

亚硫酸钠辅助酶解蛋壳膜制备抗氧化多肽的工艺

赵婕媛, 李晓云, 黄茜

(华中农业大学食品科技学院, 蛋品加工技术国家地方联合工程中心, 农业农村部蛋品加工重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 禽蛋壳膜蛋白含量丰富, 蛋白质约占蛋壳膜干重的 90%, 然而蛋壳膜在食品工业中通常被作为废弃物丢弃, 造成了资源浪费和环境污染, 因此高效地利用蛋壳膜资源是极为必要的。本研究使用亚硫酸钠辅助酶解法制备禽蛋壳膜抗氧化肽, 研究了酶种类、酶添加量、亚硫酸钠浓度和酶解时间对禽蛋壳膜多肽抗氧化性和水解度的影响。结果表明, 亚硫酸钠辅助下碱性蛋白酶酶解禽蛋壳膜, 效果优于其他四种酶; 亚硫酸钠辅助碱性蛋白酶酶解禽蛋壳膜的最佳条件是: 碱性蛋白酶添加量 12 U/mg, 亚硫酸钠浓度 40 mM, 时间 4 h。在最优工艺条件下, 禽蛋壳膜多肽的总抗氧化能力为 245.88 $\mu\text{g/mL}$, 水解度为 8.58%, 表明禽蛋壳膜的亚硫酸钠辅助碱性蛋白酶酶解产物具有很好的体外抗氧化活性。SDS-PAGE 表明禽蛋壳膜多肽的分子量主要在 3.3~14.4 ku 之间。

关键词: 禽蛋壳膜; 酶解; 抗氧化肽

文章编号: 1673-9078(2018)09-143-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.021

Preparation of Antioxidant Peptides from Eggshell Membrane by Sodium Sulfite-assisted Enzymatic Hydrolysis

ZHAO Jie-yuan, LI Xiao-yun, HUANG Xi

(College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, National Joint Engineering Research Center for Egg Processing, Key Laboratory of Egg Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China.)

Abstract: The eggshell membrane has abundant protein, which accounts for about 90% of the dry weight of the eggshell membrane. However, eggshell membranes are often discarded as waste in food industry, resulting in waste of resources and environmental pollution, thus, the efficient use of eggshell membranes is extremely necessary. In this study, the antioxidant peptides were prepared by sodium sulfite-assisted enzymatic hydrolysis. Effect of protease species, enzyme dosage, Sodium sulfite concentration and hydrolysis time on antioxidant activity and hydrolysis degree of eggshell membrane peptides was researched. The results showed that alkaline protease assisted by sodium sulfite was better than the other four proteases. At 12 U/mg alkaline protease, sodium sulfite concentration 40 mM, hydrolysis time 4 h, the degree of hydrolysis and total antioxidant activity of the hydrolysates were 8.58% and 245.88 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating that the hydrolysates have good antioxidant activity *in vitro*. The results of SDS-PAGE and Tricine-SDS-PAGE showed that the molecular weight of the eggshell membrane polypeptide was mainly in the range of 3.3~14.4 ku.

Key words: eggshell membrane; enzymolysis; antioxidant peptide

生物活性肽是来自蛋白质水解产物由 2~20 个氨基酸组成的短肽。这些肽对于人体健康方面有很多积极作用, 如抗氧化活性, 抗菌性, 血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制作用和免疫调节作用等, 当前, 生物活性肽被广泛应用于化妆品, 食品添加剂, 营养品和药

收稿日期: 2018-05-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2018YFD0400302); 国家自然科学基金资助项目 (31471602); 蛋鸡产业技术体系岗位科学家项目 (GARS-40-K24)

作者简介: 赵婕媛 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋品科学与技术
通讯作者: 黄茜 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产食品科学与技术

物等^[1]。抗氧化肽像其他抗氧化剂一样, 可以保护机体免受由羟自由基, 超氧化物, 过氧化氢, 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 自由基引起的损伤^[2], 抑制脂质过氧化^[3]。抗氧化肽也可以应用于保护食品, 减少食品由氧化引起的变色和变质。与合成抗氧化剂相比, 来自食品资源的抗氧化肽有易吸收, 无毒副作用的优点。目前, 一些用作食品添加剂的合成抗氧化剂, 如丁基羟基茴香醚和丁基羟基甲苯因其毒性而开始受到限制^[4]。因此, 利用可行和高效的方法从自然资源获得无毒的抗氧化剂用于替代合成抗氧化剂的食物添加剂具有非常重要的意义。

近年来,从天然来源寻找新的抗氧化剂用于取代食品和药物材料中的合成抗氧化剂引起研究者极大的兴趣。研究发现,天然存在于水果、蔬菜、种子中的维生素 C、 α 生育酚和酚类化合物^[5]等具有减少氧化损伤的能力,氧化损伤与癌症、心血管疾病和动脉粥样硬化等疾病有关。研究发现,许多来源于植物蛋白或者动物蛋白的蛋白水解物具有抗氧化活性,例如大豆蛋白^[6]、米糠蛋白^[7]、蛋黄蛋白^[8]和猪肌原纤维蛋白^[9]等。此外,水产品和副产品也是抗氧化肽的良好来源,例如海参^[10]、沙丁鱼副产物^[4]。

近年来中国禽蛋产量逐年增长,2016 年全国禽蛋产量 3095 万吨^[11]。在禽蛋生产和消费过程中,禽蛋壳膜大量产生,按蛋壳膜重占蛋重的 1.02% 计算^[12],我国每年有 31.57 万吨废弃蛋壳膜产生,并且禽蛋壳膜主要作为废弃物处理,造成了资源浪费和环境污染。蛋壳膜含有丰富的蛋白质,如胶原蛋白(I 型, V 型和 X 型)、骨桥蛋白、唾液蛋白、角蛋白、卵清蛋白等^[13],此外还含有约 3% 的脂质体和 2% 的糖类。国内外对蛋壳膜蛋白及多肽的研究越来越多,研究发现蛋壳膜作为一种新型膳食补充剂,临床上已显示缓解关节炎关节疼痛和僵硬^[14],研究发现蛋壳膜的酶解产物的活性强于原蛋白,酶解产物具有清除 O_2^- 、OH 等自由基的活性,并且对 DNA 损伤有保护作用^[15],有研究利用蛋壳膜水解物制作化妆品^[16],因此蛋壳膜酶解物具有作为抗氧化食品添加剂、抗氧化化妆品的潜力,蛋壳膜具有高价值利用的潜力。因此采用适当方式将禽蛋壳加工成具有商业价值的产品,是提高禽蛋综合价值,减少环境污染的有效途径。本文旨在研究亚硫酸钠辅助蛋白酶酶解蛋白酶制备具有高抗氧化活性的蛋壳膜多肽,以其为蛋壳膜产品的开发和应用提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

鸡蛋壳膜,采购于黑龙江中农兴和生物科技有限公司。

碱性蛋白酶 (2×10^5 U/g)、胃蛋白酶 (3×10^6 U/g),neofroxx 公司;木瓜蛋白酶 (8×10^5 U/g)、中性蛋白酶 (1×10^5 U/g)、胰凝乳蛋白酶 (1.5×10^6 U/g),上海源叶生物有限公司; SDS-PAGE 试剂盒、Tricine-SDS-PAGE 试剂盒、预染超低分子量蛋白质 Marker (3.3 ku~31.0 ku),北京索莱宝科技有限公司; Fermentas 预染蛋白 Marker 10~250 ku,北京明阳科华生物科技有限公司;亚硫酸钠、浓硫酸、氢氧化钠、

硫酸铜、硫酸钾、钼酸铵、磷酸钠、甲醛等均为分析纯,国药集团试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Sigma3-30K 高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司; K9840 半自动凯氏定氮仪,济南华舜仪器有限公司; LSHZ-300 全温振荡箱,苏州培英实验设备有限公司; HYP-308 消化炉,上海纤检仪器有限公司; Nanodrop 2000C 紫外分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; Heidolph 真空冷冻干燥机, Germany 公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

鸡蛋壳膜 → 加酶、亚硫酸钠 → 恒温震荡水浴酶解 → 灭酶 (80 °C, 20 min) → 离心 (3600 g, 10 min) → 上清液 → 透析 → 冷冻干燥 → 蛋壳膜酶解物

1.3.2 单因素实验

1.3.2.1 酶的筛选

准确称取 5.000 g 的鸡蛋壳膜粉,按 1:20 的料液比加入 30 mM 的亚硫酸钠溶液配置成鸡蛋壳膜悬浊液,用 1 M NaOH 或 1 M HCl 调节 pH 至所用酶的最适 pH,按 9 U/mg 的酶与底物蛋壳膜比分别加入胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶,再在各个酶的最适温度下持续震荡 6 h (胃蛋白酶采用 pH 为 2.0,酶解温度 37 °C,木瓜蛋白酶采用 pH 为 6.5,酶解温度 60 °C,糜蛋白酶采用 pH 7.9,酶解温度 37 °C,碱性蛋白酶采用 pH 为 8.0,酶解温度 55 °C,中性蛋白酶采用 pH 为 7.5,酶解温度 45 °C),取出,离心 (3600 g, 10 min),取部分上清液测定水解度。其余上清液使用截留分子量为 1 ku 的透析袋在 4 °C 下透析 24 h,冷冻干燥。以水解度和总抗氧化能力为指标确定鸡蛋壳膜酶解最佳用酶。

1.3.2.2 加酶量的确定

在确定蛋白酶的基础上,料液比、亚硫酸钠浓度、酶解时间分别固定为 1:20、30 mM、6 h,按 3 U/mg、6 U/mg、9 U/mg、12 U/mg、15 U/mg 的加酶量加入碱性蛋白酶或木瓜蛋白酶,以水解度和总抗氧化能力为指标,确定最优的加酶量。

1.3.2.3 亚硫酸钠浓度的确定

碱性蛋白酶加酶量为 12 U/mg,料液比、酶解时间分别固定为 1:20、6 h,亚硫酸钠浓度分别为 10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM,以水解度和总抗氧化能力为指标,确定亚硫酸钠最适浓度。

1.3.2.4 酶解时间的确定

碱性蛋白酶加酶量为 12 U/mg,料液比为 1:20,

亚硫酸钠浓度为 40 mM, 酶解时间分别为 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h, 以水解度和总抗氧化能力为指标, 确定最佳酶解时间。

1.3.3 游离氨基态氮含量测定: 甲醛值法

游离氨基态氮含量采用中华人民共和国国家标准 GB/T 5009.39-2003 氨基态氮甲醛值法测定, 实验做三次平行。吸取 5 mL 样品, 加入 60 mL 蒸馏水, 开动磁力搅拌器, 用 0.050 mol/L NaOH 标准溶液滴定至酸度计指示 pH 8.2, 加入 10.0 mL 中性甲醛溶液, 混匀。再用 0.050 mol/L NaOH 标准溶液继续滴定至 pH 9.2, 记下消耗 NaOH 标准溶液的体积, 记为 V_1 。同时取 65 mL 蒸馏水, 先用 0.050 mol/L NaOH 标准溶液调节至 pH 为 8.2, 再加入 10.0 mL 中性甲醛溶液, 继续用 NaOH 滴定至 pH 9.2, 做为试剂空白试验, 记录消耗 NaOH 的体积, 记为 V_2 。试样中氨基酸态氮的含量计算公式:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{5}$$

注: X 表示试样中氨基酸态氮的含量, 单位为 g/mL; V_1 表示测定试样加入甲醛后消耗 NaOH 标准滴定溶液的体积, 单位为 mL; V_2 表示试剂空白实验加入甲醛后消耗 NaOH 标准滴定溶液的体积, 单位为 mL; c 表示 NaOH 标准滴定溶液的浓度, 单位为 mol/L; 0.014 表示与 1 mL 1.000 mol/L NaOH 标准滴定溶液相当的氮的质量, 单位为 g。

1.3.4 总氮含量测定

本试验采用中华人民共和国国家标准食品中蛋白质的测定 GB 5009.5-2016 凯氏定氮法测定总氮含量。

1.3.5 水解度测定

根据文献^[17]的方法, 实验做三次平行。

$$DH(\%) = \frac{\text{水解液中的总游离氨基酸态氮含量}}{\text{原料中的总氮量}} \times 100$$

1.3.6 总抗氧化能力测定

蛋壳膜肽总抗氧化能力是参照 Huang Y 等^[18]人的研究方法进行测定的。方法如下: 将蛋壳膜多肽配置成 3 mg/mL 的溶液, 各取 0.1 mL 于 10 mL 的具塞试管中, 加入 5 mL 配置好的试剂 (4 mmol/L 钼酸铵、28 mmol/L 磷酸钠和 0.6 mol/L 浓硫酸), 混匀, 密封置于 95 °C 的恒温水浴锅中反应 90 min, 取出后迅速冷却至 25 °C 室温, 使用紫外分光光度计测定波长为 695 nm 处的吸光值 ($A_{695\text{nm}}$), 以等体积的去离子水代替样品溶液作为空白对照。同时用抗坏血酸溶液 (0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$) 作阳性对照, 蛋白质水解物溶液的总抗氧化活性 (TAA) 表示为相当于抗坏血酸的量, 实验做三次平行。

1.3.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按照 SDS-PAGE 试剂盒说明书操作, 简言之, 将蛋壳膜水解产物以 1:4 比例与上样缓冲液混合。为了使蛋白质变性, 将溶液煮沸 5 min, 然后用于 SDS-PAGE。样品在 80 V 的叠加电压和 100 V 的分辨电压下进行 SDS-PAGE。考马斯亮蓝 G-250 用作染色液。

为了进一步确定蛋壳膜水解物在 15 ku 以下的分子量分布, 进行了小分量电泳, 按照 Tricine-SDS-PAGE 试剂盒说明书操作, 使用 16.5% 的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶对蛋壳膜多肽进行电泳, 电泳结束后使用考马斯亮蓝 G-250 进行染色, 分析。

1.3.8 数据分析

所有实验进行 3 次重复, 单因素实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行 One-way ANOVA 分析, 平均值之间用 Duncan's multiple range test 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 酶种类对蛋壳膜蛋白水解度和总抗氧化能力的影响

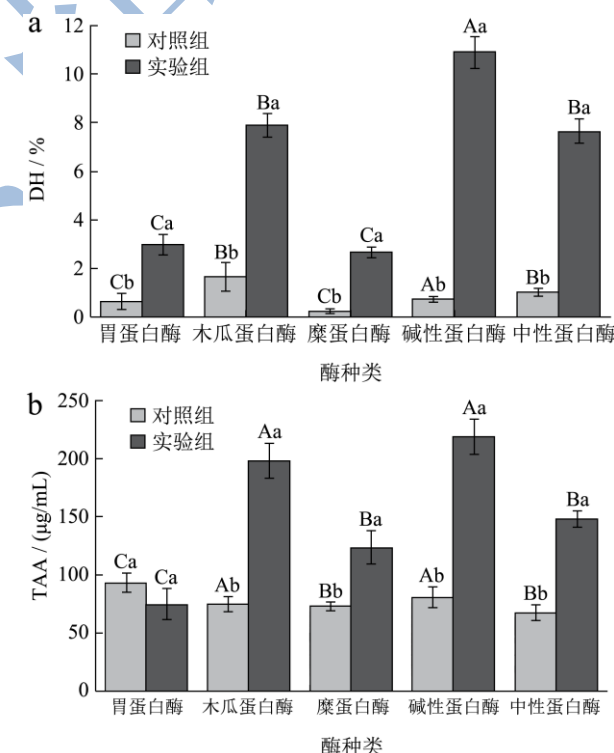


图 1 不同种类的蛋白酶对蛋壳膜总抗氧化活性和水解度的影响

Fig.1 Effect of different kinds of proteases on total antioxidant activity and hydrolysis degree of eggshell membrane

注: 表中小写字母表示实验组和对照组数据之间的差异性; 大写字母表示不同种类蛋白酶处理数据之间的差异性; 字

母相同表示差异不显著($p>0.05$); 字母不同表示差异显著($p<0.05$)。

如图 1, 对照组的水解度都在 1% 左右, 说明水解蛋壳膜蛋白起主要作用的是蛋白酶。因为大多数酶酶解时有特异性切割位点, 因此使用不同的酶可以生成具有不同氨基酸序列的多肽, 同时酶的种类也可以影响多肽的生物活性和消化速度^[19]。如图 1 所示, 五种酶中, 碱性蛋白酶酶解产物的水解度显著高于其它四种酶的酶解产物, 最高达 10.85%, 与尤娟用蛋白酶酶解鲢鱼鱼肉蛋白得到的结果相似^[20], 碱性蛋白酶酶解得到的水解度最大, 其它四种蛋白酶的水解度在 2.68%~7.89%。酶解产物的抗氧化活性从高到低依次是: 碱性蛋白酶>木瓜蛋白酶>中性蛋白酶>糜蛋白酶>胃蛋白酶。木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的酶解产物抗氧化活性最高, 显著高于其它三种酶的酶解产物 ($p<0.05$), 总抗氧化能力分别为 198.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 218.61 $\mu\text{g/mL}$, 所以本实验选择木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶。这与周艳华用蛋白酶酶解蛋壳膜蛋白得到的结果相似^[17], 都是碱性蛋白酶的酶解产物抗氧化活性较好, 这可能是因为碱性蛋白酶酶解物的水解度较高, 生成了具有更高抗氧化活性的短肽。

2.2 木瓜蛋白酶加酶量对蛋壳膜多肽水解度和总抗氧化能力的影响

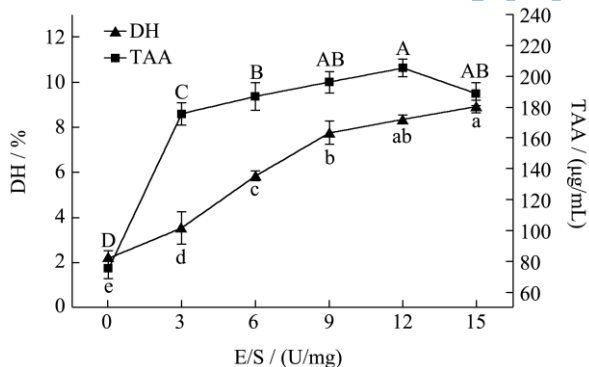


图 2 木瓜蛋白酶加酶量对蛋壳膜总抗氧化活性和水解度的影响

Fig.2 Effect of papain dosage on total antioxidant activity and degree of hydrolysis of eggshell membrane

注: 表中大写字母表示总抗氧化能力数据之间的差异性; 小写字母表示水解度数据之间的差异性; 字母相同表示差异不显著($p>0.05$); 字母不同表示差异显著($p<0.05$)。

酶解速度取决于加酶量, 少量的酶不能完全酶解底物蛋白, 如图 2 所示, 底物浓度不变, 木瓜蛋白酶加酶量在 0 U/mg~9 U/mg 范围内, 酶解物水解度随加酶量增高呈快速上升趋势。当加酶量达到 9 U/mg 后,

水解度上升趋势变缓, 在 15 U/mg 时达到最大值 8.94%。木瓜蛋白酶加酶量在 0 U/mg~12 U/mg 范围内, 随木瓜蛋白酶加酶量的升高, 总抗氧化能力呈现上升趋势。当加酶量增高到 12 U/mg 时, 总抗氧化能力达到最大值为 205.58 $\mu\text{g/mL}$, 加酶量继续增加到 15 U/mg 时, 此时水解度继续上升但总抗氧化能力出现下降, 可能是木瓜蛋白酶继续酶解, 将抗氧化多肽酶解呈没有抗氧化活性的肽段。

2.3 碱性蛋白酶加酶量对蛋壳膜多肽水解度和总抗氧化能力的影响

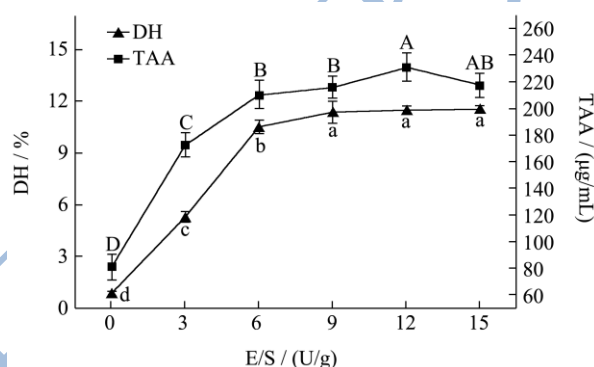


图 3 碱性蛋白酶加酶量对蛋壳膜总抗氧化活性和水解度的影响

Fig.3 Effects of alkaline protease dosage on total antioxidant activity and degree of hydrolysis of eggshell membrane

注: 表中大写字母表示总抗氧化能力数据之间的差异性; 小写字母表示水解度数据之间的差异性; 字母相同表示差异不显著($p>0.05$); 字母不同表示差异显著($p<0.05$)。

如图 3 所示, 随着加酶量的升高, 酶解产物的水解度和总抗氧化能力逐渐上升, 这是因为当底物浓度不变时, 增加加酶量, 增高了蛋白酶与底物接触的机会^[21], 底物被酶解的越充分生成的抗氧化活性肽量越多, 因此水解度和酶解物的总抗氧化能力升高。当加酶量达到 6 U/mg 后, 水解度趋于平稳, 这可能是因为底物蛋白浓度一定, 加酶量超过一定量之后达到饱和^[22]。加酶量为 12 U/mg 时, 总抗氧化能力达到最大值 230.73 $\mu\text{g/mL}$, 显著高于木瓜蛋白酶加酶量 12 U/mg 时的酶解物的总抗氧化能力, 碱性蛋白酶加酶量增高到 12 U/mg 之后, 总抗氧化能力略微下降, 因此本实验选择碱性蛋白酶加酶量为 12 U/mg。

2.4 Na₂SO₃ 浓度对蛋壳膜多肽水解度和总抗氧化能力的影响

如图 4 所示, Na₂SO₃ 浓度在 0~30 mM 范围内,

水解度随 Na_2SO_3 浓度升高呈上升趋势, 这表明低浓度 Na_2SO_3 有利于蛋壳膜酶解, 与 Hamada^[23] 研究结果一致。因为蛋壳膜蛋白中含有大量的二硫键, 使得蛋白质结构紧密而难以被酶解^[12], Na_2SO_3 可以断裂二硫键^[24], 使蛋白质更易与蛋白酶接触, 有利于蛋白质与蛋白酶之间相互作用, 从而加速酶解。超过 30 mM 之后水解度呈下降趋势, 这可能是因为高浓度的亚硫酸钠抑制了碱性蛋白酶的活性。 Na_2SO_3 浓度在 0~40 mM 范围内, 总抗氧化能力随 Na_2SO_3 浓度升高呈上升趋势, 在 40 mM 时达到最大值 238.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 超过 40 mM 之后总抗氧化能力下降, 因此本实验选择 40 mM 的 Na_2SO_3 浓度, 少量 Na_2SO_3 可以通过透析、超滤等方法去除。

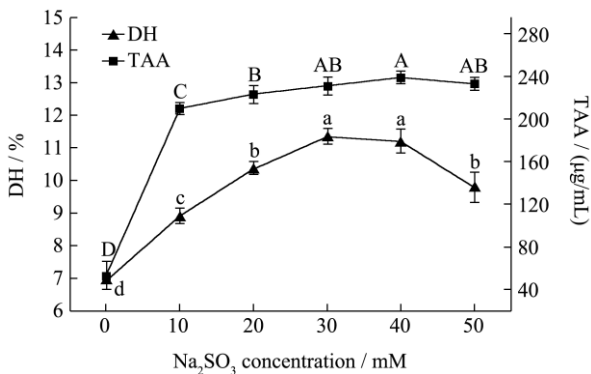


图 4 Na_2SO_3 浓度对蛋壳膜总抗氧化活性和水解度的影响

Fig.4 Effect of sodium sulfite concentration on total antioxidant activity and hydrolysis degree of eggshell membrane

注: 表中大写字母表示总抗氧化能力数据之间的差异性;

小写字母表示水解度数据之间的差异性; 字母相同表示差异不显著($p>0.05$); 字母不同表示差异显著($p<0.05$)。

2.5 酶解时间对蛋壳膜多肽水解度和总抗氧化能力的影响

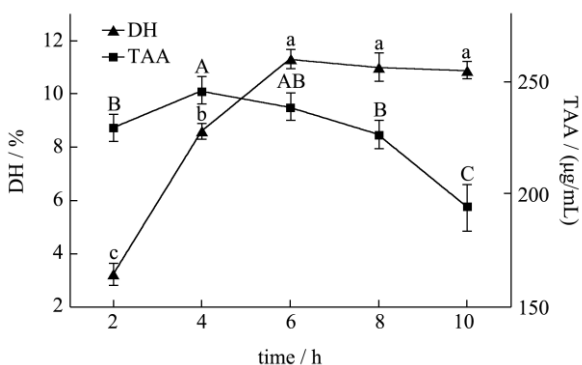


图 5 时间对蛋壳膜总抗氧化活性和水解度的影响

Fig.5 Effect of time on total antioxidant activity and hydrolysis degree of eggshell membrane

注: 表中大写字母表示总抗氧化能力数据之间的差异性;

小写字母表示水解度数据之间的差异性; 字母相同表示差异不显著($p>0.05$); 字母不同表示差异显著($p<0.05$)。

图 5 是碱性蛋白酶酶解时间对酶解产物水解度和总抗氧化能力的影响。可以看出, 随着酶解时间延长, 禽蛋壳膜的水解度上升趋势显著, 水解 6 h 水解度达到最大值 11.29%, 超过 6 h 后, 其水解度没有显著性差异 ($p>0.05$)。可能是因为最初底物浓度较高, 酶与底物充分接触, 随着水解时间延长, 底物浓度降低, 产物浓度升高, 底物可水解位点的减少和产物的增多抑制了蛋白酶^[25]。总抗氧化能力随着酶解时间的延长呈现先上升后下降的趋势, 在 4 h 时达到最大值 245.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 这可能时因为初始阶段禽蛋壳膜水解迅速, 大量的肽键被水解, 使得总抗氧化能力升高^[26], 水解度对酶解产物的总抗氧化能力影响显著, 因为水解度显著影响肽链长度和产物的末端氨基酸残基^[27], 酶解时间延长, 水解度先上升后趋于平稳, 水解度升高, 可能导致多肽被进一步水解成不具有抗化活性的短肽或者氨基酸, 因此导致总抗氧化能力下降, 本实验选择酶解时间 4 h。

2.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

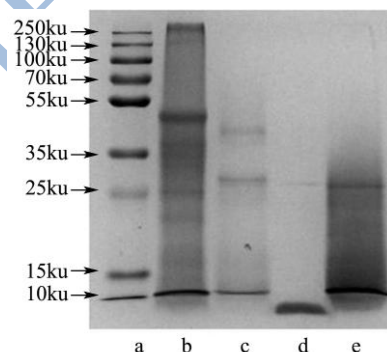


图 6 不同样品的 SDS-PAGE 图

Fig.6 SDS-PAGE iamge of different samples

注: 蛋白标品 (a), Na_2SO_3 处理组(b), 碱性蛋白酶处理组(c), 碱性蛋白酶(d), 碱性蛋白酶和 Na_2SO_3 共同处理组(e)。

如图 6 所示, Na_2SO_3 处理组产物的分子量明显高于加酶组, 在 130 ku 附近有条带, 推测是胶原蛋白的 α 链, 在 250 ku 附近的条带推测是胶原蛋白的 β 链, 在 35~55 ku 之间的条带推测是酶解后的角蛋白。碱性蛋白酶在 25 ku 附近和低于 10 ku 出现条带。碱性蛋白酶处理组分子量明显低于 Na_2SO_3 处理组, 在 25 ku 附近和 10 ku 附近有条带。碱性蛋白酶和 Na_2SO_3 共同处理组在 25 ku 以下尤其是 10 ku 附近的的组分含量明显高于单独碱性蛋白酶处理组和单独 Na_2SO_3 处理组。

如图 7 所示, Na_2SO_3 处理组产物主要分布于大于 31 ku 的部分, 碱性蛋白酶处理组高于 31 ku 的部分少

于 Na_2SO_3 处理组, 低于 14.4 ku 的部分少于碱性蛋白酶和 Na_2SO_3 共同处理组。碱性蛋白酶在 4 ku 和 31 ku 处有两条条带, 碱性蛋白酶和 Na_2SO_3 共同处理组产物的分子量主要集中在 3.3~14.4 ku。

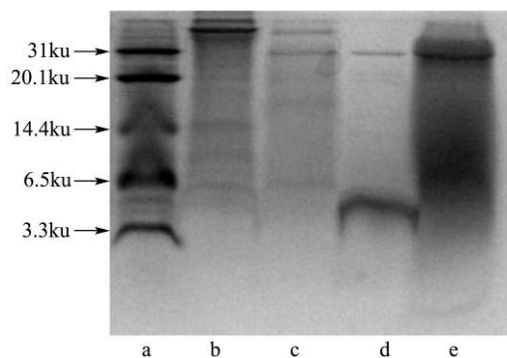


图7 不同样品的 Tricine-SDS-PAGE 图

Fig.7 Tricine-SDS-PAGE image of different samples

注: 蛋白标品 (a), Na_2SO_3 处理组(b), 碱性蛋白酶处理组(c), 碱性蛋白酶(d), 碱性蛋白酶和 Na_2SO_3 共同处理组(e)。

3 结论

3.1 本研究以绿色安全高效的 Na_2SO_3 辅助生物酶解的方法, 通过单因素实验优化了酶解条件, 即采用 12 U/mg 碱性蛋白酶联合 40 mM Na_2SO_3 酶解 4 h, 产物的水解度为 8.58%, 总抗氧化能力达到 245.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有较好的抗氧化能力。

3.2 采用 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 分析酶解产物的分子量分布, 发现最优条件的蛋壳膜酶解产物的分子量分布在 3.3~14.4 ku。为了提高抗氧化肽的纯度以期获得更好的抗氧化活性, 本实验后续将进行更深入的研究, 具体包括: 运用凝胶过滤技术分离纯化酶解产物, 对纯化前后多肽的抗氧化活性进行对比等。

3.3 综上, 本实验以 Na_2SO_3 辅助碱性蛋白酶酶解的方法, 通过酶解条件优化得到了高抗氧化能力的酶解产物, 为禽蛋壳膜的深加工利用奠定了理论基础。因此, 禽蛋壳膜酶解的蛋壳膜多肽可以作为抗氧化、抗衰老的功能性食品或者化妆品, 禽蛋壳膜具有高价值利用的潜力。

参考文献

[1] Liu R, Zheng W, Li J, et al. Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Mactra veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 484-489

[2] Qian Z-J, Jung W-K, Kim S-K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw [J].

Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1690-1698

[3] Moure A, Domínguez H, Parajó J C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 447-456

[4] Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Manni L, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins [J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 559-565

[5] Katalinic V, Milos M, Kulisic T, et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols [J]. Food Chemistry, 2006, 94(4): 550-557

[6] Gibbs B F, Zougman A, Masse R, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. Food Research International, 2004, 37(2): 123-131

[7] Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food [J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 742-748

[8] Sakanaka S, Tachibana Y, Ishihara N, et al. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system [J]. Food Chemistry, 2004, 86(1): 99-103

[9] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667

[10] Zhong Y, MAK, Shahidi F. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(4): 1188

[11] 张超. 禽蛋生产消费市场供需基本平衡[J]. 农产品市场周刊, 2017, 16: 34

ZHANG Chao. Fundamental balance of supply and demand in poultry egg production and consumption market [J]. Market Weekly, 2017, 16: 34-34

[12] 李鑫, 赵燕, 李建科, 等. 蛋壳膜中美容活性物质的提取与应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 427-430

LI Xin, ZHAO Yan, LI Jian-ke, et al. Extraction and application of cosmetic active substances in eggshell membranes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 427-430

[13] Nys, Gautron, Mc Kee, et al. Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens [J]. Worlds Poultry Science Journal, 2001, 57(4): 401-413

- [14] Ruff K J, Devore D P. Reduction of pro-inflammatory cytokines in rats following 7-day oral supplementation with a proprietary eggshell membrane-derived product [J]. *Modern Research in Inflammation*, 2014, 3(1): 19-25
- [15] Huang X, Zhou Y, Ma M, et al. Chemiluminescence evaluation of antioxidant activity and prevention of DNA damage effect of peptides isolated from soluble eggshell membrane protein hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(23): 12137-12142
- [16] Devore D P, Long F D, Adams R G, et al. Therapeutic, nutraceutical and cosmetic applications for eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations: US, PCT/US2004/007832 [P] 2004.09.23.
- [17] 周艳华.可溶性鸡蛋壳膜蛋白与多肽的制备及其抗氧化活性的研究[D].武汉:华中农业大学,2010
ZHOU Yan-hua. Preparation of soluble egg shell membrane protein and polypeptide and its antioxidant activity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010
- [18] Huang Y, Ruan G, Qin Z, et al. Antioxidant activity measurement and potential antioxidant peptides exploration from hydrolysates of novel continuous microwave-assisted enzymolysis of the *Scomberomorus niphonius* protein [J]. *Food Chemistry*, 2017, 223: 89-95
- [19] Ruan G, Chen Z, Wei M, et al. The study on microwave assisted enzymatic digestion of ginkgo protein [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 94: 23-28
- [20] 尤娟.鲢鱼鱼肉蛋白抗氧化肽的制备及其糖基化产物功能特性的研究[D].北京:中国农业大学,2014
YOU Juan. Preparation of antioxidant peptides of carp fish protein and functional properties of glycosylation products [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [21] 田旭静,段鹏慧,范三红,等.响应面法优化酶解藜麦糠蛋白制备抗氧化肽工艺[J].食品科学,2018,10:158-164
TIAN Xu-jing, DUAN Peng-hui, FAN San-hong, et al. Optimization of antioxidant peptides prepared by enzymatic hydrolysis of buckwheat protein by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2018, 10: 158-164
- [22] Jakovetić S, Luković N, Jugović B, et al. Production of antioxidant egg white hydrolysates in a continuous stirred tank enzyme reactor coupled with membrane separation unit [J]. *Food & Bioprocess Technology*, 2015, 8(2): 287-300
- [23] Hamada JS. Use of proteases to enhance solubilization of rice bran proteins [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1999, 23(3): 307-321
- [24] Katoh K, Tanabe T, Yamauchi K. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(18): 4255-4262
- [25] Ketnawa S, Benjakul S, Martínez-Alvarez O, et al. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability [J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 383-390
- [26] Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1317-1327
- [27] Nasri R, Jridi M, Lassoued I, et al. The influence of the extent of enzymatic hydrolysis on antioxidative properties and ace-inhibitory activities of protein hydrolysates from goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(5): 1121-1134