

# 畜禽角蛋白变性降解方法的研究进展

乌拉木别克·对谢喀德尔,刘斯汝,杨许花,诺如·以扎·诺丁,陈士恩\*,丁功涛\*

<sup>1</sup>西北民族大学 生物医学研究中心中国-马来西亚国家联合实验;<sup>2</sup>西北民族大学生命科学与工程学院,兰州 730030

**摘要:**每年都会产生数以百万计吨的羽毛,牛角,羊角等好多废弃物严重的环境污染。不溶性,高硬度和顽固性的结构废弃物降解是艰难的角蛋白的多肽,由于具有较高的机械稳定性和交联二硫化物键而存在于其中结构,角蛋白不易被普通蛋白酶和化学物质催化剂降解。这些废物需要大量的土地储存,维护,排放控制,灰分处理和污染空气和地下水的风险。本综述重点介绍了角蛋白溶解的各个方面,角蛋白变性处理的影响之后对角蛋白酶解条件和酶解效果产量的影响。使他们成为一种绿色和可持续的工业应用材料在废物管理方面,纺织,皮革和洗涤剂比传统的有优势还讨论了治疗方法。

**关键词:**畜禽废弃物;角蛋白;蛋白质变性;角蛋白降解

中图分类号:Q51

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0172-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.025

## Research progress on degeneration and degradation methods of livestock and poultry keratin

Ulamubek · duiSheikhdale, LIU Si-ru, YANG Xu-hua, Nurul · Izza · Nordin, CHEN Shi-en\*, DING Gong-tao\*

<sup>1</sup>China-Malaysia National Joint Laboratory,

<sup>2</sup>Biomedical Research Center, College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China

**Abstract:** The slaughterhouse generates millions of tons of wastes such as feathers, horns and horns each year. These wastes require a lot of land for storage, ash treatment and emission control which pose a serious risk of pollution to the air and groundwater in the environment. The keratin in feathers, horns, horns wastes has the structural characteristics of insolubility and high mechanical stability. It is not easily degraded by ordinary proteases and chemical catalysts. The keratin is difficult to be degraded into polypeptides because the cross-linked disulfide bond exists in it. This review introduces various aspects of keratin solubilization, the effects of keratinase hydrolysis conditions and enzymatic hydrolysis after keratin denaturation treatment. Thus, the keratin waste from slaughter is developed and reused as green and sustainable industrial materials, which can be used in traditional textile, leather, washing and medical industries.

**Key words:** livestock waste; keratin; protein denaturation; keratin degradation

目前,我国是世界上农业废弃物产出量最大的国家,每年大约有40多亿吨,肉类加工厂(包括肉联厂、皮革厂和屠宰场)废弃物0.5~0.65亿吨,纺织厂的羊毛副产品以及屠场的角、趾甲,皮和羽毛等有机废物超过400万吨。综合利用率不足60%。我国农民将农业废弃物作为有机肥使用,在促进物质能量循环和培肥地力方面发挥了巨大的作用。但是,随着市场经济的发展,农业废弃物转化为有机肥

料面临一系列新的问题和严峻的挑战。

### 1 角蛋白研究概况

#### 1.1 角蛋白简介

角蛋白是一种特异的硬纤维蛋白,大多数角蛋白来源于外胚层组织特异性分化的细胞,是细胞内的结构蛋白,因此普遍存在于动物皮、发、蹄、角、爪、喙、羽、鳞、甲、丝及其他表皮特异性的结构中,起保护和支撑的作用。角蛋白是一种蛋白质,属于纤维和非营养硬蛋白,这是结缔组织的一个非常重要的结构蛋白<sup>[1]</sup>。角蛋白主要存在于哺乳动物的表皮、两栖动物、爬行动物和鸟类。角蛋白由于其特殊的分子结构近些年来通常借助角蛋白的良好的生物学

收稿日期:2020-03-30 接受日期:2020-06-17

基金项目:科技部对发展中国家科技援助项目(KY201501005);甘肃省国际科技合作项目(17YF1WA166)

\*通信作者 E-mail: chshien@163.com

特性,常会应用于发质损伤修复,组织器官的替代等作用<sup>[2]</sup>。角蛋白是皮肤和毛囊的主要蛋白质<sup>[3]</sup>。我国每年都会浪费掉许多的羊毛,但是这些没有得到充分利用的羊毛不仅会污染环境而且导致丰富的角蛋白资源的流失<sup>[4]</sup>,各类动物中尤其是毛量多的动物毛中富含角蛋白,可以将这些动物毛中的角蛋白应用于生物材料等中<sup>[5]</sup>。每年要处理掉来自于纺织厂的羊毛副产品,不适合纺纱的劣质原羊毛以及屠场的角、趾甲和羽毛等有机废物超过400万吨<sup>[6]</sup>。如果将这些废弃物丢弃,这不仅是一种浪费也是一种污染环境<sup>[7]</sup>。因此,随着近年来废羊毛产量的不断增加,国内外学者开始重视羊毛角蛋白的研究<sup>[8]</sup>,动物的废弃物中的角蛋白可以充分利用<sup>[9]</sup>。

## 1.2 角蛋白主要结构

角蛋白结缔组织的一个非常重要的结构蛋白。不同生物,不同个体甚至不同物种的角蛋白含量差异很大,高等脊椎动物上皮组织角蛋白含量高于植物<sup>[10]</sup>。

角蛋白分子的一级结构角蛋白分子链由19种的 $\alpha$ -氨基酸,不同的动物和植物不同组织中角蛋白分子的氨基酸序列不同。角蛋白的二级和三级结构是重复单元a或b中的高硫键和高硫键维持的,但它们不是这两个重复单元规则的方式排列的。这两个基本结构单元之间的相互作用可以产生十肽的衍生结构ab、a1b或a2b。有时a或b重复单元形成重复结构单元baba1或ba1aa包含19或20个氨基酸残基,其形式更为复杂<sup>[11]</sup>。在工业废水中,有一些种类重金属如铬(Cr)、锌(Zn)、汞(Hg)、铅(Pb)、砷(As)和镉(Cd)。其中,铬是最具毒性的污染物之一具有致癌性、急性毒性、致畸性和高机动性等特点在自然界中,主要是铬离子,以Cr(VI)和Cr(III)两种形式存在,化学性质和毒理性质有较大差异<sup>[12]</sup>。

角蛋白分子的二级结构:角蛋白主要是 $\alpha$ -螺旋或折叠构型的分子的二级结构,相应被称为 $\alpha$ -角蛋白和 $\beta$ -角蛋白。人发和羊毛中的角蛋白是 $\alpha$ -螺旋结构,而羽毛和某些鳞片中的角蛋白是 $\beta$ 折叠结构。羽毛角蛋白分子通过二硫键,氢键和其他交联后稳定。 $\alpha$ -角蛋白含有大量的半胱氨酸残基,在二级结构( $\alpha$ -螺旋)之间形成大量的二硫键。 $\alpha$ -角蛋白几乎所有的二级结构都是 $\alpha$ -螺旋结构,由纵向 $\alpha$ -螺旋并排构成<sup>[13]</sup>。

角蛋白的三级结构:角蛋白的 $\alpha$ -螺旋轻微缠

绕,称为超螺旋,形成二聚体,二聚体是微纤维的真实物理结构亚基,称为“分子对”。二聚体,位于上的螺旋杆区域的两侧中间的非螺旋的N末端和C末端的区域的,两条链相互交织成左手超螺旋,形成两条 $\alpha$ -螺旋的卷曲螺旋<sup>[14]</sup>。

## 1.3 角蛋白的主要应用

### 1.3.1 角蛋白的应用

饲料和食品工业羽毛角蛋白可作为优质饲料蛋白。利用角蛋白还可以生产氨基酸微量元素螯合剂,可与畜禽生长所必需的微量金属离子反应生成具有环状结构的配位化合物,提高微量元素的利用率。羽毛角蛋白中还含有丰富的谷氨酸,天冬氨酸等鲜味氨基酸,可以用来制作新型食品添加剂应用到食品加工工业中<sup>[15]</sup>。

制药研究发现,部分皮肤病是由真菌类物质产生的角蛋白酶渗透皮肤后引起的,利用这一特性可以进行治疗真菌类皮肤病药物的研制与开发<sup>[16]</sup>。复合角蛋白氨基酸溶液可以直接注入人体补充营养,替代部分人血浆。角蛋白中的胱氨酸有护肝作用,可以有效防止脂肪肝、肝硬化以及其他肝病,在治疗膀胱炎、脱发、中毒性病症等方面也有显著疗效<sup>[17]</sup>。

肥料及农药与环境保护处理后的羽毛粗粉中含有高达5%左右的氮源,可以用来生产液体氨基酸复合肥,作为动物性粪便的替代品,成为更廉价的肥料<sup>[18]</sup>。角蛋白水解制得的氨基酸及其衍生物,金属络合物对农作物具有杀菌防病和刺激生长的双重效果,可以用作杀菌剂、杀虫剂、除草剂和植物生长促进剂。水解羽毛制取复合氨基酸,并与碳酸钙反应制得复合氨基酸钙化合物,该化合物可以通过水解有机磷农药中的磷酸酯键降低作物中的农药残留。

制革业用羽毛水解产物对牛皮面革进行填充,可明显提高坏革的柔软度和伸长率,而对坏革的抗张强度,撕裂强度和染料的吸收率不产生明显影响<sup>[19]</sup>。经过适当的碱降解处理,可以将从羽毛获得蛋白质混合物用作鞋面革及服装革的填充材料,改善皮革的染色性能,并使革具有更好的弹性。另外,羽毛蛋白还可以用作铬革的复鞣剂<sup>[20]</sup>。

化妆品及其他行业羽毛角蛋白还可以制作化妆品。近年来,一些国家将角蛋白水解液作为一类新型天然化妆品原料,成功地用于洗发和护肤等化妆品的生产<sup>[21]</sup>。利用羽毛角蛋白制得棕榈酰缩氨酸,进一步制成洗面奶、护肤霜、口红等化妆品的湿润

剂。

## 2 角蛋白质变性处理研究概况

基于人类对蛋白质的需求,目前不仅需要充分利用现有的蛋白质资源,研究蛋白质的结构和性质,尤其是蛋白质的营养价值和功能性质,而且还应寻求新的蛋白质资源和开发利用蛋白质新技术<sup>[22]</sup>。

伴随着蛋白质变性,其构象发生改变,同时失去生物活性,影响蛋白质营养价值和功能性质。基于此,蛋白质变性的相关研究也显得非常重要。首先,蛋白质变性的研究对深入了解蛋白质的折叠与伸展、变性机理、结构稳定性及生命体的新陈代谢等问题具有很大参考意义<sup>[23]</sup>。其次,蛋白质变性的相关研究对防止和减缓蛋白质变性,对肉蛋类、海鲜、奶制品的保鲜具有重要意义。再次,有些情况下人们却希望避免蛋白质变性,如在蛋白质分离纯化过程中或有效保存蛋白质制剂(如疫苗等)时,以及在人工心肺机内循环的血液,食品等方面,应防止蛋白质变性<sup>[24]</sup>。

### 2.1 蛋白质变性方法

角蛋白立体结构紧密,不溶于水、盐液、稀酸或稀碱,通过变性改变分子内部结构和性质的作用,角蛋白的肽链主要是由 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -片层结构组成的,通过高度交联的二硫键、氢键和其他交联键的作用形成非常稳定的三维结构<sup>[25]</sup>。蛋白质变性后,分子结构松散,不能形成结晶,无肽键断裂,高级结构和空间构象被破坏,生物活性丧失。变性后蛋白质功能发生改变,由于肽链松散,面向内部的疏水基团暴露于分子表面,蛋白质分子溶解度降低并互相凝聚而易于沉淀,其活性随之丧失易被蛋白酶水解<sup>[26]</sup>。蛋白质变性过程中蛋白质分子构象变化只有天然和完全变性两种状态,能够引起蛋白质变性的因素有很多,可分为两种类型:一类是化学因素引起的变化,包括强酸、强碱、尿素、重金属盐、十二烷基硫酸钠(SDS)等;另一类是物理因素引起的,包括加热、加压、脱水、搅拌、振荡、紫外线照射、X射线和超声波的作用等<sup>[27]</sup>。在实验中可以采用不同的方法使蛋白质变性,最常用的方法为:用化学变性剂使天然蛋白质分子变性;通过对蛋白质溶液加热使蛋白质变性<sup>[28]</sup>。

### 2.2 蛋白质变性鉴定方法

蛋白质变性鉴定的方法有很多,主要表现在以下几个方面:

观察蛋白质的溶解性是否下降凝集。该方法最

为简单,但仅通过蛋白质是否沉淀,来判断蛋白质是否变性所得出的结论可能并不可靠<sup>[29]</sup>。

沉淀测定蛋白质(酶)的比活性,用几种方法提纯蛋白质,若得到相同而恒定的比活性,就可以认为,此蛋白质制剂是天然蛋白质。该方法是生物学中常用的方法,比活性测定可以用来追踪纯化蛋白质的变性程度。

测定蛋白质的抗原性是否改变,抗体能否与抗原专一性结合。

测定蛋白质化学性质的变化。侧链基团与专一试剂的反应性,测定蛋白酶对蛋白质的水解速度。

以天然蛋白质作对照,研究蛋白质分子的构象是否发生改变<sup>[30]</sup>。

紫外差示光谱法该方法首先要测定色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)或苯丙氨酸(Phe)的侧链(生色基团)的紫外差光谱。

旋光和圆二色性光谱法该方法可以确定蛋白质分子的结构,从而了解蛋白质结构在蛋白质变性时如何发生变化<sup>[31]</sup>。圆二色性可用来测定 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠片的含量。

荧光法作为一种传统的研究聚集体的方法,可以测定蛋白质分子的聚合与解离,抗原与抗体的反应机制,不同蛋白质分子相互作用等。在研究蛋白质结构变化方面它仅给出变性时剩余天然蛋白和各种变体芳香族氨基酸残基暴露的总情况。

激光拉曼光谱法该方法能够显示出蛋白质分子中肽键的特征性振动谱带,主链骨架的振动谱带,以及侧链的振动谱带,但仅能测定蛋白质分子的二级结构。

高效液相色谱法 HPLC 仅限于用色谱法判断蛋白质的构象是否发生变化。

色谱法蛋白质变性过程的色谱行为与其构象变化紧密相关,利用色谱法可直接观测蛋白质在变性过程中的热行为及影响因素<sup>[32]</sup>,不仅能够揭示蛋白质变性时的发色团的暴露情况,并且还可以确定蛋白质变性时形成变体的数目和大小,蛋白质展开的程度,剩余天然蛋白和各个变体表面的色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)或苯丙氨酸(Phe)分布情况<sup>[33]</sup>。

### 2.3 蛋白质变性后生物化学性质

蛋白质变性过程中,往往有如下特征:生物活性丧失,抗原性改变蛋白质的生物活性是指蛋白质所具有的酶、激素、霉素、抗原与抗体等活性,以及其他

特殊性质如红蛋白的载氧能力,肌球蛋白与肌动蛋白相互作用时的收缩能力等。生物活性的丧失是蛋白质变性的主要特征。有时空间结构只有轻微的局部改变,而且这些变化还没有反映到其他物理化学性质上时,生物活性就已经丧失<sup>[34]</sup>。

一些物理化学性质的改变旋光性改变,溶解度降低、沉降率升高、粘度升高、结晶能力消失、光吸收度增加等。例如,一般在等电点区域不溶解,分子相互凝集,形成沉淀。但在碱性溶液中,或有尿素、胍等变性剂存在时则仍可保持溶解状态,透析除去这些变性剂后,又可沉淀出来:球状蛋白质变性后,分子形状也发生改变,蛋白质分子伸展,不对称程度增高,反映在粘度增加,扩散系数降低,光吸收度增加等<sup>[35]</sup>。

蛋白质在变性时有些原来在分子内部包藏而不易与化学试剂起反应的侧链基团,由于结构的伸展松散而暴露出来。蛋白质变性后疏水基外露,分子结构伸展松散,官能团反应性增加,易被蛋白酶水解。变性蛋白质比天然蛋白质更易受蛋白水解酶作用,这就是熟食易于消化的道理。

### 3 角蛋白降解方法

随全世界家禽业的快速发展,家禽农产每年会将 70 多万吨羽毛作为废弃物没有充分利用。角蛋白废弃物经常的变性方法有物理法、化学法、微生物降解法。物理降解法;物理法主要是采用高温高压、超声、微波的方式破坏角蛋白内部的二硫键,使羽毛,角质水解成可溶、容易消化的蛋白质液体。化学降解法;主要是应用羽毛角蛋白对热、酸、碱和氧化还原剂比较敏感的性质,使用酸碱及氧化还原剂羽毛角蛋白破坏二硫键,使之变得更易被动物吸收利用微生物降解角蛋白的过程目前被认为是一个很效、省钱以及节约时间的方法,具有很强的应用前景。

### 4 角蛋白酶解产物的应用前景

角蛋白酶是一种主要由细菌、真菌、酵母等产生的角蛋白水解酶放线菌有报道指出角朊酶是最乐观的蛋白酶考虑带来绿色发展,因其在生物催化废物领域的前景回收,纺织和皮革工业。目前,商业市场和工业要求提高催化活性和优良的热性能角蛋白水解酶的稳定性。对于工业应用,角朊酶被认为是突出而有前途的胞外酶,由最高能力和最快速度产生菌株生长。

## 5 展望

我国作为产生数以百万计吨的羽毛、牛角、羊角等好多废弃物作为副产品较高的国家,在未来羊毛角蛋白应用上意义深远,可以满足人们对环保、可持续、无污染等要求上的满足。对于块状的羊毛角蛋白作为骨或其他组织的替代物;对于液体状角蛋白可以作为整理纺织品,浸渍衣物等;对于膜状角蛋白可以作为创可贴等医用材料等等具有很多用途还待去研究。

### 参考文献

- 1 Wang YT, et al. Research and analysis of antelope horns based on proteomics technology[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21:1045-1048.
- 2 Liu H. Extraction of protein from waste textile fiber and product development[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University(大连工业大学), 2014, 42.
- 3 Mei JX, et al. Anti-felting finishing of wool fabric based on modified protease[J]. J Textile Res(纺织学报), 2019, 40(6):74-79.
- 4 Zhao W, et al. Preparation method and application of waste wool powder and keratin[J]. Textile Ind Technol(轻纺工业与技术), 2013, 42(4):12-14.
- 5 Wang LJ. Study on the extraction and application of wool keratin[D]. Shanghai: Donghua University(东华大学), 2013.
- 6 Shu WX. Breeding of high-producing keratinase strains and research on its production[D]. Xianyang: Northwest A&F University(西北农林科技大学), 2017.
- 7 Gu ZH. Study on isolation, screening, molecular ecology and functional utilization of keratin degrading bacteria [D]. Guangzhou: South China Agricultural University(华南农业大学), 2016.
- 8 Xu JB, et al. Brief introduction of protein waste producing amino acid fertilizer[J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2014, 41(17):103-104.
- 9 Sun YY. Preparation, characterization and adsorption performance of keratin-based adsorbent[D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2016.
- 10 Tinoco A, et al. Ohmic heating as an innovative approach for the production of keratin films [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150:671-680.
- 11 Jia RD, et al. The molecular composition, extraction and application of keratin[J]. Chem Bull(化学通报), 2008(4): 265-271.
- 12 Jin X, et al. Preparation of keratin/PET nanofiber membrane and its high adsorption performance of Cr(VI)[J]. Sci Total

- Environ,2020,710:135546.
- 13 Safadi RA, et al. Cytokeratin 19 immunostain reduces variability in grading epithelial dysplasia of the non-keratinized upper aerodigestive tract mucosa [J]. *Head Neck Pathol*, 2020,14(1):183-191.
  - 14 Shibuya K, et al. Fugu, *Takifugu rubripes*, mucus keratins act as defense molecules against fungi [J]. *Mol Immunol*, 2019, 116:1-10.
  - 15 Pan HB, et al. Preparation of fermented protein feed rich in lysine and methionine and its milk cow milk production application [J]. *Anim Husb Vet Med (畜牧与兽医)*, 2012,44 (S1):137.
  - 16 Lin J, et al. Application value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and anti-keratin antibody detection in the diagnosis of rheumatoid arthritis [J]. *J Pract Clin Med (实用临床医药杂志)*, 2019,23(15):110-111.
  - 17 Fang SC, et al. Application of cytokeratin 19, sTREM-1 and CD64 in postoperative infection evaluation of colon cancer patients [J]. *Mod Pract Med (现代实用医学)*, 2019, 31: 1407-1408.
  - 18 Chen HY. Research on using keratin to prepare functional materials [D]. Tianjing: Tianjin University (天津大学), 2007.
  - 19 Sa RL, et al. Mechanism of extracting wool keratin by melting urea [J]. *Henan Agr Sci (河南农业科学)* 2020, 49: 174-180.
  - 20 Yu HP, et al. Phosphorylation of keratin 18 serine 52 regulates mother-daughter centriole engagement and microtubule nucleation by cell cycle-dependent accumulation at the centriole [J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153:307-321.
  - 21 Zhang F, et al. Study on the preparation of rabbit hair keratin conditioner and its hair care effect [J]. *J Textile Sci Eng (纺织科学与工程学报)*, 2018,35(1):137-141.
  - 22 Ding XS, et al. Prediction of protein denaturation temperature based on multilayer perceptron [J]. *Appl Res Comput (计算机应用研究)*, 2019, 36:2421-2423.
  - 23 Li TY, et al. Research progress of protein denaturation mechanism in foam separation process [J]. *Food Ind Technol (食品工业科技)*, 2018,39(18):330-335.
  - 24 Zhao XX. Conformational characterization of disulfide-rich proteins based on capillary electrophoresis-top-down-mass spectrometry [C]. Professional Committee of Mass Spectrometry of Chinese Chemical Society. Abstracts of the Third National Mass Spectrometry Academic Conference-Session 5: New Methods of Organic/Biological Mass Spectrometry (第三届全国质谱分析学术报告会摘要集-分会场5:有机/生物质谱新方法), 2017:60.
  - 25 Wu YC. Study on rheology and spinnability of keratin/cellulose blend solution using ionic liquid as solvent [D]. Zhengzhou: Zhongyuan University of Technology (中原工学院), 2015.
  - 26 Gan F, et al. Study on the rheological properties of wool keratin/1-butyl-3-methylimidazole acetate [J]. *J Zhongyuan Inst Technol (中原工学院学报)*, 2015, 26(1):39-43.
  - 27 Vuorinen E, et al. Sensitive label-free thermal stability assay for protein denaturation and protein-ligand interaction studies [J]. *Anal Chem*, 2020, 92:3512-3516.
  - 28 Kelleher CM, et al. The effect of protein profile and preheating on denaturation of whey proteins and development of viscosity in milk protein beverages during heat treatment [J]. *Int J Dairy Technol*, 2020, 73:494-501.
  - 29 He RP, et al. Construction of self-assembly system based on protein molecules [J]. *Chem Prog (化学进展)*, 2014, 26 (Z1):303-309.
  - 30 Jiang JX. Study on the effect of tea polyphenols on the protein biochemical and functional properties of frozen freshwater surimi [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2013.
  - 31 Lu T, et al. Effects of heating and ultrahigh pressure on protein denaturation and enzymatic hydrolysis of *Sinonovacula constricta* [J]. *Food Res Dev (食品研究与开发)*, 2013, 34 (1):8-12.
  - 32 Gao X. Control measures for protein discoloration and degeneration of freshwater fish surimi [J]. *Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学)*, 2012, 40(8):270-272.
  - 33 Feng YH, et al. Dielectric spectroscopy study on the denaturation process of protein in the inner egg white [J]. *J Kashgar Teach Coll (喀什师范学院学报)*, 2012, 33(3):35-36.
  - 34 Li MD, et al. The effect of denaturant on the free energy of protein unfolding [C]. Abstracts of the 29th Annual Meeting of the Chinese Chemical Society-Session 15: Theoretical Chemistry Methods and Applications (中国化学会第29届学术年会摘要集—第15分会:理论化学方法和应用), 2014:124.
  - 35 Li XP, et al. Changes of muscle tissue structure and protein biochemical properties during cold storage of *Penaeus chinensis* [J]. *Chin J Food Sci (中国食品学报)*, 2014, 14(5):72-79.