燕窝消化特性的体外实验

王 鑫[1]，范群艳[2]，连建梅[2]，邹锋扬[2]，王雅馨[2]，
李建贵[2]，陈茂深[*1]，钟 芳[1]，李 玥[1]
（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 厦门市燕之屋丝浓食品有限公司，福建 厦门 361101）

摘要：燕窝是传统的滋补食品，营养价值丰富，但是关于其消化特性的报道较少。现通过体外实验模拟炖煮燕窝的胃肠消化过程，结果如下：炖煮燕窝经过消化后，蛋白质溶解度从13.85%增加到47.23%，总糖溶解度从7.49%增加到39.02%，唾液酸溶解度从18.69%增加到44.24%。其中17.41%的唾液酸以游离形式存在，11.85%与糖链结合，14.98%与蛋白质结合。燕窝蛋白质水解度为11.54%，生成的多肽中50%为低聚肽。单糖组成分析表明，燕窝中O型糖蛋白溶解度较低，N型糖蛋白溶解度更高。糖蛋白染色结果显示，糖蛋白被水解成3.7×10^4~1.5×10^5的若干条带，且糖链与蛋白质结合紧密。消化过程中未溶解的蛋白质二级结构以β-折叠和α-螺旋为主。作者对燕窝消化过程中的化学组成进行了全面测定，为进一步开发高胃肠消化特性的燕窝新产品提供理论支撑。

关键词：燕窝；糖蛋白；消化；唾液酸
中图分类号：TS 219　**文章编号：**1673-1689(2021)08-0070-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.08.009

Study on *in vitro* Digestion Characteristics of Bird's Nest

WANG Xin[1]，*FAN Qunyan*[2]，*LIAN Jianmei*[2]，*ZOU Fengyang*[2]，*WANG Yaxin*[2]，
LI Jiangui[2]，*CHEN Maoshen*[*1]，*ZHONG Fang*[1]，*LI Yue*[1]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122,China; 2. Xiamen Yanzhiwu Sinong Food Co., Ltd., Xiamen 361101,China)

Abstract: Bird's nest is a traditional nourishing food with rich nutritional value, however, there are few reports on its digestive characteristics. The gastrointestinal digestion of stewed bird's nest was simulated through *in vitro* experiments in this research. The results showed that the solubility of protein, total sugar acid after the digestion of stewed bird's nest increased from 13.85% to 47.23%, from 7.49% to 39.02%, and from 18.69% to 44.24%, respectively. For sialic acid, 17.41% existed in free form, 11.85% bound to glycan and 14.98% bound to protein. The degree of hydrolysis of bird's nest protein was 11.54%, and 50% of the peptides were oligopeptides. Monosaccharide composition analysis showed that the solubility of O-type glycoprotein was lower than that of N-type glycoprotein. Glycoprotein staining showed that glycoproteins were hydrolyzed into several bands between 3.7×10^4~1.5×10^5, and the glycochain was tightly bound to the protein. The secondary structure of undissolved proteins during digestion was mainly β-fold and α-helix. The changes of chemical composition of the bird's nest during digestion process was comprehensively studied in this

收稿日期：2020-09-29
***通信作者：**陈茂深(1986—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事食品胶体研究。E-mail：chenmaoshen@jiangnan.edu.cn

work, which could provide theoretical support for further development of new bird's nest products with high gastrointestinal digestion characteristics.

Keywords: bird's nest, glycoprotein, digestion, sialic acid

燕窝为雨燕科金丝燕属鸟类分泌的唾液与其羽绒混合凝结而成的物质,营养价值丰富,具有多种生物活性[1]。燕窝主要营养成分为蛋白质、碳水化合物、唾液酸,同时含有微量的脂质和无机元素。唾液酸是燕窝的核心物质,是脑神经节苷脂的有益成分。燕窝的生物活性和其消化特性有关。研究发现,燕窝经过消化后抗氧化活性显著提高,能够保护细胞免受氧化损伤[2]。Ghassem 等发现燕窝模拟消化产物中的多肽组分具有较高的抗氧化能力,分离纯化发现其中 PFHPY 和 LLGDP 两种肽能够保护 HepG2 细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化损伤[3]。Wong 等研究发现,消化后的燕窝具有更强的美白活性和成骨活性,能够抑制酪氨酸酶的活性,减少小鼠黑色素瘤细胞中的黑色素分泌量,同时促进成骨细胞增殖,增加小鼠的骨强度和真皮厚度[4]。

唾液酸对酪氨酸酶活性具有剂量依赖性的抑制作用,对皮肤有美白功效[5]。多肽和唾液酸是消化产物中的主要功能活性成分。目前关于燕窝的研究主要集中在原料的品质伪劣鉴定和生物活性评价,关于燕窝消化特性的研究没有详尽的报道。作者采用 Standard 法模拟炖煮燕窝体外胃肠的消化,对燕窝蛋白和碳水化合物的含量和组成进行了全面的测定分析,为进一步开发高胃肠消化特性的燕窝新产品提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

燕窝:市售;胃蛋白酶、胰蛋白酶:Sigma 公司产品;鼠李糖,半乳糖,甘露糖,邻苯二胺盐酸盐,国药化学试剂有限公司产品;氨基葡萄糖、*D*-半乳糖胺盐酸盐、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、唾液酸:上海创赛有限公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

傅立叶红外光谱仪:美国赛默飞世尔科技公司;PowerPac™ Basic Power Supply 基础电泳仪电源:伯乐生命医学产品上海有限公司产品;摇摆式高速万能粉碎机:温岭市林大机械有限公司产品;DL-5-A 低速台式大容量离心机、KDN-08C 数显温控消化炉:上海新嘉电子有限公司产品;UV-2802 紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;KDN-103F 凯氏定氮仪:上海纤检仪器有限公司产品;高效液相色谱仪 Waters 2695(Waters 2475 荧光检测器、Waters 2998 紫外检测器):美国 Waters 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理 将燕窝研磨成粉末,用 60 目筛子过滤,收集过滤粉末,装袋,-20 ℃贮藏。

1.3.2 模拟体外消化过程 利用 Standard 法模拟胃肠消化:称量 0.8 g 燕窝粉末,溶于 10 mL 水中,沸水水浴 1 h,冷却至室温[6]。将燕窝溶液与 10 mL 的模拟胃液混合于 50 mL 离心管内,37 ℃恒温振荡水浴,HCl 调节 pH 使其始终保持在 2.0±0.2,在 100 r/min 的速度下模拟胃阶段消化,每个时间点单独做一个消化管,每隔 30 min 依次用碱液调节 pH 至 8.0 灭酶,以 4 500 *g* 离心分离上清液,-20 ℃贮藏,分析 0,30,60,90,120 min 的消化情况。胃消化结束后,进入小肠消化阶段。加入 16 mL 模拟肠液,NaOH 调节 pH 使其始终保持在 7.0±0.2,补水使体系达到 40 mL。继续在 100 r/min 的搅拌速度、37 ℃的温度下进行肠阶段体外消化,每个时间点单独做一个消化管,每隔 30 min 将一个离心管进行沸水浴灭酶,4 500 *g* 离心分离,上清液-20 ℃贮藏,离心沉淀物进行冻干储藏,分析 150,180,210,240 min 的消化情况。

1.3.3 基本成分测定 蛋白质含量测定:参照国标 GB 5009.5—2016 凯氏定氮法,蛋白质折算系数 6.25,分别测定燕窝原料蛋白质含量和消化上清液中的水溶性蛋白质含量;总糖含量测定:参照国标 GB/T15672—2009 苯酚硫酸法,葡萄糖为标准品,分别测定燕窝原料总糖含量和消化上清液中的总糖含量。

1.3.4 水解度测定 参考杨文博等人的方法,采用

甲醛滴定法[7]。

水溶性蛋白质水解度(%)=$\rho \times V/m$　　(1)

式中:ρ 为消化上清液中游离氨基酸态氮质量浓度,g/mL;V 为消化液体积,mL;m 为消化上清液中的燕窝蛋白总氮质量,g。

1.3.5　多肽测定方法　参考 GB31645—2018 胶原蛋白肽的测定。色谱条件:TSK gel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm;柱温:30 ℃;流动相:乙腈:水:三氟乙酸,体积比为 40:60:0.05。检测器:紫外检测器 220 nm;流量:0.5 mL/min;进样体积 10 μL。

1.3.6　蛋白质二级结构测定方法　采用 Nicolet iS50 FTIR 型傅立叶变换红外光谱仪测定。扫描次数 32 次,入射角 45°,扫描波数范围 4 000~600 cm^{-1},分辨率为 4 cm^{-1}。测试样品粉末衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR),每个样品重复采集 3 次。

1.3.7　唾液酸测定方法　参考袁玲和张启伟等人的方法,采用领苯二胺(OPD)柱前衍生法测定燕窝原料和消化上清液的唾液酸含量[8-9]。

取 50 mg 原料溶解在 40 mL 的体积分数 1%磷酸溶液中,沸水浴水解 20 min,冷却后加入 20 mg/mL 的邻苯二氨盐酸盐溶液 1 mL,80 ℃避光水浴 40 min,水系滤膜过滤,准备进样。

游离态唾液酸测定,取 1 mL 液体样品,加入 20 mg/mL 的邻苯二氨盐酸盐溶液 1 mL,50 ℃避光水浴 2.5 h,改变温度至 4 ℃继续衍生 48 h,水系滤膜过滤,准备进样。

聚糖态唾液酸测定,取 1 mL 液体样品,按 体积比 1:1 加入 Sevage 试剂(V(三氯甲烷):V(正丁醇)=4:1)反复萃取除去蛋白质,加入 20 mg/mL 的邻苯二氨盐酸盐溶液 1 mL,80 ℃避光水浴 40 min,水系滤膜过滤,准备进样。

蛋白态唾液酸测定,取 1 mL 消化上清液酸解,测定清液中唾液酸总量。

未溶解唾液酸测测定,取 50 mg 燕窝消化后的离心沉淀物,溶解在 40 mL 的 1%体积分数磷酸溶液中,沸水浴水解 20 min,80 ℃避光水浴 40 min,水系滤膜过滤,准备进样。

1.3.8　单糖测定方法　参考戴军等人方法,采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法测定燕窝原料和消化上清液的单糖组成[10]。

1.3.9　蛋白质相对分子质量测定方法　取消化液与上样缓冲液等体积均匀混合,100 ℃加热 3 min 变性处理,8 000 r/min 离心 3 min。还原电泳条件:10 g/dL 分离胶,5 g/dL 浓缩胶,上样量 10 μL。对燕窝糖蛋白中的蛋白和糖链分别进行单独染色,考马斯亮蓝 R-250 进行蛋白染色,高碘酸-席夫碱法进行糖染色[11]。Image Lab 图像软件用于 SDS-PAGE 凝胶分析。

1.3.10　数据统计与分析　所有数据均进行 3 次重复测定,采用 SPSS19.0 和 Origin 8.0 进行处理和统计分析。

2　结果与讨论

2.1　燕窝主要组成成分

蛋白质和碳水化合物是人类生命活动的必需营养物质,而唾液酸是脑神经节苷脂的重要组分,直接参与神经系统改善和大脑发育。燕窝蛋白主要为唾液酸糖蛋白,其主要成分如表 1 所示。

表 1　主要化学成分

Table 1　Main chemical composition of samples

项目	质量分数/%
唾液酸	13.25±0.15
蛋白质	67.86±3.84
总糖	16.45±1.83

蛋白质质量分数为 67.86%,唾液酸质量分数 13.25%,其余单糖的总质量分数 16.45%。燕窝的化学组成与其品种、产地关系紧密,Hamzah 等对马来西亚、印度尼西亚等不同产地燕窝的蛋白质和唾液酸分析,蛋白质质量分数在 59.8%~73.8%,唾液酸质量分数 10%左右,与研究结果一致[1]。研究发现,日常饮食中的高蛋白质食物如黄豆,其蛋白质质量分数仅为 36.3%,远低于燕窝[12]。燕窝是唾液酸质量分数最高的食物,而奶粉中的唾液酸质量分数仅为 0.05%[13]。

对燕窝中单糖组成进行测定,结果如表 2 所示。可以看出燕窝总糖主要由 6 种单糖组成,其中,半乳糖质量分数最高,达到 6.59%,其次为 N-乙酰半乳糖胺 4.15%和甘露糖 3.22%。研究发现不同地区如越南、印度尼西亚和泰国的燕窝单糖组成中,N-乙酰葡萄糖胺(4.76%~5.64%)、N-乙酰半乳糖胺(3.79%~4.54%)和半乳糖(4.58%~5.43%)质量分数较高,在其他定量中,发现鼠李糖(0.02%)和木糖(0.21%)。燕窝单糖质量分数的差异受产地和加工过程影响[1]。

表 2 燕窝原料单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of raw materials of bird's nest

单糖	质量分数/%
甘露糖	3.22±0.53
鼠李糖	2.08±0.04
N-乙酰葡萄糖胺	0.65±0.04
半乳糖	6.59±1.58
N-乙酰半乳糖胺	4.15±0.04
氨基葡萄糖	3.78±0.05

2.2 消化过程中溶解燕窝蛋白质、总糖、唾液酸溶解度变化

燕窝的生物活性和其消化特性有关,对燕窝消化过程中蛋白质、总糖、唾液酸的溶解性进行研究,结果如图 1 所示。

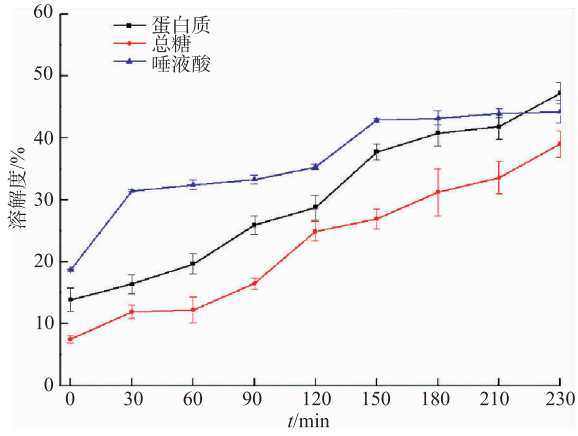


图 1 消化过程中燕窝蛋白质、总糖、唾液酸溶解度变化

Fig. 1 Changes of solubility of protein, total sugar and sialic acid during digestion of bird's nest

消化初始阶段,燕窝蛋白质溶解度为 13.85%,胃阶段消化 2 h 后增加到 28.75%,肠阶段继续消化 2 h 后增加到 47.23%。总糖溶解度为 7.49%,经过胃消化 2 h 后增加到 24.92%,肠消化 2 h 后增加到 39.02%。整个消化过程中蛋白质和总糖的溶解度呈显著线性正相关(r=0.984,P<0.01),溶解速率较为一致,糖与蛋白质结合紧密,共同溶解到消化上清液中。唾液酸溶解度的变化情况与蛋白质、总糖不同,炖煮燕窝消化开始时刻的唾液酸溶解度为 18.69%,胃消化前 30 min 内溶解度快速增加,达到 31.45%,30 min 后溶解速率降低,溶解度缓慢增加,胃消化 2 h 后仅为 35.34%。肠消化过程中唾液酸溶解度的变化与胃阶段类似,前 30 min 内唾液酸溶解度再次快速增加,达到 42.85%,30 min 后溶解度趋于平缓,肠消化 2 h 后为 44.24%。

2.3 消化过程中蛋白质水解度和多肽相对分布

水解度可以表征蛋白质肽键的断裂程度,多肽相对分布表征蛋白质水解产物的具体情况。燕窝蛋白质的水解度如图 2(a)所示。

胃肠消化后,燕窝总蛋白质的水解度分别为 5.47%、12.12%。消化上清液中水溶性蛋白质的水解度分别为 13.48%、18.13%。胃消化阶段,水溶性蛋白质的水解主要发生在消化前 30 min。肠消化阶段,水溶性蛋白和总蛋白质的水解度呈现显著正相关,胰蛋白酶有助于提高燕窝蛋白的溶解度。郭立春等用胰蛋白酶水解胶原的总蛋白质水解度为 20%,和胶原蛋白相比,燕窝水解度较低[14]。

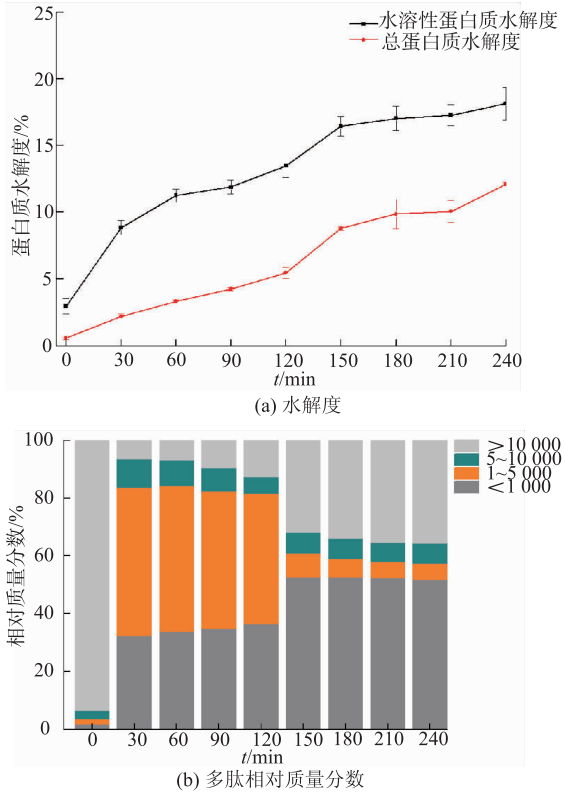


图 2 燕窝消化过程中水解度和多肽相对质量分数变化

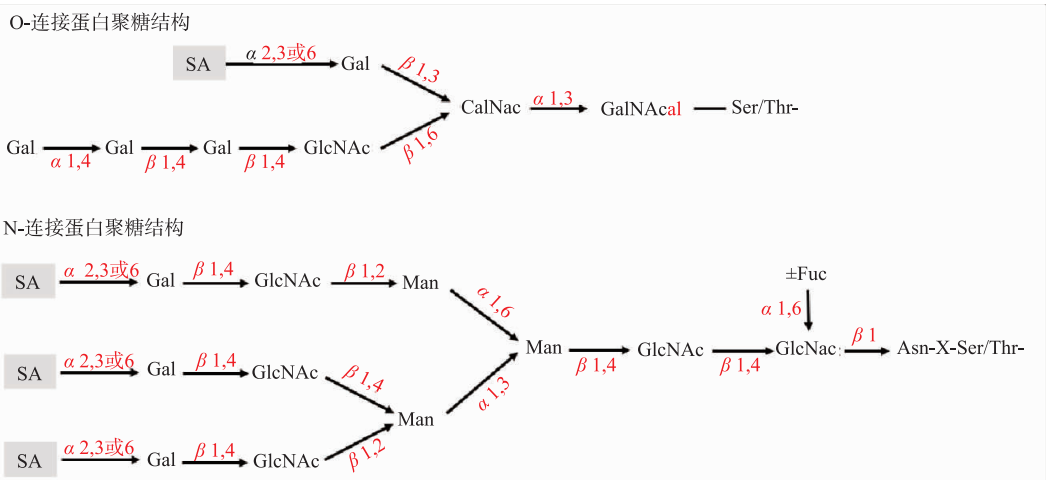
Fig. 2 Changes of hydrolysis degree and molecular weight of polypeptide during digestion of bird's nest

多肽相对分布如图 2(b)所示,消化开始时刻,炖煮燕窝溶液中主要为蛋白质。胃消化前 30 min,燕窝中的水溶性蛋白质被快速水解成低聚肽

(<1 000) 和中等相对分子质量肽(1 000~5 000),而大相对分子质量肽段(5 000~10 000)和蛋白质(>10 000)相对质量分数较少。30 min 后多肽相对分布趋于稳定,低聚肽和蛋白质质量分数略有增加,中等相对分子质量和大相对分子质量肽段相对质量分数减少。胃消化 2 h 后,低聚肽、中等相对分子质量肽段和大相对分子质量肽段的相对质量分数分别为 36.6%、45%、5.96%,而蛋白质相对质量分数为 12.47%。燕窝蛋白为酸性蛋白质,其中相对分子质量 1.28×10^5 和 1.06×10^5 蛋白质为相对质量分数最高的蛋白质,这两种蛋白的等电点 pH≤3,进入胰阶段,消化液 pH 由酸性变成中性,蛋白质更易溶解从而被胰蛋白酶水解。肠消化前 30 min,在胰蛋白酶的作用下,多肽相对分布发生显著变化。低聚肽和蛋白质相对质量分数分别增加 15.28%、23.06%,中等相对分子质量肽减少 39.3%,大相对分子质量肽相对质量分数没有显著变化,30 min 后多肽相对分布趋于稳定。肠消化 2 h 后,低聚肽、中等相对分子质量肽段和大相对分子质量肽段相对质量分数分别为 51.88%、5.65%、6.94%,蛋白质相对质量分数为 35.53%。

2.4 消化过程中单糖质量分数变化

Yagi 等研究发现燕窝中的糖与蛋白质共价结合,同时含有 O 连接型和 N 连接型糖蛋白[15]。N 型和 O 型糖蛋白的糖链并不是单一的直链糖,存在多个分支。N-乙酰半乳糖胺是 O 型糖蛋白中特有的单糖,可以表征 O 型糖蛋白的溶解度。N 型糖蛋白中复杂型聚糖结构的唾液酸含量最高,N-乙酰半乳糖胺、半乳糖和甘露糖是 N 型聚糖中最主要的糖,其糖链的结构如图 3 所示。燕窝的单糖组成有助于判断消化过程中溶解的燕窝糖蛋白的类型。燕窝消化后的单糖包括甘露糖、鼠李糖、N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺和氨基葡萄糖。不同单糖之间的溶解度存在差异,结果见表 3。



GalNac: N-乙酰半乳糖胺,GlcNac: N-乙酰葡糖糖胺,Gal: 半乳糖,Man: 甘露糖,Fuc: 岩藻糖,SA: 唾液酸,Asn: 天冬酰胺,Ser: 丝氨酸,Thr: 苏氨酸,X: 未知氨基酸。

图 3 燕窝唾液酸聚糖结构

Fig. 3 Structure of sialic acid glycan from bird's nest

消化开始时刻 N-乙酰半乳糖胺的溶解度仅为 3.92%,经过胃肠消化后溶解度为 24.73%,O 型糖苷键在中性和碱性条件下一般较为稳定,在酸性条件更易被水解。该糖溶解度低说明 O 型糖蛋白不易被消化。胃肠消化后,N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖和甘露糖的溶解度达到 49.65%、46.61%、16.36%。N 型糖蛋白溶解度更高,可能是因为 N 型糖苷不如 O 型糖苷稳定性好,它在水中容易水解,推测溶出的 N 型糖蛋白以复杂型和杂合型为主。对燕窝消化离心上清液中以聚糖链形式存在的 4 种单糖相对含量进行相关性分析,结果如表 4 所示。糖链中的单糖均呈显著正相关,说明燕窝中的糖链结构完整,胃肠消化过程中燕窝的糖链未被水解。

2.5 消化过程中唾液酸存在形式和质量分数变化

唾液酸是燕窝中最具有价值的物质,在哺乳动物大脑发育的过程中不可或缺。燕窝中的唾液酸主要结合在糖蛋白的糖链末端,少量以游离和聚糖的形式存在。外源性含唾液酸的食物在哺乳动物的代

表 3　燕窝消化过程中单糖溶解度

Table 3　Monosaccharide dissolution rate during the digestion of bird's nest

%

消化时间/min	甘露糖	鼠李糖	N-乙酰葡萄糖胺	半乳糖	N-乙酰半乳糖胺	氨基葡萄糖
0	4.30±0.33	0.20±0.06	3.92±0.44	12.82±1.24	3.92±1.30	3.64±0.47
30	7.43±0.51	1.57±0.21	4.35±0.35	13.76±1.03	8.27±1.71	4.12±0.95
60	8.65±0.76	1.91±0.11	4.54±0.57	15.6±0.33	13.39±0.38	5.73±0.65
90	9.62±0.25	2.29±0.16	16.74±0.35	16.34±0.33	14.14±0.95	5.94±0.62
120	10.48±0.49	2.76±0.34	18.44±0.79	24.72±1.30	15.2±0.79	11.62±1.10
150	11.31±0.66	4.36±0.24	34.31±0.82	29.32±2.05	15.74±1.75	15.72±1.74
180	12.37±0.35	8.91±0.28	36.7±1.70	34.92±0.40	19.15±1.24	15.86±0.44
210	15.38±0.33	9.07±0.76	49.24±1.13	37.63±1.68	23.78±2.06	16.93±0.25
240	16.36±0.82	16.46±0.37	49.65±2.97	46.61±1.87	24.73±2.11	18.33±0.31

表 4　燕窝单糖相关性分析

Table 4　Correlation analysis of bird's nest monosaccharide

单糖	甘露糖	N-乙酰葡萄糖胺	半乳糖	N-乙酰半乳糖胺
甘露糖	1.000	0.940**	0.939**	0.991**
N-乙酰葡萄糖胺	0.940**	1.000	0.964**	0.916**
半乳糖	0.939**	0.964**	1.000	0.916**
N-乙酰半乳糖胺	0.991**	0.916**	0.916**	1.000

**P<0.01 时,具有显著相关。

谢研究表明，游离唾液酸虽然有利于人体吸收,但是单体唾液酸在体内的滞留时间太短,无法充分吸收利用。与蛋白质结合的唾液酸可以延长其在体内的滞留时间,但是难以被转化吸收。和低聚糖或者聚糖肽结合的唾液酸在体内的滞留时间合适,同时也有利于吸收利用[16]。燕窝唾液酸在消化过程中的存在形式和质量分数变如图 4 所示。

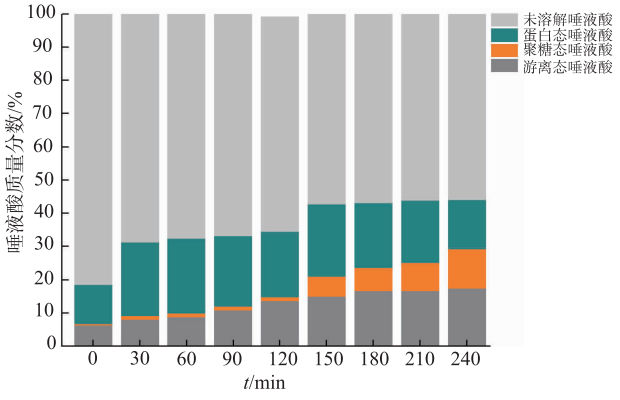


图 4　燕窝消化过程中唾液酸的存在形式和质量分数变化

Fig. 4　Changes of sialic acid in the process of bird's nest digestion

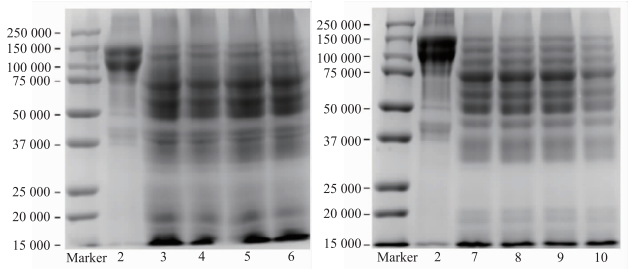
消化开始时刻，游离态唾液酸质量分数为 6.42%,胃消化 2 h 后达到 13.69%,肠消化 2 h 后达到 17.41%。胃阶段,游离态唾液酸质量分数明显增加,主要是受胃阶段低 pH 的影响。胃消化过程中,聚糖态唾液酸质量分数始终维持在 1%左右，而蛋白态唾液酸质量分数在消化前 30 min 内增加了 10%,之后一直维持在 20%左右。胃消化过程中,胃蛋白酶在远离燕窝糖基化的位点作用,唾液酸与蛋白质稳定结合。肠阶段,聚糖态唾液酸质量分数明显增加,肠消化2 h 后达到 11.85%,蛋白态唾液酸质量分数减少了 6.82%，推测胰蛋白酶在靠近燕窝蛋白糖基化的位点作用，生成更多的聚糖态唾液酸。原料中的唾液酸经过胃肠消化后 17.41%以游离形式存在,11.85%与聚糖结合,14.98%与蛋白质结合,仍有 55.76%无法溶解到消化上清液中,唾液酸总的消化利用率较低，且聚糖态唾液酸含量较少,无法被有效吸收。

2.6　消化过程中燕窝糖蛋白结合程度分析

通过电泳蛋白质染色和糖染色分析消化过程中糖链和蛋白质的结合程度,结果如图 5 和图 6 所示。

燕窝蛋白以大分子糖蛋白为主,相对分子质量

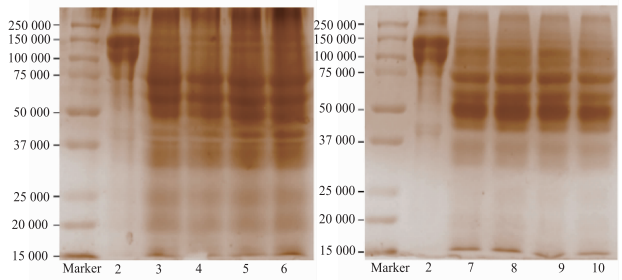
128 000 和 108 000,糖染颜色显著。Zhang 等研究发现相对分子质量为 128 000 和 106 000 蛋白质占总蛋白质质量分数 80%左右，唾液酸化程度分别为 20%、17%[17]。胃消化的前 30 min 大分子蛋白质显著分解,50 000~75 000 处生成明显的蛋白质涂层,该段蛋白质的糖含量最高。37 000、20 000 的蛋白糖含量较低,15 000 处有小分子蛋白质的堆积条带,糖链的颜色最浅。胃阶段消化反应 30 min 后条带的类型没有明显变化。肠消化过程中,100 000~150 000 的大分子蛋白进一步降解,形成 137 000、128 000、106 000 三条清晰条带，这些大分子蛋白质具有抗消化性。50 000~75 000 模糊的蛋白质涂层降解为 50 000、60 000、73 000 蛋白质条带,其中 50 000 蛋白糖含量最高。20 000、15 000 处的蛋白质进一步降解形成多肽。整个消化过程中燕窝原料中的大分子糖蛋白被水解成集中在 37 000~150 000 的若干条条带,无法被进一步水解,糖链与蛋白质紧密结合。



2~10 为 0、30、60、90、120、150、180、210、240 min 的燕窝消化产物

图 5　燕窝消化过程中蛋白质相对分子质量分布

Fig. 5　Protein molecular weight distribution during digestion of bird's nest



2~10 为 0、30、60、90、120、150、180、210、240 min 的燕窝消化产物。

图 6　燕窝消化过程中聚糖相对分子质量分布

Fig. 6　Glycochain molecular weight distribution during digestion of bird's nest

2.7　消化过程中难溶性蛋白质的二级结构相对质量分数变化

蛋白质的二级结构是评价蛋白质空间构象及其稳定性的重要指标。燕窝消化过中存在部分蛋白质始终难以溶解,现测定燕窝原料及消化过程中难溶蛋白的二级结构,结果如表 5 所示。

表 5　消化过程中难溶于水的蛋白质二级结构质量分数

Table 5　Secondary structure content of water insoluble protein during digestion

时间/min	二级结构质量分数%			
	β-折叠	α-螺旋	无规则卷曲	β-转角
0	44.77±1.01	22.55±1.88	10.41±0.76	22.27±3.66
30	45.69±0.40	21.04±0.00	11.59±0.42	21.68±0.83
60	52.37±3.96	22.07±2.52	10.27±1.20	15.29±0.24
90	46.91±1.89	25.03±3.75	9.08±1.47	18.99±1.51
120	43.69±0.56	28.32±0.43	14.00±1.64	13.99±1.51
150	46.35±2.50	25.56±2.81	12.30±1.78	15.75±2.15
180	49.33±1.08	16.78±1.11	10.42±1.59	23.48±1.56
210	55.89±0.42	18.36±0.00	5.79±0.04	19.97±0.38
240	47.74±1.03	21.29±0.52	10.34±0.33	20.63±1.88

燕窝原料的二级结构中 β 折叠为 51%,α 螺旋 17%,无规则卷曲 13%,β 转角 19%。整个消化过程中难溶蛋白质的二级结构以 β 折叠和 α 螺旋为主,蛋白质空间结构的稳定性主要依靠 β 折叠的链间氢键和 α 螺旋的链内氢键等非共价键来维持。研究发现无规则卷曲、β 转角等无序结构有利于蛋白酶进行水解作用[18]。燕窝中的难溶蛋白质的无序结构含量较低,不利于酶进一步水解。

3　结　语

燕窝经过炖煮消化后，蛋白质溶解度仅为 47%,仍有 50%以上的蛋白质未溶解,推测其溶解性与蛋白质二级结构有关。蛋白质水解度 11.5%,未被全部水解成具有高抗氧化活性的低聚肽，相对分子质量 50 000~150 000 存在大量蛋白条带，没有被完全消化。总糖溶解度 39%,糖染结果显示消化过程中水溶性糖蛋白中的糖链与蛋白质结合紧密。唾液酸作为燕窝重要功能活性成分,消化后未溶解态唾液酸质量分数达到 56%,唾液酸利用率有待提高。游离态唾液酸含量有利于提高燕窝的美白活性，燕窝消化后游离态唾液酸质量分数仅为 17%,

需要进一步促进燕窝消化后游离态唾液酸的释放。聚糖态唾液酸相比游离态唾液酸吸收稳定性更强,燕窝消化后的聚糖态唾液酸质量分数仅为12%,需要进一步提高。多肽和唾液酸是燕窝的主要功能活性成分,建议通过高温炖煮或其他酶水解等方法对燕窝进行加工,以进一步提高燕窝中蛋白质的溶解性以及燕窝消化后多肽、游离态和聚糖态唾液酸含量,提高燕窝的生物活性和生物利用度。

参考文献:

[1] DAUD N A,MOHAMAD YUSOP S,BABJI A S,et al. Edible bird's nest:physicochemical properties,production,and application of bioactive extracts and glycopeptides[J]. **Food Reviews International**,2019,37(1):1-20.

[2] YIDA Z,IMAM M U,ISMAIL M. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant properties of edible bird's nest following simulated human gastro-intestinal digestion[J]. **BMC Complementary and Alternative Medicine**,2014,14(1):468.

[3] GHASSEM M,ARIHARA K,MOHAMMADI S,et al. Identification of two novel antioxidant peptides from edible bird's nest (*Aerodramus fuciphagus*) protein hydrolysates[J]. **Food & Function**,2017,8(5):2046-2052.

[4] WONG Z C,CHAN G K,WU K Q,et al. Complete digestion of edible bird's nest releases free N-acetylneuraminic acid and small peptides:an efficient method to improve functional properties[J]. **Food & Function**,2018,9(10):5139-5149.

[5] CHAN G K,WONG Z C,LAM K Y,et al. Edible bird's nest,an Asian health food supplement,possesses skin lightening activities:identification of N-acetylneuraminic acid as active ingredient[J]. **Journal of Cosmetics,Dermatological Sciences and Applications**,2015,05(4):262-274.

[6] MINEKUS M,ALMINGER M,ALVITO P,et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus[J]. **Food & Function**,2014,5(6):1113-1124.

[7] 杨文博,张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. 中国调味品,2014,39(3):88-90.

[8] 袁玲. 燕碎中唾液酸的提取纯化及其对幼年大鼠学习记忆能力的影响[D]. 无锡:江南大学,2016.

[9] 张启伟,郑琦. 基于色谱法与质谱法分析唾液酸的衍生方法的研究进展[J]. 色谱,2019,37(12):1261-1267.

[10] 戴军,朱松,汤坚,等. PMP柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报,2007,(2):206-210.

[11] 张世雄,程立均. 一种改进的糖蛋白染色鉴别方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(1):108-110.

[12] 朱怡霖. 不同大豆品种蛋白质、脂肪、多酚组成成分及抗氧化活性研究[D]. 西安:陕西师范大学,2017.

[13] 冯君. 乳及乳品中唾液酸含量的检测[D]. 郑州:河南农业大学,2008.

[14] GUO L,LU L,YIN M,et al. Valorization of refractory keratinous waste using a new and sustainable bio-catalysis[J]. **Chemical Engineering Journal**,2020,397:125420.

[15] YAGI H,YASUKAWA N,YU S Y,et al. The expression of sialylated high-antennary N-glycans in edible bird's nest[J]. **Carbohydrate Research**,2008,343(8):1373-1377.

[16] WANG B,BRAND-MILLER J. The role and potential of sialic acid in human nutrition[J]. **European Journal of Clinical Nutrition**,2003,57(11):1351-1369.

[17] ZHANG S,LAI X,LIU X,et al. Competitive enzyme-linked immunoassay for sialoglycoprotein of edible bird's nest in food and cosmetics[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2012,60(14):3580-3585.

[18] MARINI M,TANI A,MANETTI M,et al. Characterization and distribution of sialic acids in human testicular seminoma[J]. **Acta Histochemica**,2020,122(3):151532.