^[9];D-37520 型高速冷冻离心机,德国 Osterode Kendro Laboratory ;T9 紫外可见分光光度计,购于北京普析通用仪器有限责任公司;XS603S 电子天平,瑞士梅特勒托利多公司;DC801 真空冷冻干燥仪,购于重庆雅马拓有限公司;

Nicolet380 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet(尼高力)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 预处理

鹿托盘→脱去脂肪(用 20% 的乙醇处理,4 ℃ 浸泡搅拌 12 h,每 4 h 换 1 次液)→脱钙(0.5 mol/L 盐酸溶液处理,4 ℃ 浸泡搅拌 12 h,每 4 h 换一次液)→4 ℃ 去离子水清洗→除杂蛋白(用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液处理,4 ℃ 浸泡搅拌 12 h,每 4 h 换一次液)→4 ℃ 去离子水清洗→4 ℃ 贮藏备用。

1.2.2 鹿托盘胶原蛋白的提取单因素实验

取经 1.2.1 处理的鹿托盘加入 10 倍体积 0.5 mol/L 乙酸溶液(pH2.0),室温条件下,以流速 10 mL/min 流经高压脉冲电场处理室,分别考察不同电场强度(5、10、15、20、25 kV·cm⁻¹),脉冲数(2、4、6、8、10)和胃蛋白酶浓度(1、2、3、4、5%)对胶原蛋白提取率的影响。

提取液→离心(4 ℃,12000 × g,10 min)→上清液→灭酶(1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0,4 ℃ 放置 24 h)→离心→纯化(上清用 0.5 mol/L 乙酸溶液调 pH 至 3.5,加入氯化钠固体至 0.9 M,4 ℃ 放置 24 h)→离心→除杂(沉淀复溶于 0.5 mol/L 乙酸溶液)→离心→透析除盐(0.1 mol/L 乙酸溶液,4 ℃ 透析 24 h 中间换一次液)→真空冷冻干燥^[10]。

1.2.3 正交实验

根据单因素实验结果,以胶原蛋白提取率为评价指标,采用 L₉(3⁴) 正交实验,考察各因素对鹿托盘胶原蛋白提取率的影响,正交实验因素水平见表 1。

表 1 高压脉冲电场辅助提取胶原蛋白因素水平表

Table 1 The Factors and levels graph for PEF-assisted extraction of collagen from antler base

水平 Levels	因素 Factors		
	电场强度(A) Electric filed strength (kV·cm ⁻¹)	脉冲数(B) Pulse number	酶浓度(C) Pepsin content(%)
1	15	6	1
2	20	8	2
3	25	10	3

1.2.4 验证和比较实验

将试验条件调整为电场强度 20 kV·cm⁻¹,脉冲数为 8,胃蛋白酶 2%,添加十倍体积的乙酸溶液至 pH2.0,进行三次平行验证试验;再选择胃蛋白酶 2%,添加十倍体积的乙酸溶液至 pH2.0,参考 Lin

等方法^[5],采用普通酶法提取鹿托盘胶原蛋白进行比较实验。

1.2.5 胶原蛋白提取率的计算

具体方法参照文献^[11],提取物冻干粉中胶原蛋白的浓度计算公式如(1)所示,其中 H 代表羟脯氨

酸的浓度(mg/mL),20代表稀释的倍数,8代表变换系数;胶原蛋白的提取率如公式(2)所示,T代表胶原蛋白的质量(mg),P代表原料中总蛋白的质量(mg)。

$$\text{胶原蛋白浓度(mg/g)} = H \times 20 \times 8 \times 0.001 \quad (1)$$

$$\text{胶原蛋白提取率(\%)} = T/P \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

称取0.002 g鹿托盘胶原蛋白粉溶解于1 mL 0.2 mol/L磷酸缓冲溶液中(pH 7.2,含有1% SDS, 3.5 mol/L尿素),离心,取20 μL 胶原蛋白溶液加5 μL 的5x样品缓冲溶液,混合后煮沸5 min,取10 μL 上样。其中分离胶为7.5%,浓缩胶为5%^[12]。

1.2.7 红外光谱分析(FT-IR)

精确称取0.001 g鹿托盘胶原蛋白冻干品和0.15 g溴化钾固体(60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重)于玛瑙研钵中,将混合物研磨成粉并压片处理,用傅里叶变换红外光谱仪在400~4000 cm^{-1} 范围内扫描^[13]。

1.2.8 紫外光谱分析(UV-VIS)

称取0.004 g样品,用0.5 M醋酸钠缓冲溶液配成2 mg/mL的浓度,以醋酸钠溶液作为空白,在190~400 nm波长范围内进行扫描^[14]。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 电场强度对胶原蛋白提取率的影响

由图1中可以看出,鹿托盘胶原蛋白的提取率随着电场强度的增加急速上升,电场强度从5 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 上升到20 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$,胶原蛋白的提取率也从25%增加到了72%。而当电场强度增加到25 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,胶原蛋白的提取率反而降低至64.5%。高压脉冲电场对胶原蛋白提取率的影响主要有:物料在电场作用下细胞膜被击穿^[15],促使细胞内容物渗出,提高酶与底物的接触机会;适宜的电场强度能够改变胃蛋白酶的结构从而使其活性中心暴露出来,酶活性升高^[16];胶原蛋白三螺旋结构在适宜的电场强度下变的松弛,增加与酶的接触机会,加速酶解反应。从电泳图2中可以看出,25 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电场强度提取鹿托盘胶原蛋白的电泳条带比较模糊,可能是较高的电场强度破坏了胶原蛋白的分子结构,这一论证还需深入研究验证。

2.1.2 脉冲数对胶原蛋白提取率的影响

由图中3中可以看出,胶原蛋白的提取率随脉

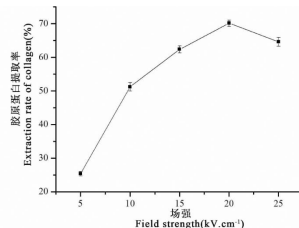


图1 电场强度对鹿托盘胶原蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effect of electric field strength on the extraction ratio of antler base collagen

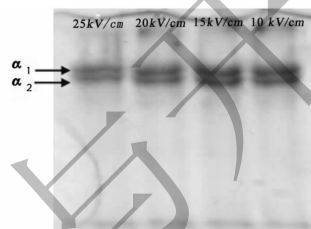


图2 电场强度对鹿托盘胶原蛋白电泳条带的影响

Fig. 2 Effect of electric field strength on electrophoresis band of antler base collagen

冲数从2到4呈直线上升趋势,从4增加到8时的提取率上升趋势相对变缓,而当脉冲数增加到10时的提取率反而有所下降。在进样流量不变的情况下,电场处理时间与电场的脉冲数呈正比,即脉冲数越大电场对样品的处理时间相对越长,随着脉冲数的增加胃蛋白酶的活性被破坏,而降低胃蛋白对胶

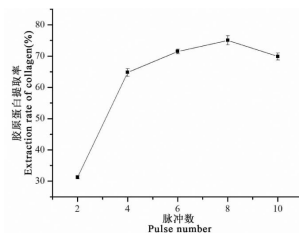


图3 脉冲数对鹿托盘胶原蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effect of pulse number on the extraction ratio of antler base collagen

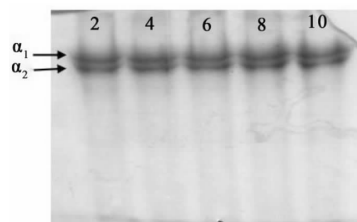


图4 脉冲数对鹿托盘胶原蛋白电泳条带的影响

Fig. 4 Effect of pulse number on electrophoresis band of antler base collagen

原蛋白的消解^[17]。从图4中可以看出,脉冲数对胶原蛋白 α_1 、 α_2 条带的完整性影响不大。综上所述,选择6、8、10三个脉冲数进行正交试验。

2.1.3 加酶量对胶原蛋白提取率的影响

由图5中可以看出,胶原蛋白的提取率在胃蛋白酶添加量1~2%区间内增加明显,而当酶浓度大于2%时,提取率的变化趋于平缓,这可能是提高胃蛋白酶浓度,会加剧胶原非螺旋结晶区的破坏,促使胶原结构的过度降解^[18],图6可以验证这一结果,当胃蛋白酶的浓度超过3%时,胶原蛋白分子被过度降解成多肽。从胶原蛋白三条多肽链的完整性和

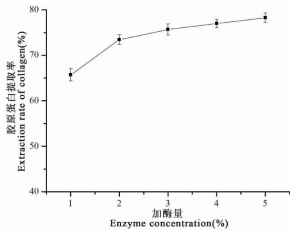


图5 加酶量对鹿托盘胶原蛋白提取率的影响

Fig. 5 Effect of pepsin content on the extraction ratio of antler base collagen

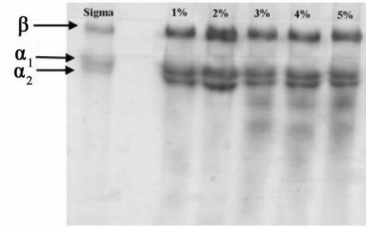


图6 加酶量对鹿托盘胶原蛋白条带的影响

Fig. 6 Effect of pepsin content on the electrophoresis band of antler base collagen

经济角度考虑,选择1、2和3%三个胃蛋白酶浓度进行正交试验。

2.2 正交试验结果与分析

$L_9(3^4)$ 正交实验结果及方差分析见表2、3。从表2可知,各因素的R值大小可以用来表示对胶原蛋白提取率的影响,即 $A > C > B$,即电场强度的影响最大,其次是胃蛋白酶浓度和脉冲数,其中电场强度对胶原蛋白的提取率具有显著性影响。通过K值得出胶原蛋白的最佳提取条件是 $A_2B_2C_2$,即电场强度 $20 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、脉冲数8、胃蛋白酶浓度2%。

表2 高压脉冲电场辅助提取胶原蛋白正交实验表

Table 2 Data and analysis of orthogonal test for PEF-assisted extraction of collagen from antler base

编号 No.	A: 电场强度 Electric filed strength ($\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$)	B: 脉冲数 Pulse number	C: 酶浓度 Pepsin content (%)	胶原蛋白提取率 Collagen withdrawal rate (%)
1	1	1	1	52.36
2	1	2	2	62.24
3	1	3	3	59.11
4	2	1	2	71.56
5	2	2	3	75.32
6	2	3	1	61.48
7	3	1	3	59.50
8	3	2	1	57.75
9	3	3	2	61.20
K_1	173.71	183.42	171.59	
K_2	208.36	195.31	195	
K_3	178.45	181.79	193.93	
R	9.97	3.9633	7.4467	

2.3 验证实验

为了进一步考察优化的胶原蛋白提取工艺的可靠性和稳定性,对优化工艺条件:胃蛋白酶浓度2%、电场强度 $20 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 和脉冲数8进行三次平行

实验,得到的胶原蛋白提取率分别为72.56%、73.23%、74.02%,平均值为73.27%,RSD为0.81%。验证实验表明,优化提取工艺稳定性较高。

表 3 方差分析
Table 3 Variance analysis

方差来源 Source	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 R-square	F 值 F-value	显著性 Significant
A	235.2998	2	117.65	35.72	**
B	36.3133	2	18.16	5.51	-
C	116.4721	2	58.24	17.68	*
D(误差)	6.5874	2	3.29	-	-

注: $F > F_{0.1}(2,2) = 9.00$, 表示显著差异 (*); $F > F_{0.05}(2,2) = 19.00$, 表示极显著差异 (**).

Note: *, ** mean significant different at 0.1 and 0.05 level, respectively.

表 4 鹿托盘胶原蛋白两种制备方法的比较
Table 4 Comparison of two preparation methods of antler base collagen

方法 Method	处理时间 Processing time	胶原蛋白得率 Extraction of collagen (%)
高压脉冲电场辅助提取 PEF assisted extraction	4.7 μ s	73.41
酶法 ^[13] Enzymic method	24 h	66.53

2.4 胶原蛋白提取方法比较

从表 4 可以看出, 高压脉冲电场辅助制备的鹿托盘胶原蛋白的提取率比普通酶溶法提高了 10.34%, 而其处理时间仅为 4.7 μ s, 远低于普通酶法提取的 24 h。高压脉冲电场辅助胃蛋白酶制备鹿托盘胶原蛋白不仅可以大大缩短处理时间, 还可以提高胶原蛋白的提取率。

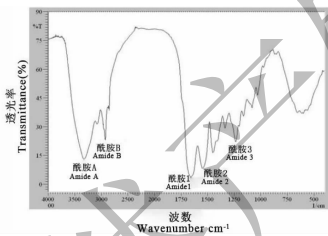


图 7 鹿托盘胶原蛋白傅里叶红外光谱分析

Fig. 7 Fourier infrared spectroscopy of antler base collagen

2.5 红外光谱分析

从图 7 可以看出, 制备的鹿托盘胶原蛋白在 3400 cm^{-1} 附近处有一个酰胺 A (Amide A) 带, 表明胶原蛋白的氢键含有 NH 基团。2900 cm^{-1} 附近有一个酰胺 B (Amide B) 带, 表明胶原蛋白中 CH_2 的不对称拉伸。另外, 酰胺 1 (Amide 1) 出现在 1650 cm^{-1} 处, 表明存在与胶原蛋白二级结构有密切关系的 $\text{C}=\text{O}$ 拉伸的吸收带。酰胺 2 (Amide 2) 出现在 1530 cm^{-1} 附近, 酰胺 3 (Amide 3) 出现在 1240 cm^{-1} 附近, 体现了胶原蛋白的螺旋结构^[19]。

2.6 紫外光谱分析

胶原蛋白具有羰基、酰胺和羧基等发色基团, 使其可以在 200 ~ 400 nm 紫外光区产生特征吸收峰, 但胶原蛋白中含有的苯环共轭双键的氨基酸如色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等含量较少, 导致其吸收峰偏离 280 nm, 以此可以用来鉴定胶原蛋白分子^[20]。由图 8 可以看出, 鹿托盘胶原蛋白溶液的在 280 nm 处无强吸收峰, 其最大吸收峰在 226 nm 处, 表明提取的鹿角冒胶原蛋白的纯度较高, 其相似于 I 型胶原蛋白的特征吸收峰。

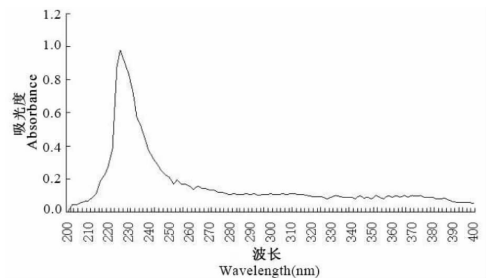


图 8 鹿角冒胶原蛋白的紫外光谱分析

Fig. 8 UV spectra of antler base collagen

3 结论

为了提高鹿托盘中胶原蛋白的提取率, 本研究采用高压脉冲电场技术辅助胃蛋白酶的方法提取胶原蛋白。通过对胃蛋白酶添加量、脉冲数和电场强度进行单因素考察, 建立了 $L_9(3^4)$ 正交实验对胶原

蛋白提取条件进行优化。优选出鹿托盘胶原蛋白的最佳提取条件为:胃蛋白酶添加量 2%、脉冲数 8、电场强度 $20 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 在该条件下鹿托盘胶原蛋白的提取率可达到 $(73.27 \pm 0.73)\%$ 。与普通酶法相比,高压脉冲电场辅助提取胶原蛋白的得率比普通酶法提高了 10.34%,且处理时间较短。聚丙烯凝胶电泳表明所提取的胶原蛋白由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 β 亚基组成,亚基结构完整。结构特性分析表明所提取的胶原蛋白具有完整的螺旋结构,且保持了 I 型胶原蛋白的特征。综上所述,高压脉冲电场可以用来辅助提取鹿托盘胶原蛋白,不仅可以提高提取率缩短提取时间还可以保持胶原蛋白的完整性。

参考文献

- Voicu G, Geanaliu-nicolae RE, Pirvan AA, *et al.* Synthesis, characterization and bioevaluation of drug-collagen hybrid materials for biomedical applications[J]. *Int J Pharm*, 2016, 510:474-484.
- Feng JH(冯建慧), Wu XS(吴晓洒), Cai LY(蔡路昀), *et al.* Extraction and characterization of collagens from skin and bone of silver Carp[J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报), 2017, 17:102-108.
- Lin YK, Lin TY, Su HP. Extraction and characterization of telopeptide-poor collagen from porcine lung[J]. *Food Chem*, 2011, 124:1583-1588.
- Nomura Y, Sskai H, Ishii Y, *et al.* Preparation and some properties of type I collagen from fish scales[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1996, 60:2092-2094.
- Lin YK, Liu DC. Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet[J]. *Food Chem*, 2006, 94:621-625.
- Zhao W, Tang YL, Lu LX, *et al.* Review: Pulsed electric fields processing of protein-based foods[J]. *Food Bioprocess Tech*, 2014, 7:114-125.
- Bao NN(鲍妮娜). Optimization of PEF-assisted organic solvent extraction of lecithin from sika deer velvet antler slag [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:1983-1988.
- Ho SY, Mittal GS, Cross JD. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes[J]. *J Food Eng*, 1997, 31(1):69-84.
- Zhao WQ(赵武奇), Yin YG(殷涌光), Guan W(关伟), *et al.* Experimental study on a food pasteurization system by using a high voltage pulsed field[J]. *Trans Chin Soc Agri Mach*(农业机械学报), 2002, 33(3):67-69.
- Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. *Food Chem*, 2010, 120:817-824.
- Kimura S, Miura S, Park YH. Collagen as the major edible component of jellyfish (*Stomolophus nomurai*) [J]. *J Food Sci*, 1983, 48:1758-1760.
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227:680-685.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 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 Chem*, 2004, 86:325-332.
- Zhang Q(张强), Wang QQ(王倩倩), Lu JF(陆剑锋), *et al.* Comparison of physical and chemical characteristics of collagen from silver carp skin using different extraction methods[J]. *Mod Food Sci Tech*(现代食品科技), 2014, 30:104-110.
- Wei HC(韦汉昌), Wei QL(韦群兰), Wei SQ(韦善清). Extracting Collagen from Pigskin by PEF [J]. *Guangxi Sci*(广西科学), 2011, 18:235-237.
- Su MH(苏明皓). The permeable mechanism and research of cell membrane under pulse electrical field [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology(天津理工大学), 2005.
- Liu WJ(刘唯佳). Research on extract of water-soluble protein of antler velvet and the comprehensive utilization of antler velvet [D]. Changchun: Jilin University(吉林大学), 2013.
- Wang XM(王雪蒙), Yu W(于玮), Ma L(马良), *et al.* Optimization of extraction process for rabbit-skin collagen and identification of its structure[J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2016, 42:209-213.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 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 Chem*, 2004, 86:325-332.
- Lin L(林琳). Studies on preparation of collagen and bioactivities of collagen polypeptide from the skins of aquatic animals [D]. Tsingtao: Ocean university of China(中国海洋大学), 2006.