

顾璐萍, 张钰, 李俊华, 等. 挤压膨化协同酶解工艺制备蛋壳膜多肽及其抗氧化活性和组成分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 252–258. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060043

GU Luping, ZHANG Yu, LI Junhua, et al. Analysis on Antioxidant Activity and Composition of Eggshell Membrane Peptides Prepared by Extrusion and Enzymatic Hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 252–258. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060043

· 工艺技术 ·

挤压膨化协同酶解工艺制备蛋壳膜多肽 及其抗氧化活性和组成分析

顾璐萍^{1,2,3}, 张钰^{1,2,3}, 李俊华^{1,2,3}, 常翠华^{1,2,3}, 杨严俊^{1,2,3}, 苏宇杰^{1,2,3,*}

(1.食品科学与技术国家重点实验室(江南大学), 江苏无锡 214122;

2.国家功能食品工程技术研究中心(江南大学), 江苏无锡 214122;

3.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本文以蛋壳膜为研究对象, 采用挤压膨化协同酶解工艺制备壳膜多肽。以总氮回收率、D-葡萄糖醛酸提取量及抗氧化性为指标, 确定最佳工艺条件为: 挤压膨化温度 140 °C, 螺杆转速 100 r/min, 水分含量 20%, 酶解时间 6 h, 加酶量 12000 U/g, 温度 55 °C。在该条件下总氮回收率达 60.8%, D-葡萄糖醛酸提取量达 12.4 mg/g, 壳膜多肽的 ABTS 自由基清除率为 29.46% (0.1 mg/mL), OH 自由基清除率为 26.58% (5 mg/mL), Fe²⁺ 螯合能力为 50.25% (0.4 mg/mL), 细胞抗氧化活性达 65% (10 μg/mL)。相对分子质量分布结果表明壳膜多肽中主要成分为低聚肽 (252~2435 Da), 占 81.8%。氨基酸组成分析结果表明壳膜肽中 Asp 和 Glu 含量较高, 与抗氧化活性有关的氨基酸含量为 44.70 g/100 g 蛋白。因此, 蛋壳膜多肽有潜力作为天然抗氧化剂应用于食品、保健品或化妆品领域。

关键词: 挤压膨化, 酶解, 蛋壳膜多肽, 抗氧化活性

中图分类号: TS253.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)23-0252-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060043

本文网刊:



Analysis on Antioxidant Activity and Composition of Eggshell Membrane Peptides Prepared by Extrusion and Enzymatic Hydrolysis

GU Luping^{1,2,3}, ZHANG Yu^{1,2,3}, LI Junhua^{1,2,3}, CHANG Cuihua^{1,2,3}, YANG Yanjun^{1,2,3}, SU Yujie^{1,2,3,*}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.National Functional Food Engineering Technology Research Center, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

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

Abstract: In this study, the eggshell membrane peptides were prepared using a two-step process involved extrusion and enzymatic hydrolysis. The process parameters were determined by evaluation of the total nitrogen recovery, D-glucuronic acid yield and antioxidant activity. The optimum extrusion process were 140 °C (temperature), 100 r/min (screw rotation speed) and 20% (moisture content). And the optimum conditions of enzymatic hydrolysis were 6 h (time), 12000 U/g (enzyme amount) and 55 °C (temperature). Under these conditions, the total nitrogen recovery and D-glucuronic acid yield were 60.8% and 12.4 mg/g, respectively. The ABTS, OH free radical scavenging ability and Fe²⁺ chelating ability of the shell membrane peptides were 29.46% (0.1 mg/mL), 26.58% (5 mg/mL) and 50.25% (0.4 mg/mL), respectively. And their cellular antioxidant activity reached 65% (10 μg/mL). Results on the molecular mass distribution indicated that the main components were oligopeptides (252~2435 Da), accounting for 81.8%. Analysis on the amino acid composition suggested a high level of Asp and Glu in the peptides, and the content of amino acids related with antioxidant activity was 44.70 g/100 g protein. And thus, the shell membrane peptides have great potentials as natural antioxidants in the field of food, healthy product and cosmetic.

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31901642)。

作者简介: 顾璐萍 (1989-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 蛋制品加工与研究, E-mail: gulongping@jiangnan.edu.cn。

* 通信作者: 苏宇杰 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋制品加工与研究, E-mail: suyujie@jiangnan.edu.cn。

Key words: extruding expansion; enzymatic treatment; eggshell membrane peptides; antioxidant activity

中国每年产生约 400 万吨蛋壳,目前主要作为废弃物处理,造成环境污染及巨大的资源浪费。蛋壳膜是紧贴蛋壳内壁的一层薄膜,含有丰富的蛋白质、黏多糖等成分,具有很高的营养价值^[1-2]。其中蛋白质以角蛋白为主,还含有胶原蛋白、溶菌酶、卵转铁蛋白、卵白蛋白等,种类丰富^[3];黏多糖主要为透明质酸和硫酸软骨素两种^[4],透明质酸被誉为最理想的天然保湿因子,具有极好的保湿作用,可抗皮肤衰老和皱纹的生成^[5];硫酸软骨素具有调节代谢、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等生理功能,如今已被用于风湿病、肾炎、消化性溃疡等疾病的临床医治^[6-8]。

尽管蛋壳膜具有很高的营养价值,但由于其主要成分为角蛋白,其分子中含有大量的二硫键,导致蛋壳膜的水溶性极差,仅为 5% 左右,限制其在食品中的应用^[9]。有文献报道,可采用酶解工艺来提高蛋壳膜的水溶性,在酶的作用下蛋壳膜蛋白分子链被切成分子量较小的肽段,与环境溶液中的水分子间作用力增强,水溶性增加^[10]。与蛋白质大分子相比,低分子量的生物活性肽在进入人体后更容易被吸收,且具有许多重要的生理活性,如抗氧化性、抗炎性、抗菌活性等^[11-12]。但由于蛋壳膜水溶性差,与酶作用的活性位点少,导致酶解反应耗时长、效率低。许多研究者有研究报道,可对蛋壳膜进行预处理以提高酶解效率,如使用强碱、有机试剂等,但这些预处理方法会给产品分离纯化及废水处理带来负担且存在安全隐患^[13-14]。目前蛋壳膜多肽产品主要采用强碱结合酶解工艺制备,但该产品风味不好,消费者接受度低。

挤压膨化是在短时高温高压和强剪切力的条件下作用于物料,使其结构和性质发生改变^[15],可用于各种蛋白质、多糖提取及酶法制备大豆多肽的前处理步骤^[16]。但挤压膨化工艺用于壳膜多肽的制备尚未见报道。

鉴于此,本文以蛋壳膜粉为原料,采用挤压膨化协同酶解工艺制备壳膜多肽,考察工艺条件对 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率的影响,并对蛋壳膜多肽的体外和细胞抗氧化性、分子量分布情况及氨基酸组成进行分析,以期为蛋壳膜多肽的开发与应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛋壳膜粉 黑龙江兴和生物科技有限公司;碱性蛋白酶(酶活力 2×10^5 U/g) 安琪酵母生物科技有限公司;还原性谷胱甘肽 国药集团化学试剂有限公司;ABTS 标准品、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、2,2'-偶氮(2-甲基丙基脒)(AAPH)、菲咯啉 SIGMA 公司;其他试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

FMHE 36-24 双螺杆挤压机 湖南富马科食品工程技术有限公司;K 9840 凯氏定氮分析仪 海能

仪器公司;Scientz-10 ND 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;UH 5300 紫外-可见分光光度计 天美科学仪器有限公司;Waters 600 高效液相色谱 美国 Waters 公司;Lapscale 研发型切向流超滤系统 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋壳膜多肽的制备

1.2.1.1 挤压膨化工艺优化 取适量蛋壳膜粉进行挤压膨化预处理,具体工艺参数为螺杆转速 100 r/min,水分含量 20%,温度 140 ℃。挤压膨化处理后,样品粉碎过 100 目筛,取 3 g 样品与碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH10)混合,固液比为 1:10 g/mL,振荡 3 h 后离心(6500 r/min, 20 min, 4 ℃),取上清,经 0.45 μm 滤膜过滤后,测定滤液中 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率。在此条件基础上,依次改变温度、螺杆转速和水分含量,对预处理条件进行优化。所选具体参数为温度:120、140、160 ℃,螺杆转速:80、100、120 r/min,水分含量:10%、20%、30%。以未经过挤压膨化处理的蛋壳膜粉作为对照组。

1.2.1.2 酶解工艺优化 预处理结束后,用 3 mol/L HCl 将 pH 调节至 10.0,加入 10000 U/g 碱性蛋白酶在 55 ℃ 下反应 6 h。酶解后,90 ℃ 下加热 2 min 灭酶,6000 r/min 离心 20 min,硅藻土过滤后再经 0.45 μm 滤膜微滤后,测定 D-葡萄糖醛酸提取量、总氮回收率和抗氧化活性,最后进行冷冻干燥(-50 ℃, 12 h)得到蛋壳膜多肽。在此条件基础上,依次改变时间、加酶量和温度,对酶解条件进行优化。所选具体参数为时间:2、4、6、8、10 h,加酶量:6000、8000、10000、12000、14000、16000 U/g,温度:45、50、55、60、65、70 ℃。

1.2.2 D-葡萄糖醛酸提取量的测定 蛋壳膜水解液中 D-葡萄糖醛酸提取量可用于衡量蛋壳膜中活性多糖的提取能力。透明质酸和硫酸软骨素均由固定比例的 D-葡萄糖醛酸组成,D-葡萄糖醛酸分子质量在透明质酸和硫酸软骨素中分别占 51% 和 42%,因此可用 D-葡萄糖醛酸含量间接表示透明质酸和硫酸软骨素的含量^[17]。D-葡萄糖醛酸提取量的测定参照 QB/T 4576-2013 透明质酸钠 唑啉-硫酸法。

1.2.3 总氮回收率的测定 总氮回收率是指蛋壳膜水解液中总氮含量占蛋壳膜粉总氮含量的比例,可用于衡量蛋壳膜中可溶性蛋白及多肽提取能力。蛋壳膜粉的蛋白质含量高达 78.86%,占干重的 88.88%。总氮含量的测定参照 GB 5009.5-2016 食品中蛋白质测定凯氏定氮法。

1.2.4 体外抗氧化活性的测定

1.2.4.1 ABTS 自由基清除率的测定 参照 Jun 等^[18]的方法并加以修改。ABTS 工作液是由 88 μL 过硫酸钾(2.6 mmol/L)和 5 mL ABTS 储备液(7.4 mmol/L)

混合,避光静置 12~16 h,在使用前用 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)稀释至 0.70 ± 0.02 。将样品分散在去离子水中至浓度为 (0.1 mg/mL) ,取 0.5 mL 样品溶液与 3 mL ABTS 稀释液混合,混匀 10 s 后室温避光静置 6 min 于 734 nm 处测吸光度。ABTS 自由基清除率的计算公式如式(1)所示,以去离子水作为对照组。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: $A_{\text{对照}}$ 为对照组的吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为样品组的吸光度值。

1.2.4.2 OH 自由基清除率 参照 Li 等^[19]的方法并加以修改。样品组试管中依次加入 1 mL PBS 缓冲液(pH7.4, 0.2 mol/L)、1 mL 2.5 mmol/L 邻菲咯啉溶液、1 mL 样品溶液(5 mg/mL)、1 mL 2.5 mmol/L FeSO_4 充分混合后,加入 0.5 mL 20 mmol/L H_2O_2 溶液混匀,37 °C 保温 60 min 后于 536 nm 处测吸光度。空白组中用去离子水代替样品溶液,对照组中用去离子水代替样品及 H_2O_2 溶液。OH 自由基清除率的计算公式如式(2)所示:

$$\text{OH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品组的吸光度值; $A_{\text{空白}}$ 为空白组的吸光度值; $A_{\text{对照}}$ 为对照组的吸光度值。

1.2.4.3 Fe^{2+} 螯合能力 参照 Zhu 等^[20]的方法并加以修改。样品组为 1 mL 样品(0.4 mg/mL)与 0.05 mL 2 mmol/L FeCl_2 、1.85 mL 去离子水、0.1 mL 5 mmol/L 菲咯啉溶液混匀,室温静置 10 min 后于 562 nm 处测吸光度,对照组为用去离子水代替样品。 Fe^{2+} 螯合能力的计算公式如式(3)所示:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合能力}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: $A_{\text{对照}}$ 为对照组的吸光度值; $A_{\text{样品}}$ 为样品组的吸光度值。

1.2.5 细胞抗氧化活性的测定 参照张晶等^[21]的方法,采用 CAA 方法评估壳膜多肽的细胞内抗氧化活性。具体操作如下:取对数生长期 HepG2 细胞按照 10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中,于 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h,移除培养基,加入 100 μL 样品溶液(含 25 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA),样品浓度为 1、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$,每组 6 个平行。培养 1 h 后,吸弃溶液,每孔加入 100 μL AAPH 溶液(600 $\mu\text{mol/L}$),立即置于酶标仪中读数,每 5 min 测定一次。激发波长为 538 nm,发射波长为 485 nm,仅加入培养基作为对照组。CAA 计算公式如式(4)所示:

$$\text{CAA}_{\text{unit}} = 1 - \frac{\int \text{SA}}{\int \text{CA}} \quad \text{式(4)}$$

式中: $\int \text{CA}$ 为对照组的曲线下积分面积; $\int \text{SA}$ 为样品组的曲线下积分面积。

1.2.6 分子量分布分析 色谱条件如下: Waters 600 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站);色谱柱: TSKgelG 2000 SW $\times$ L300 mm $\times$ 7.8 mm。流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 45/55/0.1(V/V);检测波长: UV 220 nm;流速: 0.5 mL/min;柱温: 30 °C。样品制备: 吸取样品 0.02 g 于 100 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,用微孔过滤膜过滤后进样。相对分子量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C(12500)、抑菌肽(6500)、杆菌肽(1450)、Gly—Gly—Arg—Tyr(451)、Gly—Gly—Gly(189)。

1.2.7 氨基酸组成分析 将 0.1 g 样品加入水解管中,加入 8 mL 6 mol/L HCl 溶液,在氮气保护下酒精喷灯上封口。110 °C 下反应 24 h 后,将冷却的水解液过滤,再用 0.02 mol/L HCl 溶液溶解,然后用去离子水定容至 50 mL,收集上清液 0.22 μm 过滤,采用氨基酸分析仪进行分析。

1.3 数据处理

每组数据至少采用 3 个平行,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 Prism 8 和 SPSS 22.0 软件进行数据分析及作图,多重比较之间的差异采用单因素方差分析和 Duncan 检验进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 挤压膨化工艺的确定

本文采用挤压膨化作为制备壳膜多肽的前处理步骤,目的是促进更多的蛋白质溶出,以利于后续的酶解工艺,从而获得壳膜多肽。由于黏多糖不是以游离状态存在于蛋壳膜中,而是与蛋白质相结合形成糖蛋白,在蛋白质溶出时,黏多糖也同时释放出来。因此,本文以总氮回收率和 D-葡萄糖醛酸提取量为指标,确定挤压膨化的最佳工艺。如图 1a 所示,挤压膨化处理可以显著提高总氮回收率和 D-葡萄糖醛酸提取量($P < 0.05$)。且总氮回收率随温度提高逐渐增加,超过 140 °C 后增加不显著($P > 0.05$),D-葡萄糖醛酸提取量先逐渐提高,140 °C 时达到峰值,随后又迅速降低。主要原因是高温可以使蛋壳膜中的角蛋白分子间或分子内二硫键断裂,从而提高蛋白的溶解性,并且释放出更多的黏多糖。但温度过高会破坏组织结构,使物料在套筒内焦糊并硬化,造成黏多糖提取量降低^[22]。

由图 1b 可知,螺杆转速提高使 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率逐渐增加并趋于平稳。随着螺杆转速的增加,物料在套筒内受到更大的挤压和剪切作用,加速角蛋白中二硫键的断裂,使蛋白和黏多糖溶出。当转速持续增加时,物料在套筒中滞留时间短,反应不充分,造成提取量提高不显著($P > 0.05$)^[23],故选择螺杆转速为 100 r/min。

从图 1c 可以看出,随着物料含水量的增加,葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率在含水量为 20% 时达到最大值;水分含量增加至 30% 时,葡萄糖醛酸提取量无显著变化($P > 0.05$),而总氮回收率反而下降。这

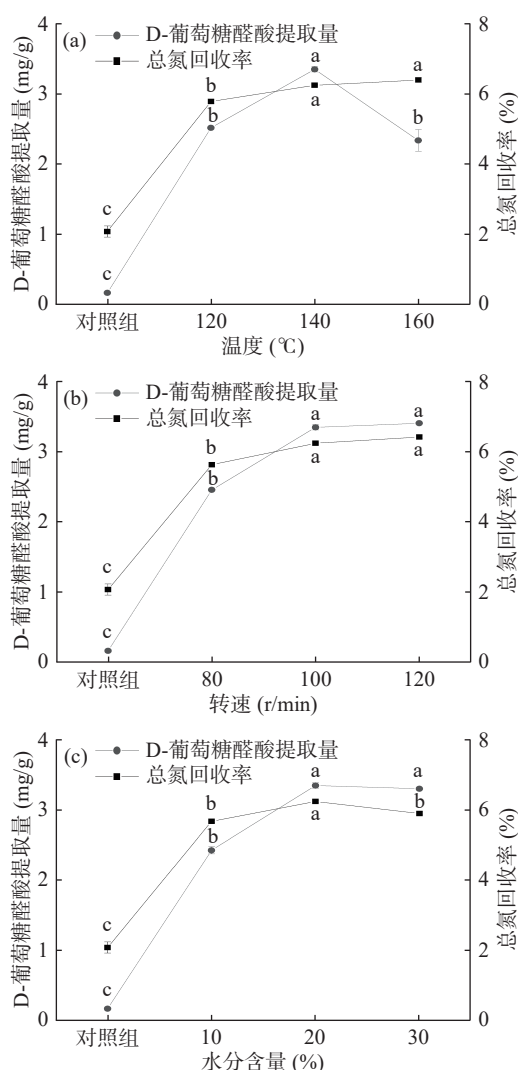


图 1 挤压膨化对蛋壳膜中 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率的影响

Fig.1 Effects of extruding expansion on D-glucuronic acid extraction amount and total nitrogen recovery

注: (a) 温度; (b) 转速; (c) 水分含量; 同一指标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 图 2~图 8 同。

可能是因为当含水量过低时, 物料在机器中易发生堵塞而无法顺利通过膜孔^[24]。适当的含水量可以使物料疏松并形成流体状态, 顺利通过膜孔。而含水量过高时, 物料在套筒内流动性加快, 造成剪切力降低, 挤压不充分, 总氮回收率下降^[25]。

综上所述, 挤压膨化的最佳工艺为温度 140 °C, 螺杆转速 100 r/min, 水分含量 20%, 此时 D-葡萄糖醛酸提取量为 3.34 mg/g, 总氮回收率为 6.25%。

2.2 酶解工艺的确定

2.2.1 不同酶解时间对蛋壳膜酶解效果的影响 如图 2 所示, 在酶解初期, D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率逐渐增加, 直到 6 h 后达到平衡, 总氮回收率无显著变化 ($P > 0.05$), D-葡萄糖醛酸提取量缓慢下降。此变化趋势与朱文婷等^[26]的研究结果一致, 当超过某个酶解时间后, 透明质酸被破坏降解, 得率降低。这可能是因为透明质酸长时间处于碱性环境下

容易被分解^[4]。因此, 酶解时间为 6~8 h 时, 蛋壳膜的酶解效果较好。

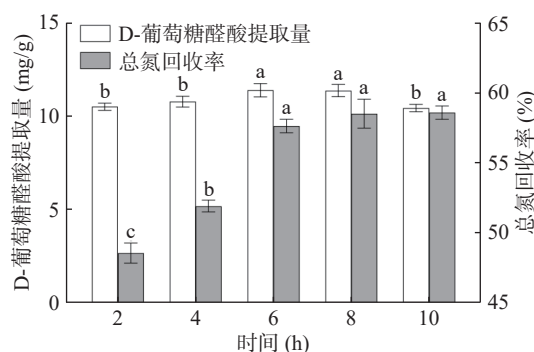


图 2 酶解时间对 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率的影响

Fig.2 Effects of hydrolysis time on D-glucuronic acid extraction amount and total nitrogen recovery

一般来说, 多肽的生物活性取决于多肽的氨基酸组成和序列^[27]。从图 3 可以看出, 随着水解时间的延长, 蛋壳膜多肽的 OH 自由基清除率逐渐增强, 在 6 h 时达到最大值。这归因于蛋白质在酶解过程中会释放出具有抗氧化活性的序列及氨基酸残基^[28]。而 ABTS 自由基清除率和铁螯合能力呈现不同的趋势, 在酶解 2~6 h 时无明显变化, 但随着酶解时间的延长, 抗氧化能力反而下降, 这可能是因为每种体外抗氧化性的反应机制不一样, 呈现出不同的结果^[29]。综合考虑, 选择酶解时间为 6 h。

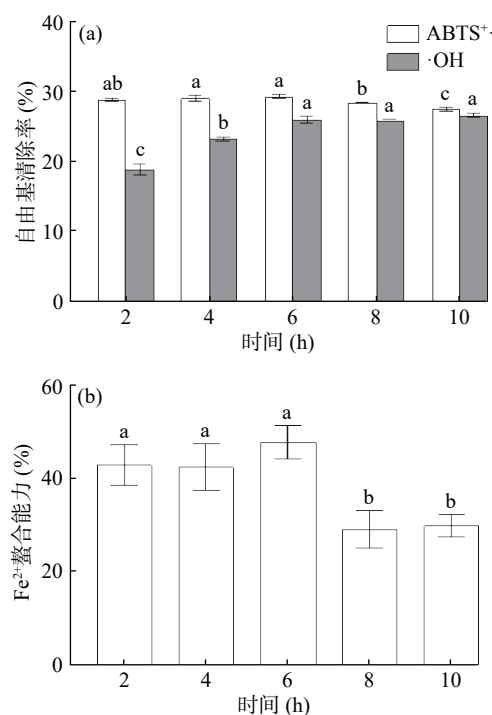


图 3 酶解时间对抗氧化活性的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis time on antioxidant activity

2.2.2 不同加酶量对蛋壳膜酶解效果的影响 如图 4 所示, 当加酶量从 6000 到 14000 U/g 时, D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率均迅速增加, 到 14000 U/g 后不再增加。这是因为在一定范围内, 提高加酶量可

以增加酶与底物的碰撞几率,加快酶解速率。但当底物已完全被消耗,过量的酶并不能持续加速催化反应^[30]。

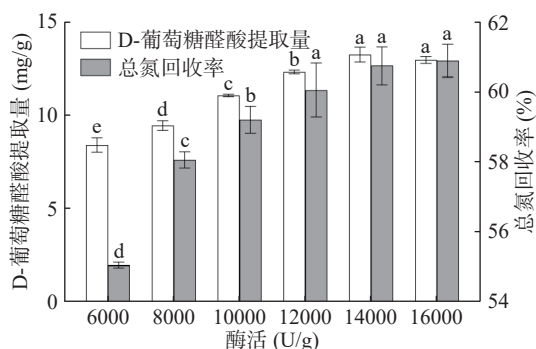


图4 加酶量对 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率的影响
Fig.4 Effects of the amount of enzyme on D-glucuronic acid extraction amount and total nitrogen recovery

如图 5 所示,蛋壳膜多肽的抗氧化活性随着加酶量提高逐渐增加,当超过 12000 U/g 时,显著下降 ($P<0.05$)。这是因为较高的加酶量使蛋壳膜过度酶解成活性不高的小肽或氨基酸^[31]。因此,选择加酶量为 12000 U/g。

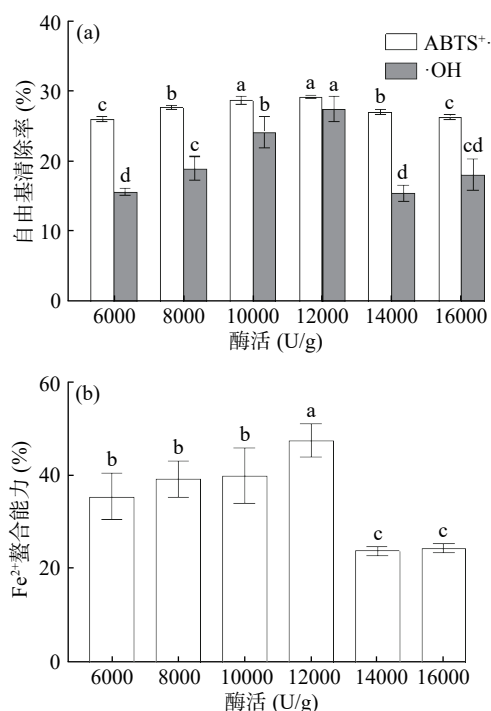


图5 加酶量对抗氧化活性的影响
Fig.5 Effects of enzyme amount on antioxidant activity

2.2.3 不同温度对蛋壳膜酶解效果的影响 温度会影响酶分子的催化效率,由图 6 可知,45~55 ℃ 时,D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率呈上升趋势,在 55~60 ℃ 时达到最高值,随后显著降低 ($P<0.05$)。这是因为适当的升温有助于提高酶的催化效率;而进一步升高温度反而会导致酶发生变性,造成催化效率下降^[32]。

如图 7 所示,蛋壳膜多肽的抗氧化活性随着温度升高不断提高,但 55~60 ℃ 变化不显著 ($P>0.05$)。

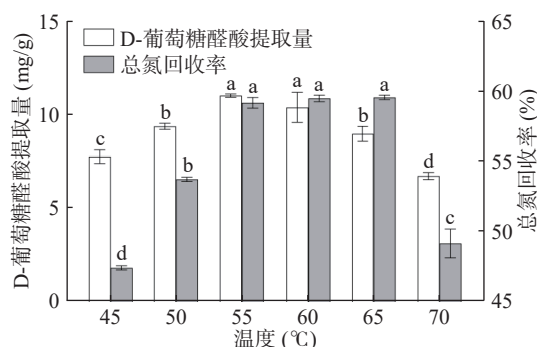


图6 温度对 D-葡萄糖醛酸提取量和总氮回收率的影响
Fig.6 Effects of temperature on D-glucuronic acid extraction amount and total nitrogen recovery

超过 60 ℃ 后显著下降 ($P<0.05$)。这可能是由于随着温度升高,一方面酶的催化能力提高,另一方面反应体系能量增加,从而增加单位时间内有效碰撞次数,促使酶反应加速进行。但温度继续升高,超过一定限度时,蛋白酶则会变性失去催化活性,造成酶反应速度降低^[33]。综合考虑,选择酶解温度为 55 ℃。

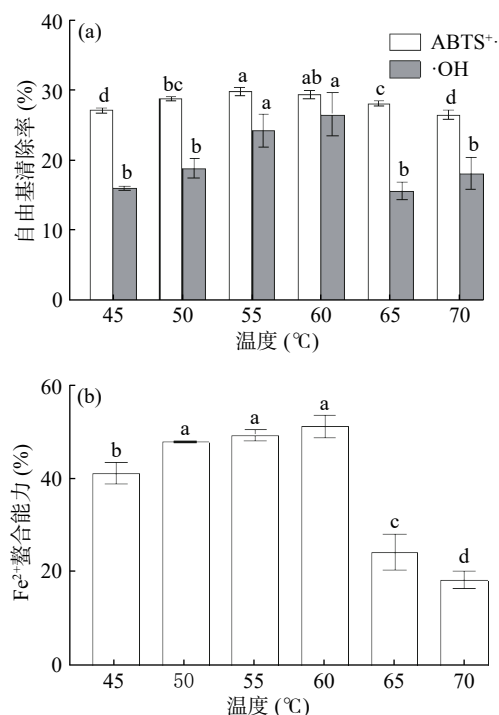


图7 温度对抗氧化活性的影响
Fig.7 Effects of temperature on antioxidant activity

综上所述,酶解的最佳工艺为时间 6 h,加酶量 12000 U/g,温度 55 ℃,此时 D-葡萄糖醛酸提取量达 12.4 ± 0.2 mg/g,总氮回收率达 $60.8\% \pm 0.7\%$,壳膜多肽的 ABTS 自由基清除率为 $29.46\% \pm 0.27\%$,OH 自由基清除率为 $26.58\% \pm 2.56\%$,Fe²⁺ 螯合能力为 $50.25\% \pm 0.43\%$ 。

2.3 细胞抗氧化活性分析

采用最佳挤压膨化协同酶解工艺制备壳膜多肽,并进一步对其细胞抗氧化活性进行分析。谷胱甘肽是公认的具有较强抗氧化性的物质,因此常作为抗

氧化性评价对照组^[21]。由图 8 可知,壳膜多肽的细胞抗氧化性随着浓度增加而增强,与对照组谷胱甘肽相比,壳膜多肽的抗氧化性略低。当壳膜多肽的浓度为 10 μg/mL 时,细胞抗氧化性达 65%,说明产物具有良好的细胞抗氧化性。

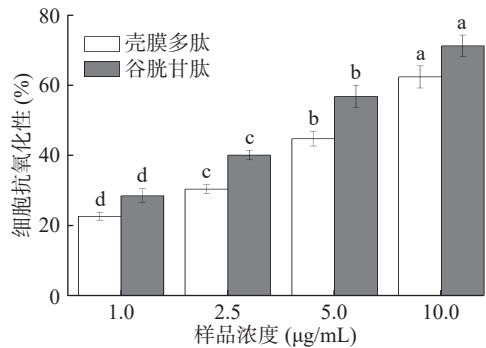


图 8 壳膜多肽的细胞抗氧化活性
Fig.8 Cellular antioxidant activity of eggshell membrane peptides

2.4 分子量分布情况分析

本文采用高效液相色谱对壳膜多肽进行分析,通过出峰面积积分计算可获得其分子量分布情况(图 9)。结果显示,蛋壳膜多肽分子量主要分布在 252~2435 Da, 占总量 81.8%, 252 Da 以下的游离氨基酸占 7.0%, 在 2435 Da 以上的肽链占 11.2%。结果表明,壳膜多肽以低聚肽为主。

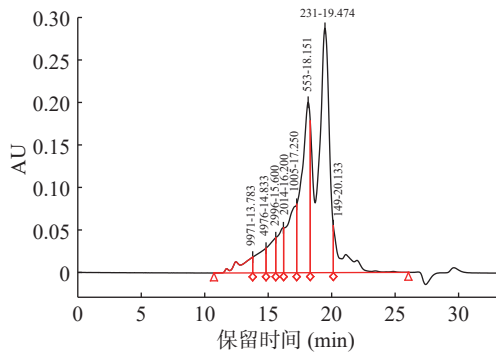


图 9 蛋壳膜多肽分子量分布的高效液相色谱图
Fig.9 High performance liquid chromatography of molecular weight distribution of eggshell membrane peptides
注: 图中数字表示不同分子量对应的保留时间。

2.5 氨基酸组成分析

表 1 显示了蛋壳膜多肽的氨基酸组成, Asp 和 Glu 的总含量占 27.93 g/100 g 蛋白。大量研究表明,某些氨基酸残基与抗氧化活性具有良好的相关性,如 Chen 等^[34]研究发现具有疏水性氨基酸的肽可以提高抗氧化活性。本文制备的蛋壳膜多肽中含有较多的疏水性氨基酸,含量为 44.70 g/100 g 蛋白,这可能与它具有的抗氧化活性有关。

3 结论

本文探究了挤压膨化协同酶解工艺制备壳膜多肽的最佳参数为: 挤压膨化温度 140 ℃, 螺杆转速 100 r/min, 水分含量 20%, 酶解时间 6 h, 加酶量

表 1 蛋壳膜多肽的氨基酸分析

Table 1 Amino acid analysis of eggshell membrane polypeptide		
氨基酸	蛋壳膜(g/100 g蛋白)	蛋壳膜多肽(g/100 g蛋白)
Asp	10.03±0.02	13.32±0.00
Glu	15.84±0.00	14.61±0.01
Ser	5.01±0.05	4.73±0.02
His	3.83±0.00	3.24±0.02
Gly*	6.09±0.01	6.47±0.04
Thr	5.25±0.04	3.53±0.07
Arg	7.22±0.04	6.23±0.06
Ala	3.77±0.01	5.35±0.05
Pro*	6.51±0.02	6.35±0.03
Tyr*	2.31±0.07	2.82±0.05
Cys-s	3.32±0.05	0.26±0.06
Val*	7.97±0.04	8.01±0.01
Met*	4.12±0.03	3.66±0.00
Phe*	3.01±0.01	4.88±0.00
Ile*	4.47±0.02	4.64±0.02
Leu*	6.15±0.01	7.87±0.00
Lys	5.10±0.01	4.06±0.03
疏水性氨基酸	40.63	44.70

注: “*”表示疏水性氨基酸。

12000 U/g, 温度 55 ℃。在该工艺条件下, D-葡萄糖醛酸提取量为 12.4 mg/g, 总氮回收率为 60.8%, 产物具有较高的体外和细胞抗氧化活性。相对分子质量分布结果表明壳膜多肽中主要成分为低聚肽(252~2435 Da), 占总量 81.8%。氨基酸组成分析结果表明壳膜肽富含 Asp 和 Glu, 且与抗氧化活性有关的氨基酸含量为 44.70 g/100 g 蛋白。因此, 本文制备的壳膜多肽有潜力作为天然抗氧化剂应用到食品、化妆品、保健品等领域。

参考文献

[1] KULSHRESHTHA G, DIEP T, HUDSON H A, et al. High value applications and current commercial market for eggshell membranes and derived bioactives[J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132270.
[2] BALAZ M. Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(9): 3827–3843.
[3] KAWEEWONG K, GARNJANAGOONCHORN W, JIRAPAKKUL W, et al. Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach[J]. *The Protein Journal*, 2013, 32(4): 297–308.
[4] SHI Y, ZHOU K, LI D, et al. Avian eggshell membrane as a novel biomaterial: A review[J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2178.
[5] ANDRESSA R, JANDLER S, MAURÍCIO Z, et al. Hyaluronic acid production and purification techniques: A review[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2042822>.
[6] AHMED M, HUARD B. Inhibition of chondroitin sulfate proteoglycans by APRIL[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2248: 43–61.
[7] SHAVLOVSKAYA O, ZOLOTOVSKAYA I, PROKOFYEVA Y. Anti-inflammatory and anti-aging effects of chondroitin sul-

- fate[J]. *Psikosomatika*, 2020, 12(5): 111–116.
- [8] SHARMA R, KUCHE K, THAKOR P. Chondroitin sulfate: Emerging biomaterial for biopharmaceutical purpose and tissue engineering[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 286: 119305.
- [9] CHI Y, LIU R, LIN M, et al. A novel process to separate the eggshell membranes and eggshells via flash evaporation[J]. *Food Science and Technology*, 2022: 42.
- [10] ZHU L, XIONG H, HUANG X, et al. Identification and molecular mechanisms of novel antioxidant peptides from two sources of eggshell membrane hydrolysates showing cytoprotection against oxidative stress: A combined *in silico* and *in vitro* study[J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111266.
- [11] SHI Y, RUPA P, JIANG B, et al. Hydrolysate from eggshell membrane ameliorates intestinal inflammation in mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 22728–22742.
- [12] 牛明福, 张婷婷, 万鹏, 等. 蛋壳内膜酶解液抑菌活性的工艺研究[J]. *食品科技*, 2017, 42(4): 78–83. [NIU M F, ZHANG T T, WAN P, et al. Antibacterial activity of eggshell membrane enzymatic hydrolysate[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(4): 78–83.]
- [13] SHI Y, KOVACS J, JIANG B, et al. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 10(11): 35–45.
- [14] ZHAO Q, ZHAO J, AHA D, et al. Separation and identification of highly efficient antioxidant peptides from eggshell membrane[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 495.
- [15] PHILIPP C, EMIN M, BUCKOW R. Pea protein-fortified extruded snacks: Linking melt viscosity and glass transition temperature with expansion behaviour[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 217: 93–100.
- [16] RYU G, GU B. Effects of moisture content and screw speed on physical properties of extruded soy protein isolate[J]. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2017, 46(6): 751–758.
- [17] 胡徐登, 陈有亮, 马萍. 鸭蛋壳膜双酶水解提取黏多糖的工艺研究[J]. *中国家禽*, 2015, 37(3): 34–37. [HU X D, CHEN Y L, MA P. Optimization of extraction conditons of mucopolysaccharides from duck eggshell membrane by hydrolyzing with double enzyme[J]. *China Poultry*, 2015, 37(3): 34–37.]
- [18] JUN H I, WIESENBOEN D P, KIM Y S. Antioxidant activity of phenolic compounds from canola (*Brassica napus*) seed[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, 23(6): 1753–1760.
- [19] LI Y, JIANG B, ZHANG T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 444–450.
- [20] ZHU C, ZHANG W, ZHOU G, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from Jinhua ham[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(6): 1265–1271.
- [21] 张晶, 张怡一, 徐斐然, 等. 菜籽多肽体外和细胞内抗氧化性评价及氨基酸分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(13): 36–41. [ZHANG J, ZHANG Y Y, XU F R. Antioxidant activities *in vitro* and in cells and amino acid composition of rapeseed peptides[J]. *Food Science*, 2016, 37(13): 36–41.]
- [22] 李杰, 罗志刚, 肖志刚, 等. 挤压超声联用提取米糠多糖工艺优化[J]. *农业机械学报*, 2013, 44(3): 174–179. [LI J, LUO Z G, XIAO Z G, et al. Optimization of extraction technology of rice bran polysaccharide by extrusion in conjunction with ultrasound[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(3): 174–179.]
- [23] 闫征, 李双石, 杨国伟, 等. 挤压膨化预处理技术对灵芝多糖提取的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(8): 280–283. [YAN Z, LI S S, YANG G W, et al. Effect of twin-screw extrusion conditions on polysaccharide extraction from ganoderma lucidum spore powder[J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 280–283.]
- [24] 王若兰, 岳佳, 黄南. 薏苡仁玉米果膨化制作工艺优化[J]. *食品科技*, 2016, 41(1): 130–135. [WANG R L, YUE J, HUANG N. Optimization on the puffing technology of *Coix* seed and corn[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(1): 130–135.]
- [25] 于殿宇, 王彤, 王旭, 等. 挤压膨化预处理工艺优化提高大豆蛋白粉品质[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(4): 285–292. [YU D Y, WANG T, WANG X, et al. Optimal extrusion pretreatment process improving quality of soybean protein powder[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(4): 285–292.]
- [26] 朱文婷, 吴士筠, 杨惠, 等. 酶法提取鸡蛋壳膜中透明质酸的工艺优化[J]. *食品科技*, 2016, 41(1): 204–209. [ZHU W T, WU S J, YANG H, et al. Optimization of the process of extracting hyaluronic acid from egg shell membrane by enzymatic method[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(1): 204–209.]
- [27] VO T, PHAM K, LE V, et al. Evaluation of iron-binding capacity, amino acid composition, functional properties of *Acetes japonicus* proteolysate and identification of iron-binding peptides[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 91: 374–386.
- [28] ZHANG X, ZHANG H, JIAO P, et al. Preparation and evaluation of antioxidant activities of bioactive peptides obtained from cornus officinalis[J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1232.
- [29] GU L, SU Y, ZHANG M, et al. Protection of beta-carotene from chemical degradation in emulsion-based delivery systems using antioxidant interfacial complexes: Catechin-egg white protein conjugates[J]. *Food Research International*, 2017, 96: 84–93.
- [30] LIANG G, CHEN W, QIE X, et al. Modification of soy protein isolates using combined pre-heat treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improving foaming properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105764.
- [31] MICAEL G, RICCARDO D, VALERIA B, et al. Effects of the enzymatic hydrolysis treatment on functional and antioxidant properties of quinoa protein acid-induced gels[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2020, 118: 10884.
- [32] 王艳红, 张丽娜, 牛思思, 等. 亚麻籽多肽制备工艺优化及生物活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(13): 66–76. [WANG Y H, ZHANG L N, NIU S S, et al. Optimization of the preparation process and biological activity of flaxseed polypeptide[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(13): 66–76.]
- [33] HORIMOTO Y, TAN R, LIM L. Enzymatic treatment of pork protein for the enhancement of iron bioavailability[J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2019, 70(1): 41–52.
- [34] CHEN H, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(3): 574–578.