

# 蛋膜蛋白光谱分析及其酶解液抗氧化性研究

周艳华, 马美湖\*, 蔡朝霞, 李涛

(华中农业大学 国家蛋品加工技术研究分中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 对实验制得的可溶性蛋膜蛋白进行光谱分析。由紫外扫描及 FI-IR 红外光谱分析可初步断定, 蛋膜蛋白中主要成分为 I 型胶原, 且较大程度地保留了其三股螺旋结构。采用不同的酶制剂对蛋膜蛋白溶液进行酶解并得相应的酶解液, 并采用电脑化学发光仪测定了蛋膜蛋白及其酶解液清除超氧阴离子自由基的能力。结果表明, 蛋膜蛋白及其酶解液均具有较好的超氧阴离子清除能力, 且胰蛋白酶酶解液的 IC<sub>50</sub> 最小, 为 0.270mg/ml。

**关键词:** 可溶性蛋膜蛋白; 光谱分析; 酶解; 化学发光法; 体外抗氧化活性

## Spectral Analysis of Soluble Egg Shell Membrane Protein and Antioxidant Activities of Its Enzymatic Hydrolysates

ZHOU Yan-hua, MA Mei-hu\*, CAI Zhao-xia, LI Tao

(Subsidiary Research Center of National Egg Processing, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Soluble eggshell membrane protein (SEP) prepared was subjected to spectral analysis, and the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical scavenging activities of both SEP and its hydrolysates prepared by different enzymes were assayed by chemiluminescence method. SEP mainly consisted of collagen type I and the structure of collagen triple helices were remained according to the UV and FI-IR infrared spectral analysis. SEP and peptides derived from it both showed high O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical scavenging activity and the trypsin hydrolysate (TH) presented the highest activity of scavenging O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical, with an IC<sub>50</sub> of 0.270 mg/ml.

**Key words:** SEP; spectral analysis; enzymolysis; chemiluminescence method; *in vitro* antioxidant activity

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)15-0013-04

我国是世界上养禽最多的国家。从 1985 年至今, 我国禽蛋总量已连续 22 年雄踞世界第一位。2007 年我国禽蛋产量达 3100 万 t 左右, 占世界的 43.9%。目前, 蛋与蛋制品已成为了我国人民除猪肉外的第二大蛋白质消费品<sup>[1]</sup>。随着禽蛋生产与消费的日益增加, 蛋壳和蛋壳膜也随之大量产生, 这不仅对环境造成了严重的污染, 也是资源上的极度浪费。蛋壳与蛋壳膜中具有很多有效成分, 它们是饲料、食品、医药、化学、轻工等行业的宝贵原料<sup>[2]</sup>。国内外对蛋壳的研究和利用已有陆续报道<sup>[3]</sup>, 但有关蛋膜回收与利用的报道甚少。蛋膜的主要成分为蛋白质, 以糖蛋白的形式存在, 其中蛋白质有角蛋白、胶原蛋白(大部分为 I、V、X 型)、复合蛋白等<sup>[4]</sup>。蛋壳膜包括内蛋壳膜和蛋白膜两层结构。其中, 就胶原蛋白而言, 外膜中主要为 I 型胶原, 内膜主要为 I、V 型胶原。而 X 型胶原在两层结构中均被发现<sup>[5]</sup>。按 2007 年的数据分析, 我国有 3100 万 t 禽

蛋产量, 则约有 340 万 t 的废弃蛋壳产生, 约有 17 万 t 的蛋壳膜产生。按 10% 的比例计算, 则每年大约有 1.7 万 t 的胶原蛋白被废弃。因此, 开展对蛋壳膜的研究工作具有极其重要的意义。

本研究对实验制得的蛋膜蛋白进行光谱分析, 并采用化学发光法测定蛋膜蛋白及其酶解液对超氧阴离子自由基的清除能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 原料

鸡蛋壳由北京德青源农业科技股份有限公司提供。

#### 1.1.2 试剂

碱性蛋白酶(alkaline protease, 酶活为 120329.3U/g)、木瓜蛋白酶(papain, 酶活为 75590U/g)及中性蛋白酶

收稿日期: 2008-12-22

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD05A17); 农业部“948”项目(2006-G36)

作者简介: 周艳华(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产食品科学与生物技术。

E-mail: zhouyanhua@webmail.hzau.edu.cn

\* 通讯作者: 马美湖(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肉类、蛋品科学理论与技术。E-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

(neutral protease, 酶活为 82819.2U/g) 广西南宁庞博生物工程有限公司; 胰蛋白酶(trypsin, 酶活为 82819.2U/g) 楷洋生物技术有限公司; 胃蛋白酶(pepsin, 酶活为 120997U/g) Biosharp 公司(进口分装)。

乙酸、盐酸、氢氧化钠、浓硫酸、碳酸钠、碳酸氢钠、硫酸铜、硫酸钾、溴化钾、甲醛及乙醚均为市售分析纯; 邻苯三酚、鲁米诺 中国国药集团上海化学试剂公司; 3-巯基丙酸(纯度 $\geq 99\%$ )为进口分装产品。

### 1.1.3 仪器与设备

HPCL 型超微弱化学发光测量仪(测试条件: Hi-V 800; 增益为 1; 记录波长范围为 180~800nm; 温度为 30℃)中国科学院生物物理研究所; PHS-3C 酸度计和磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂; UV1800 紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; NEXUS-470 傅立叶红外光谱仪 Nicolet Instrument Corp; FW100 万能粉碎机 天津台斯特仪器有限公司; H1850 高速离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司; QSL-08 消化炉; QSY 型自动定氮仪; 超声波清洗仪; 水浴恒温振荡器; 马弗炉; 恒温水浴锅。

## 1.2 方法

### 1.2.1 蛋膜蛋白的提取

准确称取 10g 蛋膜, 加入 500ml 含 1% 的 3-巯基丙酸的 10%(V/V)乙酸溶液, 置 90℃ 水浴恒温振荡器中搅拌 8h, 取出, 以 8000r/min 的速度离心 10min, 得澄清溶液。用 NaOH 溶液调 pH 值至等电处(pH5.0), 室温静置 30min, 以 8000r/min 的速度离心 10min, 弃上清得乳白色蛋白质沉淀。用 10% 的乙酸再次将其溶解, 透析, 取出, 备用。

### 1.2.2 蛋膜蛋白的光谱分析

#### 1.2.2.1 蛋膜蛋白溶液的紫外光谱分析

将提取得到的蛋膜蛋白冷冻干燥样品及标准 I 型胶原溶解于 0.5mol/L 醋酸溶液中, 配成 1mg/ml 的蛋白溶液, 在 190~300nm 波长处的近紫外光区进行扫描。

#### 1.2.2.2 蛋膜蛋白的傅立叶红外光谱(FT-IR)分析

将一定量干燥的 KBr 和蛋膜蛋白冻干品置于玛瑙研钵中, 研磨均匀, 成粉末状, 装样, 手动压片, 取出样品小心放入样品室。采用 Nicolet-SX-170 傅立叶红外光谱仪对样品在 400~4000 $\text{cm}^{-1}$  扫描, 扫描信号累加 200 次, 分辨率为 4 $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.2.3 蛋膜蛋白的酶解实验设计

取蛋白质浓度为 1mg/ml 的蛋膜蛋白溶液 50ml, 加入相应 pH 值的缓冲溶液 50ml, 分别在碱性蛋白酶、胰

蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶及胃蛋白酶各自的最适温度、pH 值条件下, 对底物进行水解, 酶解时间为 2h, 各种蛋白酶的酶解条件如表 1 所示。

表 1 不同蛋白酶对蛋膜蛋白的酶解条件  
Table 1 Enzymolysis conditions of SEP by different proteases

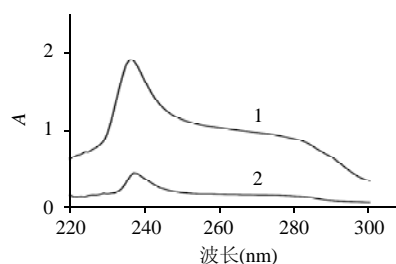
酶制剂的种类	加酶量(U/g)	温度(℃)	pH	时间(h)	底物浓度(mg/ml)
碱性蛋白酶	15000	50	8	2	0.5
胰蛋白酶	15000	50	8	2	0.5
中性蛋白酶	15000	50	7	2	0.5
木瓜酶	15000	50	6.5	2	0.5
胃蛋白酶	15000	37	2	2	0.5

### 1.2.4 蛋膜蛋白酶解液对超氧阴离子的清除作用

用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系: 鲁米诺用 0.05mol/L NaOH 溶液配成浓度为 0.05mol/L 的溶液, 在避光处保存, 临用前用双蒸水稀释成 1mmol/L 的溶液。邻苯三酚用 1mmol/L HCl 配成 0.01mol/L 的溶液, 4℃ 冰箱中保存, 使用前用双蒸水稀释成  $6.25 \times 10^{-4}$  mol/L 的溶液。实验前将现配的 0.05mol/L pH 10.2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(含 0.1mmol/L EDTA) 与 1mmol/L 鲁米诺按照体积比 2:1 混合成鲁米诺-碳酸盐缓冲液。测定时, 向发光池中注入 100 $\mu\text{l}$  蛋膜蛋白及其酶解液(以样品缓冲液为对照), 然后注入  $6.25 \times 10^{-4}$  mol/L 邻苯三酚 50 $\mu\text{l}$ , 最后加入鲁米诺-碳酸盐缓冲液 850 $\mu\text{l}$ , 启动反应(30℃), 间隔 2s 记数发光强度, 测定 180s 的总发光积分强度。实验均重复 3 次, 曲线面积积分表示相对发光强度, 计算抑制率<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋膜蛋白溶液的紫外光谱分析



1. 蛋膜蛋白; 2. 胶原蛋白。  
图 1 蛋膜蛋白紫外吸收光谱  
Fig.1 UV spectrum of SEP

一般具有共扼双键的物质都具有紫外吸收, 在 20 种基本氨基酸中, 有 4 种具有共扼双键, 包括 Trp、Tyr、Phe 和 His, 其中 Trp 在 280nm 波长处的紫外吸收较强, 所以大多数蛋白质在 280nm 波长处都有表现出很强的紫

外吸收,因此可通过对280nm波长处的紫外吸光度的测量实现蛋白质溶液的定量分析。但文献[7]显示,蛋膜蛋白中含Trp约为1.50%,在280nm波长处没有太强的吸收峰出现。从图1可知,蛋膜蛋白溶液在大约238nm波长处有一强吸收峰,这是胶原蛋白的特征紫外吸收,且与I型胶原标品的最大吸收峰一致,这个吸收峰包括电子的 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \delta^*$ 跃迁产生的强吸收。

### 2.2 蛋膜蛋白的傅立叶红外光谱(FT-IR)分析

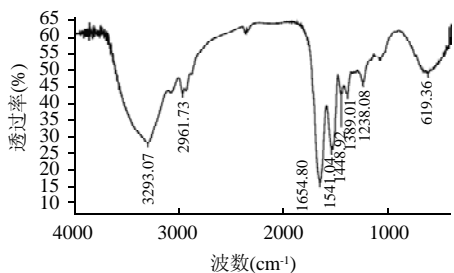


图2 蛋膜蛋白傅立叶红外光谱图谱  
Fig.2 FI-IR spectrum of SEP

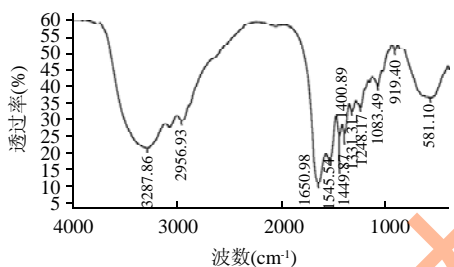
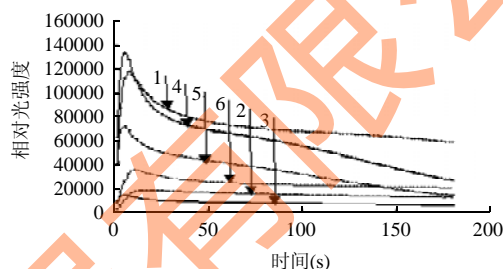


图3 标准I型胶原蛋白傅立叶红外光谱图谱  
Fig.3 FI-IR spectrum of collagen type I

蛋膜蛋白和标准I型胶原蛋白的FT-IR谱图分别见图2、3。由文献[8]和[9]可知,3293.07 $\text{cm}^{-1}$ 处的强吸收归属于蛋膜蛋白酰胺A带的N-H伸缩振动,3084 $\text{cm}^{-1}$ 处的弱吸收为酰胺B带的C-N伸缩振动引起的特征吸收峰。酰胺I带的特征吸收频率在1600~1700 $\text{cm}^{-1}$ 是由蛋白多肽骨架的C=O伸缩振动引起,其吸收最强,常被用于蛋白质的二级结构分析。蛋膜蛋白酰胺I带出现在1654.80 $\text{cm}^{-1}$ 处,标准I型胶原蛋白的酰胺I带出现在1650.98 $\text{cm}^{-1}$ ,两者相近,表明蛋膜蛋白中的胶原蛋白较好地保持了其二级结构。1541.04 $\text{cm}^{-1}$ 为蛋膜蛋白酰胺II带的特征吸收频率,它是由胶原蛋白的C-N伸缩振动与N-H弯曲振动引起的。1200~1400 $\text{cm}^{-1}$ 间的谱带归属于酰胺III带,是由C-N伸缩振动和N-H弯曲振动引起的。1238.08 $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为N-H弯曲振动引起的酰胺III谱带的特征吸收。比较图2、3可知,蛋膜蛋白和标准I型胶原蛋白的红外图谱基本一致,这进一步表明,所提蛋膜蛋白中主要为I型胶原蛋白。

### 2.3 蛋膜蛋白酶解液对超氧阴离子的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生超氧阴离子,以鲁米诺为发光剂,超氧阴离子激发鲁米诺,鲁米诺由激发态返回到基态时产生化学发光。结果表明,本化学发光体系启动后,化学发光强度上升迅速,在6s左右时即达到最大值,随后开始缓慢下降,在180s附近各发光曲线开始重叠。蛋膜蛋白及其酶解液对超氧阴离子的清除作用分别见图4(空白组图未给出)。可见体系加入样品后,发光曲线峰值降低,曲线面积减少。表明,蛋膜蛋白及其酶解液能清除体系中的超氧阴离子。各样品的抑制率及半抑制浓度见表2。



1.蛋膜蛋白溶液; 2.碱性蛋白酶酶解液; 3.胰蛋白酶酶解液; 4.中性蛋白酶酶解液; 5.木瓜蛋白酶酶解液; 6.胃蛋白酶酶解液。

图4 蛋膜蛋白及其酶解液对邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系产生超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of SEP and its hydrolysates on  $\text{O}_2^{\cdot-}$  induced by pyrogallol-luminol system

表2 蛋膜蛋白及其酶解液对邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系产生超氧阴离子自由基的清除作用比较

Table 2 Scavenging effect of SEP and its hydrolysates on  $\text{O}_2^{\cdot-}$  induced by pyrogallol-Luminol system

样品	浓度(mg/ml)	清除率(%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
蛋膜蛋白	1	34.97	1.430
碱性蛋白酶酶解液	0.5	90.01	0.278
胰蛋白酶酶解液	0.5	92.54	0.270
中性蛋白酶酶解液	0.5	19.95	1.253
木瓜蛋白酶酶解液	0.5	48.53	0.515
胃蛋白酶酶解液	0.5	61.32	0.408

由表2可知,胰蛋白酶酶解液具有最强的自由基清除能力,其IC<sub>50</sub>最小,为0.270mg/ml。其次为碱性蛋白酶酶解液,其清除率与胰蛋白酶酶解液清除率相当。这可能与两者均属丝氨酸蛋白酶家族有关。

### 3 结论

活性氧的测定方法有很多种,如核磁共振法、比色法、荧光法、气相色谱法、高效液相色谱法、示踪原子法和免疫分析法等,而化学发光法由于其灵敏快捷而被广泛用来测定各种活性氧,因此本实验首先对制得的蛋膜蛋白进行了光谱分析,由紫外扫描及FI-IR红外光谱分析可初步断定,蛋膜蛋白中主要成分为I型胶

原, 且较大程度地保留了其三股螺旋结构。采用不同的酶制剂对蛋膜蛋白溶液进行酶解并得相应的酶解液, 并采用电脑化学发光仪测定了蛋膜蛋白及其酶解液清除超氧阴离子自由基的能力。结果表明, 蛋膜蛋白及其酶解液均具有较好的超氧阴离子清除能力, 且胰蛋白酶酶解液的  $IC_{50}$  最小, 为 0.270mg/ml。

#### 参考文献:

- [1] 马美湖. 我国蛋与蛋制品加工重大关键技术筛选研究报告[C]//中国蛋品科技大会论文集, 2004: 1-20.
- [2] 皮钰珍. 鸡蛋壳膜资源的开发与应用前景[J]. 食品科技, 2006(4): 128-130.
- [3] 周秀琴. 蛋壳的开发与应用[J]. 中国食品, 2004, 1(3): 13-15.
- [4] MARUTA K, MIYAZAKI H. Poultry eggshell strengthening composition, Japan: WO/1998/014560[P]. 1998-09-04.
- [5] DAVIS C, REEVES R. High value opportunities from the chicken egg. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation [R]. Kingston, 2002.
- [6] 邓乾春, 陈春艳, 田斌强, 等. 化学发光法测定白果白蛋白的体外抗氧化活性[J]. 中草药, 2007, 38(5): 685-690.
- [7] YI F, GUO Z X, ZHANG L X, et al. Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility[J]. Biomaterials, 2004, 25(19): 4591-4599.
- [8] PURNA S K, BABU M. Studies on *Rana tigerina* skin collagen[J]. Comp Biochem Physiol B, 2001, 128(1): 81-90.
- [9] LI H, CHEN H L, LUO R, et al. The interaction between collagen and an aluminum tanning agent[J]. Macromol Biosci, 2003(3): 344-346.