李欣怡, 吴夏泠, 刘群, 等. 鸡蛋壳膜酶解物/壳聚糖复合薄膜的制备及性能表征 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(2): 297−307. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030080

LI Xinyi, WU Xialing, LIU Qun, et al. Preparation and Performance Characterization of Eggshell Membrane Enzymatic Hydrolysate/Chitosan Composite Film[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(2): 297−307. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030080

· 包装与机械 ·

鸡蛋壳膜酶解物/壳聚糖复合薄膜的制备及性能表征

李欣怡, 吴夏泠*, 刘　群, 翁武银, 张玉苍*

（集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021）

摘　要: 基于鸡蛋壳膜制备抗菌抗氧化功能的薄膜，既能作为食品保鲜材料减少经济损失，也可提高鸡蛋壳废弃物的综合利用价值。本研究利用生物酶水解鸡蛋壳膜，研究水解条件对酶解液溶菌酶活力和 DPPH·清除率的影响，将蛋壳膜酶解液冷冻干燥获得的冻干物（Enzymolysis of egg shell membrane，E-ESM）与壳聚糖复合制备活性包装薄膜，研究 E-ESM 对壳聚糖薄膜结构和性能的影响，并将该薄膜应用于草莓保鲜试验。结果表明：9 U/mg 碱性蛋白酶在 50 ℃ 下酶解 4 h 后，蛋壳膜酶解液有 2.26 U/mL 的溶菌酶活力和 38.23% 的 DPPH·清除率；E-ESM 和壳聚糖以 3∶5（v∶v）的比例制备的薄膜表现出良好的机械性能（拉伸强度 11.32 MPa，断裂伸长率 11.75%）、紫外光阻隔能力（紫外光透过率 42%）、水蒸气透过率（（8.89±0.6）×10^{-11} g·m/（m^2·s·Pa））、氧气透过率（（2.12±0.6）×10^{-5} g·mm/（m^2·s））、对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制率分别是 83.33% 和 80.85%、生物相容性中细胞存活率均在 90% 以上。在 24 ℃ 贮藏 8 d 后，实验组的失重率（29.06%）较对照组降低 15.43%、丙二醛含量（911.78 μmol/L）较对照组降低 6.96%、V_C 含量（57.27 mg/100 g）较对照组保留 74.82%，pH（3.77）和糖度（11.03°Brix），结果表明复合薄膜能够有效延长草莓货架期 4~6 d，具有作为活性食品包装薄膜的潜力。

关键词: 蛋壳膜, 酶解, 溶菌酶, 复合薄膜, 结构性能, 草莓保鲜

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)02−0297−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030080　　本文网刊:

Preparation and Performance Characterization of Eggshell Membrane Enzymatic Hydrolysate/Chitosan Composite Film

LI Xinyi，WU Xialing*，LIU Qun，WENG Wuyin，ZHANG Yucang*

（College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China）

Abstract: Eggshell-membrane-based films with antimicrobial and antioxidant functions can be used to preserve food to reduce economic losses and increase the comprehensive use of eggshell waste. We used biological enzymes to hydrolyze eggshell membranes, investigated the effects of hydrolysis conditions on lysozyme activity and the DPPH· scavenging rate of the enzyme solution. We prepared active packaging films via compositing the lyophilized material obtained from the enzyme solution of eggshell membrane and freeze-drying (enzymolysis of eggshell membrane (E-ESM)) with chitosan. Our aim was to investigate the effects of E-ESM on the chitosan film structure and properties and apply the film in preserving strawberry. The lysozyme activity and DPPH· clearance of the enzymatic solution of eggshell film were 2.26 U/mL and 38.23%, respectively, after 9 U/mg alkaline protease enzyme digestion at 50 ℃ for 4 h. The film prepared with E-ESM and chitosan in a 3∶5 (v/v) ratio showed appropriate mechanical properties (tensile strength 11.32 MPa and fracture elongation

收稿日期: 2025−03−07

基金项目: 国家重点研发计划重点专项课题（2021YFD2100202）；厦门市自然科学基金项目（3502Z202371021）；福建省自然科学基金项目（2023J01770）；国家自然科学基金项目（22305095）。

作者简介: 李欣怡（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 鸡蛋壳废弃物综合利用, E-mail: 1145358853@qq.com。

*** 通信作者:** 吴夏泠（1991−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物质废弃物综合利用, E-mail: xlwu@jmu.edu.cn。

张玉苍（1964−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物质废弃物综合利用, E-mail: yczhang@jmu.edu.cn。

11.75%), UV-blocking ability (UV transmittance 42%), water vapor permeability ((8.89±0.6)×10^{-11} g·m/(m^2·s·Pa)), and oxygen transmittance ((2.12±0.6)×10^{-5} g·mm/(m^2·s)). The film inhibited 83.33% and 80.85% of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in experiments, respectively. Cell survival and biocompatibility were above 90% after 8 days of storage at 24 ℃. The weight loss rate (29.06%) in the experimental group was 15.43% lower than that of the control group. The malondialdehyde content (911.78 μmol/L) was 6.96% lower than that of the control group, and 74.82% of the V_C content (57.27 mg/100 g) was retained compared with that of the control group, with a pH of 3.77 and brix of 11.03°Brix. The composite film was able to effectively extend the shelf-life of strawberries by 4~6 days and could be used as an active food packaging film.

Key words: egg shell membrane; enzymatic hydrolysis; lysozyme; composite film; structure and function; strawberry preservation

贮藏保鲜是植物性食品在生产和加工中非常重要的阶段。据估计,全世界水果和蔬菜产品的损失超过 20%,主要由微生物和植物生理因素造成[1]。传统石油基塑料包装(如聚乙烯、聚丙烯)难以降解,塑料物理降解产生的微塑料对海洋和土壤均造成了严重污染[2],已成为当今困扰人类的环保难题。随着食品工业安全标准的不断提升和可持续发展理念的深化,绿色安全可降解保鲜薄膜的研发已成为行业焦点,因此,开发适宜的采后保鲜技术对于保持果蔬采后品质具有重要意义[3]。在可降解的食品包装中加入安全的抗菌剂,制备抗菌包装材料,开发具有抗菌、抗氧化的食物保鲜包装薄膜已成为新型食品包装领域的研究热点。

在此背景下,开发安全对人体无害的生物材料成为必然选择。以壳聚糖为代表的天然生物基材料因可降解性、成膜性及天然抗菌性备受关注,但其抗氧化能力弱、抑菌谱窄等缺陷限制了其实际应用[4]。鸡蛋是最常见的食材之一,2023 年我国存栏 11.9 亿只蛋鸡,2015~2023 年中国的鸡蛋产量从 2589 万吨增长至 3100 万吨[5]。占鸡蛋总重量 11% 的附属产物—蛋壳通常被作为废弃物丢弃或者做低价值的应用[6]。鸡蛋壳中所包含的蛋壳膜(Egg shell membrane, ESM)约有 90% 的蛋白质,含有丰富的胶原蛋白、糖蛋白、溶菌酶等,特别是溶菌酶有抗菌活性、抗炎活性和抗氧化性等生物活性功能[7]。Wang 等[8] 的研究发现单宁酸对蛋壳膜具有结构调节作用且增强抗氧化性能,Khalid 等[9] 发现使用蜂蜜、蛋壳膜等材料制备薄膜可以提高抗炎、抗氧化性。因此,构建复合型活性包装成为突破方向:将含溶菌酶的活性材料与壳聚糖复合既能弥补单一材料的性能短板,又可实现废弃物的高值转化。

本研究聚焦农业废弃物资源化利用,利用生物蛋白酶对蛋壳膜进行水解,释放具有自由基清除能力的水解多肽及天然溶菌酶;研究了不同蛋壳膜酶解液冻干物(Enzymolysis of egg shell membrane, E-ESM)/壳聚糖(Chitosan, CS)比例对共混膜的性能如光透过率、力学性能、水接触角的影响。采用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)、热重分析(Differential Scanning Caborimetry, DSC)和衰减全反射-红外光谱(Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR)等技术对 E-ESM/CS 复合薄膜进行了表征。最后,研究该薄膜对易氧化易腐食品(草莓)的保鲜效果。本研究将酶解产物与壳聚糖进行复合,构建有生物降解性、长效抗菌和抗氧化性能的多功能复合薄膜。该研究不仅为食品保鲜包装提供了环境友好型替代方案,同时实现了食品副产物的高值化利用,在降低材料成本与环境友好方面具有双重可持续性价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜鸡蛋壳　从当地菜市场(中国,厦门,集美区印斗路)获得,经过纯水清洗后将蛋壳膜撕下;壳聚糖(脱乙酰度≥85%)　浙江金壳药业股份有限公司;碱性蛋白酶(200 U/mg)　上海阿拉丁生化科技股份有限公司;中性蛋白酶(100 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)　上海源叶生物科技有限公司;胃蛋白酶(3000 U/mg)　上海麦克林生化科技股份有限公司;溶菌酶试剂盒(比浊法,编号:D799854-0030)　生工生物工程(上海)股份有限公司;草莓　购自国民水果(中国,厦门,集美区印斗南里 28 号);大肠杆菌(*E. coli*)ATCC 25992、金黄色葡萄球菌(*S. aereus*)CMCC(B)26003　购于上海鲁维科技有限公司。

UH-5300 紫外-可见分光光度计　日本 HITACHI 公司;STA 449F3/F5 TG 分析仪　德国 NETZSCH 公司;LH 221 透光率仪　中国深圳联辉诚科技有限公司;Everte 数字千分尺　中国河南邦特工量具有限公司;AI-7000-SJ 万能试验机　中国 GOTECH 公司;SDC100 接触角仪　中国东莞市晟鼎精密仪器有限公司;WZS90A Brix 糖度计　上海仪电物理光学仪器有限公司;FE28 pH 计　梅特勒托利多公司;NICOLET IS50 傅立叶红外光谱仪　美国赛默飞世尔科技有限公司;Phenom Pro 扫描电子显微镜　美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　蛋壳膜酶解液冻干物(E-ESM)的制备　蛋壳膜置于 50 ℃ 烘箱中干燥,粉碎干燥后的蛋壳膜并用 60 目筛网筛分。5 g 蛋壳膜粉加入 100 mL 去离

子水中，加入 9 U/mg 的蛋白酶，用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调节 pH（胃蛋白酶 pH=3，碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶 pH=7），在 40 ℃ 进行酶解。不同蛋白酶的最适条件存在差异，40 ℃ 是考虑科学性与可行性的最佳选择，统一 pH 条件确保各酶种的可比性，减少调节 pH 带来的误差。以酶解液溶菌酶酶活力和抗氧化活性为指标评估酶解效果。确认最适生物酶种类后，基于单因素实验法优化碱性蛋白酶酶解工艺：保持酶解温度（50 ℃）、酶解时间（4 h）两因素不变，探究碱性蛋白酶用量（3、6、9、12 和 15 U/mg）的影响；保持碱性蛋白酶用量（9 U/mg）、酶解时间（4 h）两因素不变，探究酶解温度（30、40、50、60 和 70 ℃）的影响；保持碱性蛋白酶用量（9 U/mg）、酶解温度（50 ℃）两因素不变，探究酶解时间（2、4、6、8 和 10 h）的影响。酶解结束后，在 90 ℃ 下加热 10 min 将酶灭活。用布氏漏斗抽滤过滤除去固体，收集酶解液，冷冻干燥获得 E-ESM。

1.2.2　蛋壳膜酶解液的抗氧化能力评价　将 0.1 mmol/L 的 DPPH（1,1-二苯基-2-苦基肼）溶液与稀释 10 倍的蛋壳膜酶解液样品等体积混合，在室温、黑暗环境中放置 30 min。用紫外-可见分光光度计记录在 517 nm 处的吸光度[10]。根据公式（1）计算蛋壳膜酶解液的 DPPH·清除能力，评估蛋壳膜酶解液的抗氧化能力。

$$\text{DPPH·清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

其中，A_0 是空白组的吸光度；A_1 是样品组的吸光度；A_2 是对照组的吸光度。

1.2.3　蛋壳膜酶解液溶菌酶活力的测定　使用溶菌酶试剂盒测定蛋壳膜酶解液中的溶菌酶含量。利用去离子水将标准品配制成 2.5 μg/mL 的标准溶液。将一支溶壁微球菌菌粉加入 1 mL PBS 缓冲溶液，混合均匀，即为贮备菌液。按贮备菌液∶缓冲溶液=1∶19 的比例配制成菌液，现用现配，用时摇匀。取 200 μL 蛋壳膜酶解液样品加入 2000 μL 菌液中充分混合。37 ℃ 水浴 15 min，立即取出置于冰水浴中 3 min，逐管取出倒入 1 cm 比色皿中，用分光光度计在 530 nm 处测量吸光度，去离子水作为参照溶液。

1.2.4　E-ESM 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）表征　用 SDS-PAGE 表征 E-ESM 中溶菌酶的分子量范围，以溶菌酶标品作为对照。用 12%（w/v）分离胶和 5%（w/v）浓缩胶[11] 进行电泳实验。运行结束后，用考马斯亮蓝染料 R-250 染色 30 min 后 ddH_2O 脱色。使用凝胶成像系统对凝胶进行拍摄。

1.2.5　E-ESM/CS 薄膜的制备　将 E-ESM（0.2%、0.4%、0.6%、0.8%）分别加入 100 mL CS（1wt%）溶液中，将薄膜溶液充分搅拌后进行 45 min 超声处理以去除气泡。采用流延法制备 E-ESM/CS 薄膜。在 115 mm×165 mm 的玻璃皿中加入 70 mL 薄膜溶液，在 40 ℃ 烘箱中干燥 24 h，获得 E-ESM/CS 薄膜[12]。

1.2.6　E-ESM/CS 薄膜的厚度　使用数字千分尺随机测量 5 个不同位置的薄膜厚度[13]。

1.2.7　E-ESM/CS 薄膜的透光率　使用透光率仪对 E-ESM/CS 薄膜在 380~760 nm 区间的可见光透过率（Visible light transmittance, VLT）和 365 nm 处的紫外线透过率（Ultra-violet transmittance, UVT）进行测定。将薄膜切割成 5 cm×5 cm 的正方形。测量 0.04 mm 薄膜的 UVT 和 VLT[12]。

1.2.8　E-ESM/CS 薄膜的 ATR-FTIR 表征　薄膜样品在测试前均已干燥，并使用 ATR-FTIR 对薄膜进行表征，扫描范围为 4000~400 cm^{-1}，分辨率为 4 cm^{-1}。

1.2.9　E-ESM/CS 薄膜的微观表征　对制备的 E-ESM/CS 薄膜表面与横截面的微观形貌进行表征。利用导电胶将样品固定在载物台上，喷金，使用 SEM 分析样品的微观形貌，加速电压为 5 kV。

1.2.10　E-ESM/CS 薄膜的热稳定性表征　利用 TG 分析仪对 E-ESM/CS 薄膜的热稳定性进行表征，表征条件：在 N_2 氛围中，温度范围 30~600 ℃，升温速率 10 ℃/min[12]。

1.2.11　E-ESM/CS 薄膜的机械性能　拉伸强度（Tensile strength, TS）和断裂伸长率（Elongation at break, EAB）是食品包装薄膜的重要机械性能之一[13]。将 E-ESM/CS 薄膜切割成哑铃状（75 mm×4 mm），测量，记录厚度。利用万能试验机对 E-ESM/CS 薄膜的机械性能进行测试，测试速率为 20 mm/min。

1.2.12　E-ESM/CS 薄膜的水接触角测定　通过水滴法检测薄膜的水接触角（Water contact angle, WCA），分析 E-ESM/CS 薄膜的亲疏水性[14]。将 10 μL 的超纯水滴在薄膜表面，在每块 E-ESM/CS 薄膜上的 5 个不同位置测试 WCA。

1.2.13　E-ESM/CS 薄膜的水蒸气透过率和氧气透过率的测定　将薄膜样品（相对湿度 50%）密封固定在试管口（试管尺寸：深度 8 cm，直径 1.7 cm），试管内预先装入完全干燥的硅胶作为干燥剂。随后，将密封好的试管称重，并置于恒温恒湿培养箱中（温度 4 ℃，相对湿度 78%±3%，湿度波动范围±3%）。连续监测 3 d，每隔 24 h 取出试管称重，记录质量变化（Δm_W），以评估薄膜的水蒸气透过性能[15]。

$$\text{水蒸气透过率}(g \cdot mm/(m^2 \cdot s \cdot Pa)) = \frac{\Delta m_W \times x}{t \times A \times \Delta P}$$

式中：Δm_W 表示试管质量增加（g）；x 表示薄膜厚度（m）；t 表示试管质量增加的持续时间（s）；A 表示薄膜样品的渗透面积（m^2）；ΔP 为 812.5 Pa（4 ℃）。

氧气吸收器(6 g)由铁粉、活性炭和氯化钠按质量比 1∶2∶3 组成。将该混合物置于不同复合薄膜密封的称重瓶中,随后将称重瓶放入装有氯化钡饱和溶液的干燥器内。实验持续 3 d,期间定期测定质量变化[16]。

$$氧气透过率(g\cdot mm/(m^2\cdot s\cdot Pa)) = \frac{\Delta m_o}{A\times t}$$

式中,Δm_o 表示瓶子的附加质量(g);t 表示平衡时间(s);A 表示称重瓶的瓶口面积(m^2)。

1.2.14 E-ESM/CS 薄膜的抗菌活性 将大肠杆菌(*E. coli*,革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*,革兰氏阳性菌)作为模式细菌。将 100 μL 细菌悬浮液(1×10^7 CFU/mL)加入到含有 10 mL LB 培养基的试管中,分别加入 200 mg 不同 E-ESM 添加量的薄膜,在一支加入细菌悬浮液的培养基试管加入 200 μL 水作为对照组,然后将混合物放置在振荡器(150 r/min)中 37 ℃ 培养 12 h,每 3 h 取样测试。最后使用紫外-可见分光光度计测量 600 nm 处的溶液的吸光度。计算活菌数[14]。

1.2.15 E-ESM/CS 薄膜的细胞毒性 对 E-ESM/CS 薄膜样品进行细胞毒性检测[17−18]。将直径为 1.5 mm 的薄膜在去离子水中浸泡 12 h,然后将 10 μL 薄膜浸泡液直接加入 L02 细胞(1×10^5 CFU/mL)。孵育 24 h 后,除去培养基,加入 100 μL 10%(v/v)CCK-8 溶液。培养 4 h 后,利用酶标仪在450 nm 处测定样品的吸光度。将去离子水作为对照组。每个样品进行 6 个平行实验。

1.2.16 E-ESM/CS 薄膜的保鲜能力

1.2.16.1 贮藏条件 以草莓为保鲜对象,研究 E-ESM/CS 薄膜的保鲜能力[19]。实验 1、2 组和对照组每组 5 颗表面完整无破损的草莓,平行 3 组。分别使用 CS 薄膜(实验 1 组)、E-ESM0.6%/CS 薄膜(实验 2 组)包裹草莓置于塑料盒中,以未覆盖薄膜的草莓作为对照组,并在 24 ℃、湿度 70%±2% 的条件下保存 8 d。对草莓的生理生化指标进行测定。

1.2.16.2 失重率、糖度、pH 的测定 利用重量法计算草莓在储存过程中的重量损失,记录样品质量的原始数据及贮存期间每日的质量数据。使用 Brix 糖度计测定糖度的变化。将果肉捣成浆,取 1 g 果肉添加 1 mL 去离子水调配成浆液,利用 pH 计测定 pH。

1.2.16.3 V_C 含量的测定 将草莓洗净、沥干,去蒂后,称取可食部分 10 g,按液料比 6∶1 加入 0.5 mol/L NaCl 溶液进行研磨,获得草莓样品提取液,利用 0.5 mol/L NaCl 将提取液定容至 10 mL,移至离心管中,4000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为待测草莓提取液。4 ℃ 冷藏避光保存。上清液吸光度的测定:准确移取离心 2 mL 上清液置于 10 mL 比色管中,加 1.0 mL pH=4.7 的乙酸-乙酸钠缓冲液,用 0.5 mol/L NaCl 稀释至 10 mL,摇匀。在波长 265 nm 处,以 0.5 mol/L NaCl 为参照,测定其吸光度。加硫酸铜处理的上清液吸光度测定:吸取 1.00 mL 样液,加入 0.50 mL 100 μg/mL $CuSO_4$ 溶液,再加入 1.0 mL pH=4.7 的乙酸-乙酸钠缓冲液,按上述方法测定其吸光度[20]。

利用标准曲线计算待测样品与添加硫酸铜处理后的上清液待测样品的吸光值,相减计算出样品中 V_C 的含量。

$$V_C含量(mg/100\ g) = \frac{c\times V_{总}\times V_{待测总}\times 100}{V_1\times W_{总}\times 1000}$$

式中,c 为通过标准曲线方程计算得到的维生素 C 浓度,μg/mL;$V_{总}$为吸取样品定容总体积,10 mL;$V_{待测总}$为待测样品总体积,mL;100 为 100 g 果蔬;V_1 为吸取样品溶液的体积,mL;$W_{总}$为果蔬质量,g;1000 为换算系数。

1.2.16.4 丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量的测定 使用 5 mL 三氯乙酸(100 g/L)将 1.0 g 草莓碾碎。收集上清液并在 4 ℃ 和 10000 r/min 离心后在 4 ℃ 储存。将 2 mL 上清液和 2 mL 硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid,TBA)溶液(0.67%,w/w)在比色管中混合,煮沸 20 min。冷却后,分别在 450 nm(OD_{450}),532 nm(OD_{532}),和 600 nm(OD_{600})处测定上清液吸光度[21]。

采用以下两个方程对草莓中 MDA 含量(C_{MDA},μmol/L)进行测定。

$$c = 6.45\times(OD_{532}-OD_{600})-0.56\times OD_{450}$$

$$C_{MDA} = \frac{c\times V}{V_m}$$

式中,c 代表样品的 MDA 浓度(μmol/L);V 代表样品提取物的总体积(mL);V_m 代表用于测定的样品提取物的体积(mL)。

1.3 数据处理

所有数据平行测量三次。使用 Origin 2018 软件绘制实验数据。使用 SPSS 统计软件对实验组和对照组进行数据处理,采用 Duncan 检验进行分析。$P>0.05$ 表示没有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 E-ESM 的特性

2.1.1 蛋壳膜酶解液的制备条件探究 以蛋壳膜酶解物的溶菌酶活力和 DPPH·清除能力为指标,探究蛋壳膜的生物酶水解条件。在酶添加量 9 U/mg 的条件下,40 ℃ 下酶解 4 h,研究 5 种蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶)酶解蛋壳膜产物的溶菌酶活力和 DPPH·清除能力(图 1A)。胃蛋白酶在酸性的环境中具有较高的酶活力[21],故将胃蛋白酶体系的 pH 调为 3。碱性蛋白酶,中性蛋白酶,木瓜蛋白酶和胰蛋白酶在 pH 为 7 均具有较高的酶活力[22−25],这四种酶体系的 pH 维持在 7 左右。结果表明,碱性蛋白酶能够更好的保留酶解液中溶菌酶的活性。Zhao 等[26] 在蛋壳和膜

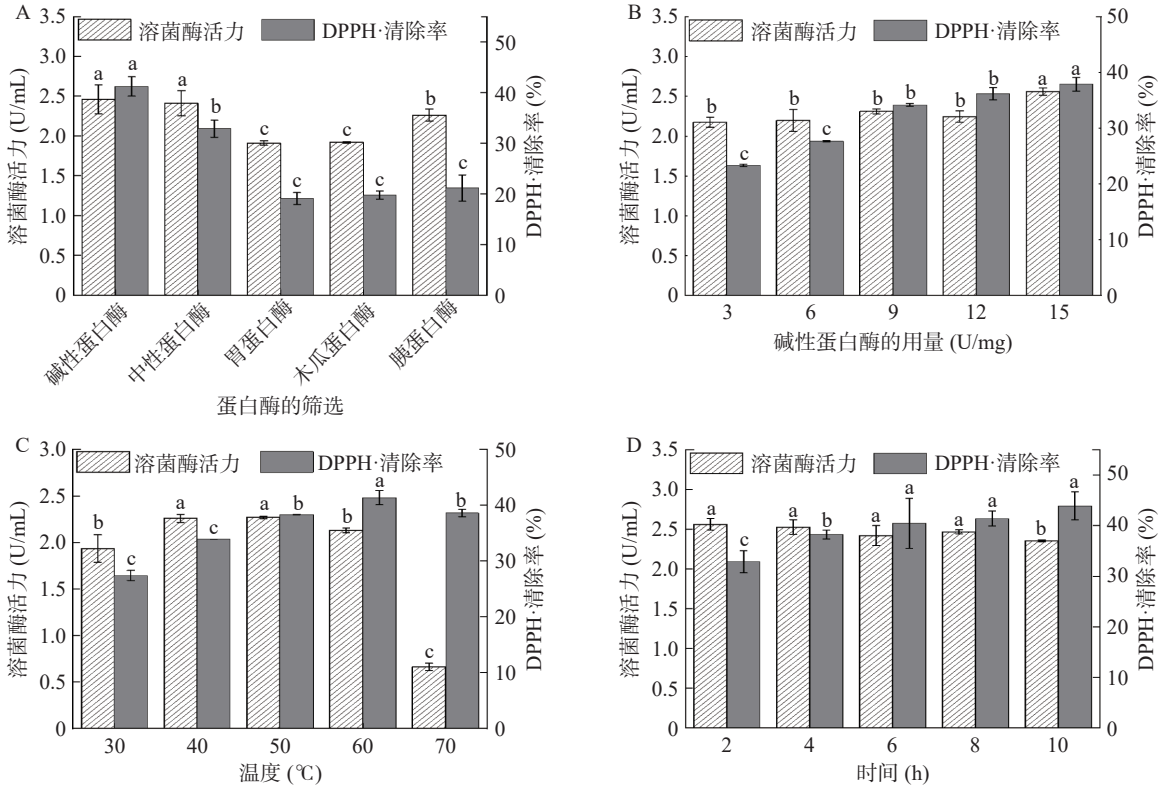


图 1　酶解条件对鸡蛋壳膜酶解的影响

Fig.1　Effect of enzymatic hydrolysis conditions on enzymatic hydrolysis of egg shell membrane

注：不同小写字母表示数据差异显著，$P<0.05$；图 5~图 6、图 9 同。

蛋白水解液检测到如组氨酸、精氨酸和缬氨酸等必需氨基酸，还发现了天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸等非必需氨基酸，而 Riko 等[27] 发现这些氨基酸都与抗氧化功能有关，抗氧化能力与其底物的氨基酸组成具有相关性。本研究使用的碱性蛋白酶源于地衣芽孢杆菌 2709，其酶切位点广泛，可作用于疏水性或芳香族氨基酸的肽键，因此碱性蛋白酶酶解物暴露的疏水性氨基酸残基更多、抗氧化性更强，表明碱性蛋白酶在产生抗氧化肽中起关键作用[22]。因此，优选碱性蛋白酶对蛋壳膜进行酶解。进一步，进行酶用量、酶解温度和酶解时间的筛选。图 1B 结果表明，优先考虑溶菌酶活力，碱性蛋白酶用量 9 U/mg 时，酶解液具有良好的溶菌酶活力与抗氧化能力。如图 1C 所示，适当的升温可提高酶活，但当酶解温度升高到 70 ℃ 时，酶解液中溶菌酶的活力陡降。这是由于较高的温度使溶菌酶变性，酶活力降低[28]。酶解 4 h 时，酶解液具有较高的溶菌酶活力和 DPPH·清除率为 38.23%（图 1D）。由于 6 h 时对溶菌酶的活性提升并不大，因此，综合考虑时间效率，确定最佳酶解条件为碱性蛋白酶在50 ℃ 下处理蛋壳膜 4 h，碱性蛋白酶用量 9 U/mg。

2.1.2　E-ESM 的 SDS-PAGE 检测　用 SDS-PAGE 电泳对 E-ESM 分子量范围进行分析。SDS-PAGE 结果显示 E-ESM 样品有多条蛋白质条带，表明 ESM 已被酶解为多种分子量不一的蛋白。从图 2 中可见，在 10~15 kDa 之间观察到与溶菌酶标品分子量范围一致的样品条带，说明 E-ESM 中含有溶菌酶。

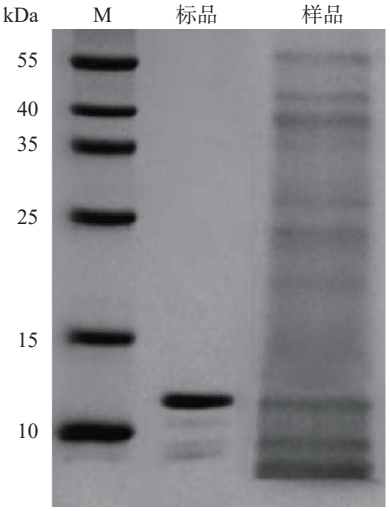


图 2　E-ESM 的 SDS-PAGE

Fig.2　SDS-PAGE of E-ESM

注：M 为蛋白 Maker、标品为溶菌酶标品、样品为 E-ESM 样品。

2.2　E-ESM/CS 薄膜的表征和分析

2.2.1　ATR-FTIR 分析　利用 ATR-FTIR 对制备薄膜含有的基团结构进行表征（如图 3）。纯 CS 薄膜的 FTIR 光谱在约 3300 cm^{-1} 处宽的峰对应–OH 伸缩振动吸收峰与 N-H 伸缩振动吸收峰重叠形成的特征峰。在 1642、1546、1400、1150 cm^{-1}处分别对应酰胺 I 带、酰胺 II 带、–CH_2、C–O 键的特征峰。酰胺 I 带通常与蛋白质的 C=O 伸缩振动有关，蛋壳膜酶解液中含有较多的肽段或氨基酸，这些成分可能会与壳

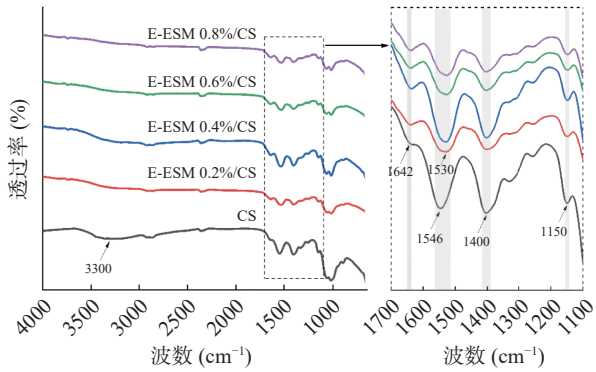


图 3　E-ESM/CS 薄膜的 FTIR 谱图

Fig.3　FTIR spectra of E-ESM/CS thin films

聚糖发生相互作用，影响酰胺 I 带的形状和强度。氢键的减弱和酰胺 II 带的峰位移动反映了壳聚糖分子结构的变化，进而影响了薄膜的机械性能、热稳定性和吸湿性等重要性质。随着鸡蛋壳膜酶解液的增加，3300 cm^{-1} 处–OH、N-H 的特征峰变得更宽、更弱，表明蛋壳膜酶解物与壳聚糖发生非共价相互作用（氢键），削弱了壳聚糖的氢键相互作用，酰胺 II 带的峰从 1546 cm^{-1} 移到 1530 cm^{-1}，这一特征峰的变化是由鸡蛋壳膜酶解物与壳聚糖之间的非共价相互作用导致的[29−30]。

2.2.2　E-ESM/CS 薄膜的微观形貌　对 E-ESM/CS 薄膜表面和横截面微观形貌进行 SEM表征。如图 4 所示，纯 CS 薄膜和 E-ESM 0.2%/CS 薄膜、E-ESM 0.4%/CS 薄膜的表面光滑。E-ESM 0.6%/CS 薄膜、E-ESM 0.8%/CS 薄膜表面出现聚集纹路。CS 薄膜横截面没有孔隙，E-ESM 0.2%/CS 薄膜横截面致密，没有孔隙，这种均匀致密的形貌特征使其具有良好的机械强度。蛋壳膜酶解物加入后薄膜的表面和横截面没有出现明显的缺陷、裂纹，表明蛋壳膜酶解物与壳聚糖具有良好的相容性，不同添加量对薄膜微观形貌影响较小，故通过其他方法对薄膜进行进一步表征。

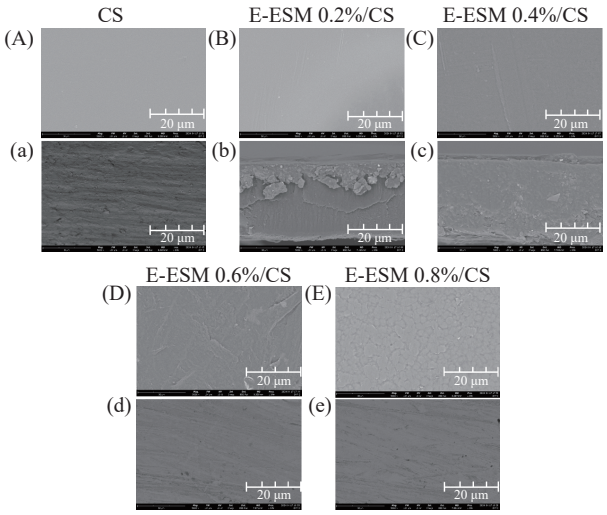


图 4　E-ESM/CS 薄膜表面（A~E）和薄膜截面（a~e）的 SEM 图

Fig.4　SEM images of E-ESM/CS film surface (A~E) and film cross section (a~e)

2.2.3　E-ESM/CS 薄膜的厚度和透光率分析　薄膜厚度受胶体溶液体积、薄膜成分及其相互作用的影响。纯 CS 薄膜的厚度为 0.032±0.002 mm，E-ESM(0.2%~0.8%)/CS 薄膜的厚度分别为 0.033±0.001、0.037±0.003、0.038±0.003、0.038±0.003 mm。随着薄膜中 E-ESM 含量的增加，薄膜的固含量增加，薄膜的厚度也逐渐增加（图 5A）。随着 E-ESM 含量的增加，薄膜的颜色变深，这是由于 E-ESM 呈黄色。CS 薄膜的 VLT 和 UVT 分别为 0.93% 和 0.80%。相比之下，E-ESM（0.2%~0.8%）/CS 薄膜的 VLT 和 UVT 分别从89.3%、76.1% 下降到 63.1%、40%(图 5B)。E-ESM（0.2%~0.8%）/CS 薄膜的 UVT 低于 CS 薄膜，说明 E-ESM（0.2%~0.8%）/CS 薄膜具有有效的紫外线阻隔性能，可以降低紫外线氧化效应，这对食品保鲜具有重要作用。E-ESM（0.2%~0.8%）/CS 薄膜的紫外线阻隔性应归功于蛋壳膜水解产物中含有丰富的抗紫外线结构[31]。

2.2.4　E-ESM/CS 薄膜的机械性能　使用万能试验机对薄膜的 TS 和 EAB 进行测试。CS 薄膜和 E-ESM（0.2%~0.8%）/CS 薄膜的 TS 和 EAB 见图 5C。CS 薄膜的 TS 高达 40 MPa。E-ESM 的添加量在 0.6% 以内，薄膜的 TS 均大于 10 MPa，表明复合薄膜具有良好的 TS。薄膜的 TS 与 EAB 存在一定相互制约的关系。随着 E-ESM 的增加，薄膜的 TS 先升高后降低，而 EAB 与之相反。这是因为 E-ESM 的加入削弱了壳聚糖分子间的氢键相互作用，从而使高分子聚合物分子的迁移性增加。EAB 反映了材料的韧性，较高的 EAB 可以使薄膜在受力时有一定的变形能力，减缓冲击力量带来的破坏，从而能够更好的应用于食品包装上。

2.2.5　E-ESM/CS 薄膜的水接触角　WCA 是评估包装薄膜亲/疏水性和表面湿润性的重要指标，通过测量 E-ESM/CS 薄膜的 WCA，研究 E-ESM 对薄膜亲水性的影响。纯 CS 薄膜的 WCA 为 98.36°。E-ESM/CS 薄膜的 WAC>100°（图 5D），疏水性提高，这表明 E-ESM 的添加提高了薄膜的疏水性。这些结果证实，E-ESM 的加入加强了分子内和分子间的氢键相互作用，从而减少了薄膜表面的亲水基团[11]。疏水性的 E-ESM/CS 薄膜具有用于食品保鲜的潜力。

2.2.6　E-ESM/CS 水蒸气透过率和氧气透过率分析　在食品包装中，薄膜的水蒸气透过率反映了水蒸气在环境中的阻隔性能，通常受环境条件、膜结构和高分子性质的影响。食品包装往往需要一定的屏障，以减少外部环境（如水，氧气和紫外线）的影响。在图 6A 和图 6B 中，壳聚糖结构中含有丰富的亲水基团，对水分子有亲和力，纯壳聚糖的水蒸气透过率为（6.62±0.6）×10^{-11} g·mm/(m^2·s·Pa)。随着 E-ESM 的加入，E-ESM 0.8%/CS 水蒸气透过率为 8.89(±0.6)×10^{-11} g·mm/(m^2·s·Pa)，较 CS 组增加（2.12±0.7）×10^{-11} g·mm/(m^2·s·Pa)。进一步分析处理组间数据差

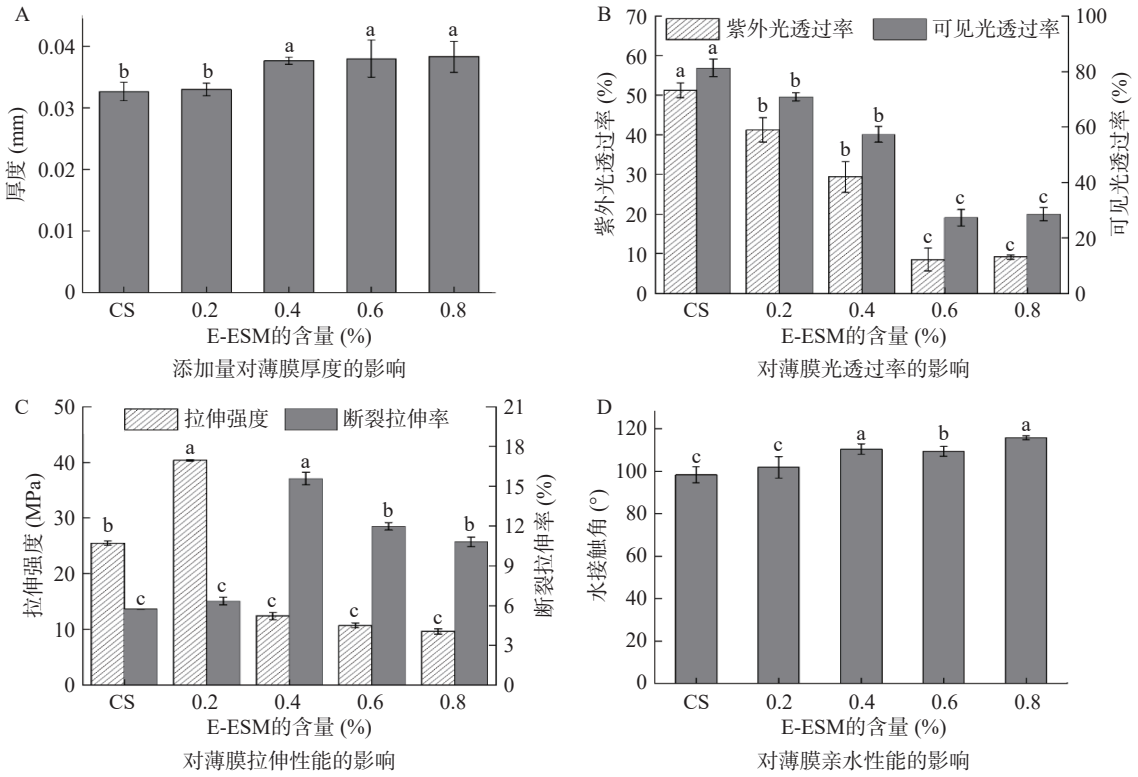


图 5　E-ESM/CS 薄膜的物理性能

Fig.5　Physical properties of E-ESM/CS films

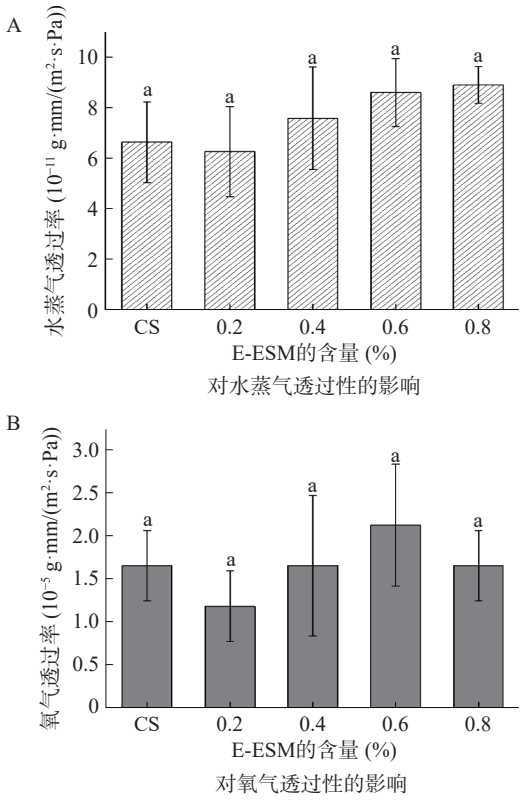


图 6　不同 E-ESM 添加量的水蒸气透过率(A)和氧气透过率(B)图

Fig.6　Diagrams of water vapor permeability (A) and oxygen permeability (B) with different addition amounts of E-ESM

异表明，在不同添加量条件下，壳聚糖与 E-ESM 形成的复合膜的 WVP 无显著差异。纯壳聚糖膜的氧气透过率为(1.65±0.5)×10^{-5} g·mm/(m^2·s·Pa)，加入 E-ESM(0.2%~0.8%)后，最大氧气透过率为(2.12±0.6)×10^{-5} g·mm/(m^2·s·Pa)(E-ESM 0.6%/CS 组)。

2.2.7　E-ESM/CS 薄膜的热重分析　采用热重分析(Thermo Gravimetry, TG)和差热重分析(Derivative

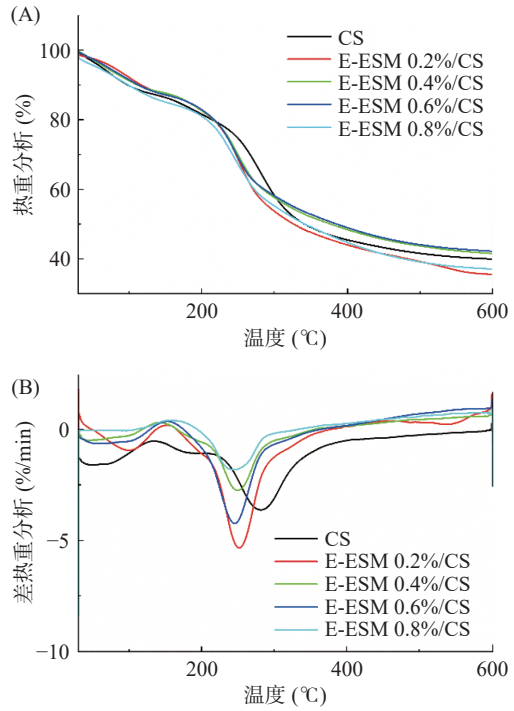


图 7　不同 E-ESM 添加量的 E-ESM/CS 的热重(A)和差热重(B)图

Fig.7　Thermogravimetric (A) and differential thermogravimetric (B) graphs of E-ESM/CS with different E-ESM additions

Thermo Gravimetry, DTG)对 E-ESM/CS 薄膜的热稳定性进行研究,结果见图 7。薄膜的热降解曲线大致在 30~600 ℃ 范围内,结果表明,添加量 0.2%~0.8% E-ESM 的 E-ESM/CS 薄膜曲线相似,但 E-ESM/CS 薄膜的降解温度相较 CS 薄膜降低。薄膜表现出三个主要的失重过程:失重的初始阶段发生在 30~200 ℃ 时,失重 20%,这与薄膜中水分(自由水和结合水)的蒸发有关[14];第二阶段发生在 220~360 ℃ 时,失重 60%,壳聚糖热分解速率达到最大,是壳聚糖分解、氧化、燃烧的结果,归属为糖环的脱水、聚合物单元降解;第三阶段发生在 400~500 ℃ 时,失重 10%,这与壳聚糖分子骨架裂解有关。E-ESM 的加入破坏了壳聚糖分子间的强相互作用,使壳聚糖骨架的裂解温度降低,薄膜的热稳定性略有降低。当温度低于 200 ℃ 时,E-ESM/CS 薄膜能保持良好的热稳定性,在大多数情况下可用作食品包装薄膜。

2.2.8 E-ESM/CS 薄膜的抗菌活性 蛋壳膜中含有丰富的胶原蛋白,其酶解物具有易被微生物侵染的风险,因此研究了 E-ESM/CS 薄膜对两种模式细菌(*S. aereus*、*E. coli*)的抗菌活性,评估薄膜的抗菌能力。结果表明随着 E-ESM 添加量的增加,对两种常见模式细菌复合薄膜保持较强的抗菌活性(图 8),对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制率分别是 83.33% 和 80.85%,表明该复合薄膜在食品保鲜薄膜领域具有一定的应用前景。

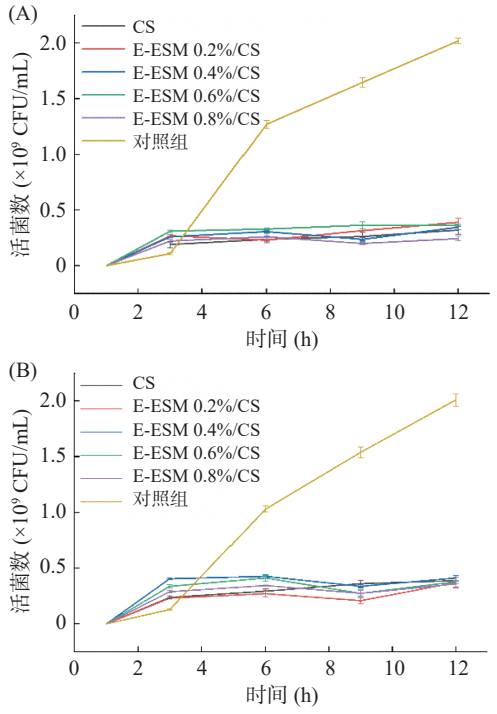


图 8 不同 E-ESM 添加量的 E-ESM/CS 薄膜对金黄色葡萄球菌(A)和大肠杆菌(B)抑菌活性

Fig.8 Inhibition of *S. aureus* (A) and *E. coli* (B) by E-ESM/CS films with different E-ESM supplemental levels

2.2.9 E-ESM/CS 薄膜的细胞毒性分析 为了进一步评估 E-ESM/CS 薄膜应用于食品包装领域的安全性,对 E-ESM/CS 薄膜的细胞毒性进行检测。如图 9 所示,控制组和所有实验组的 L02 细胞均表现出高于 90% 的活力。样本与对照组没有明显差异(P>0.05),表明 E-ESM/CS 薄膜具有良好的生物相容性及应用于食品包装的安全性。

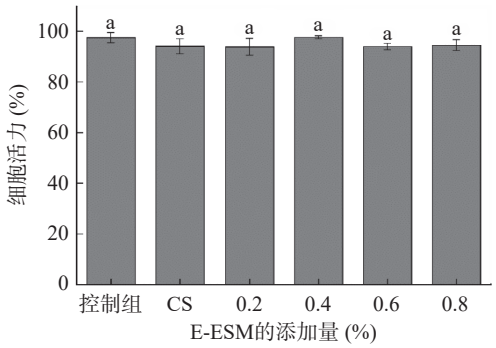


图 9 不同 E-ESM 添加量的 E-ESM/CS 薄膜对细胞活力的影响

Fig.9 Influence of E-ESM/CS films with different E-ESM supplemental levels on cell viability

2.3 E-ESM/CS 薄膜在草莓保鲜中的应用

基于性能表征结果,选择 E-ESM 0.6%/CS 的薄膜作为草莓保鲜的包装薄膜。利用 E-ESM/CS 薄膜包装草莓,表征薄膜的保鲜能力。草莓的新鲜度可通过其外观(图 10A)及失重率来评估。图 10B 显示了不同处理组的草莓失重率。E-ESM 0.6%/CS 薄膜覆盖草莓的失重率低于对照组,主要是因为 E-ESM 0.6%/CS 薄膜在草莓表面形成保护屏障,能够延缓和抑制水分的扩散。E-ESM 0.6%/CS 组草莓保存 8 d 后失重率为 29.06%±0.7%,对照组失重率为 34.36%±3%,CS 薄膜组失重率为 26.75%±3%。CS 薄膜的失重率略低于 E-ESM 0.6%/CS 组,这可能与 CS 薄膜横截面形貌致密而 E-ESM 0.6%/CS 具有轻微的层状结构和小的孔洞结构有关。薄膜的覆盖能够阻断部分水分子的运动,减缓水分的蒸发,进一步提高了保鲜效果。在此基础上添加具有抗氧化性能的 E-ESM,同时 E-ESM 0.6%/CS 薄膜具有良好的疏水性[32],这种结构不仅抑制了与呼吸有关的代谢活动,延缓了果实中细胞的老化和霉变的减少,改善了水分屏障性质,减小失重率,延长草莓的货架期。

MDA 作为自由基引起的脂质过氧化分解产物,可用于评估细胞膜的氧化损伤程度,反映草莓的新鲜程度。图 10C 表明,在贮藏过程中,对照组和 CS 薄膜组 MDA 含量均显著增加(P<0.05)。MDA 含量在 CS 组中持续快速增加,而 E-ESM 0.6%/CS 组前 4 d 增加较慢,归因于 E-ESM 的抗氧化作用,它能抑制细胞膜中的脂质氧化[33]。贮藏第 8 d,E-ESM 0.6%/CS 组 MDA 含量最低(848.32 μmol/L)。结果表明,E-ESM的添加能够抑制 MDA 含量的增加,有助于提高薄膜的抗氧化性能,清除组织中的活性氧自由基,减少氧化损伤,维持细胞膜的完整性。E-ESM 0.6%/CS

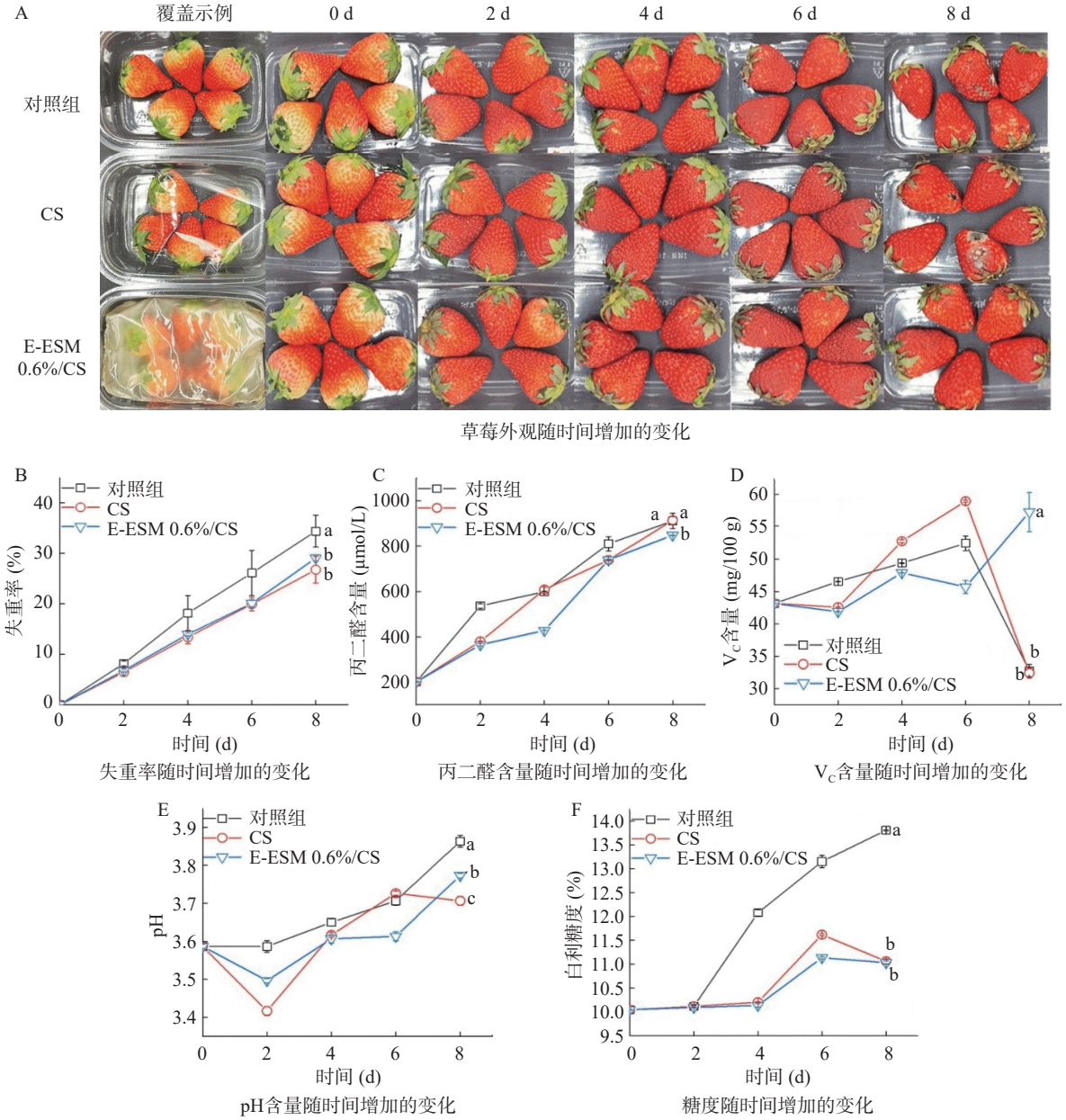


图 10　草莓贮藏期间品质变化的指标

Fig.10　Index of strawberry quality change during storage

注：贮藏末期不同小写字母表示数据差异显著，$P<0.05$。

薄膜在贮藏前期和中期时表现出较高的抗氧化能力，从而保持草莓的新鲜度。此外，该薄膜具有良好的阻隔性能，可以有效地减少水分蒸腾和耗散，从而减少 MDA 的积累[34]。

图 10D 表明草莓在成熟的过程中 V_C 含量的变化趋势。贮藏第 6~8 d，对照组和 CS 组 V_C 含量迅速降低，在最后 2 d 储存期间 V_C 减少，这可能是抗坏血酸与空气中的氧气结合时发生自氧化。由于草莓采摘后仍存在未完全转化的前体物质，E-ESM 0.6%/CS 组延缓草莓的代谢过程，使 V_C 含量在 8 d 内成上升趋势，表明复合薄膜能有效延缓草莓后熟。

图 10E 表明草莓贮藏过程中的 pH 变化趋势。草莓果实中的酸主要为有机酸，pH 变化主要与果实中的有机酸含量改变有关，随着果实逐渐变红，pH 会持续升高。成熟度变高，pH 上升的同时也在加速果实劣变。

未成熟的草莓糖含量较低，当草莓成熟度变高时，糖含量随之增加，图 10F 在第 4 d 时对照组糖度上升明显，CS 组、E-ESM 0.6%/CS 组在保鲜初期糖度变化不明显，因为薄膜减弱了草莓的呼吸强度，延缓草莓成熟期。在第 8 d 对照组比 E-ESM 0.6%/CS 组糖度增加了 20%，而 CS 组草莓糖度降低，可能是由于水果成熟过程中代谢消耗使糖分减少，甜度降低。结果表明 E-ESM 0.6%/CS 能够有效延长草莓货架期。

3　结论

本研究以鸡蛋壳膜为原料，采用碱性蛋白酶在 50 ℃ 对蛋壳膜进行 4 h 酶解，成功制备了具有高溶菌酶活性（2.26 U/mL）和显著抗氧化性（DPPH 自由

基清除率 38.23%)的酶解液 E-ESM。ATR-FTIR 结果证实 E-ESM 与 CS 间形成氢键相互作用,使酰胺 II 带从 1546 cm^{-1} 移至 1530 cm^{-1}。SEM 结果显示复合薄膜微观结构致密无缺陷。E-ESM0.6%/CS 薄膜表现出优异的机械性能、紫外线阻隔性和疏水性(接触角>100°)。草莓保鲜实验表明,在 8 d 贮藏期内,E-ESM0.6%/CS 组草莓失重率为 29.06%,MDA 含量降低,V_C 含量上升,有效延缓了后熟代谢。本研究直接利用 E-ESM 与 CS 复合,保留了蛋壳膜的天然活性成分,开发出适用于易腐败果蔬的复合活性包装材料,实现蛋壳废弃物高值化利用。美中不足的是当前蛋壳膜的酶解产物分子量分布较宽,未来需进一步优化反应条件以提高产物活性和肽段特异性。本研究结果为活性包装材料的设计提供了新思路,有一定的应用价值。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] FRANCISCO J B B, BBEATRIZ M L, LIZET A G, et al. Impact of edible coatings on quality of fruits: A review[J]. Food Control, 2022, 139: 109−063.

[2] YOOEUN C, AN Y J. Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 124(2): 624-632.

[3] BAJAJ K, ADHIKARY T, GILL P P S, et al. Edible coatings enriched with plant-based extracts preserve postharvest quality of fruits: A review[J]. Progress in Organic Coatings, 2023, 182: 107669.

[4] SALEHI E, DARAEI P, ARABI SHAMSABADI A. A review on chitosan-based adsorptive membranes[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152: 419−432.

[5] 刘森, 肖伟伟, 唐玲, 等. 2023—2024 年商超品牌鸡蛋年度蛋品调研与分析报告[J]. 中国禽业导刊, 2024, 41(11): 23−29. [LIU S, XIAO W W, TANG L, et al. Research and analysis report on annual egg products of supermarket brands in 2023—2024[J]. China Poultry Industry Guide, 2024, 41(11): 23−29.]

[6] FEKADU T, CASSANO A, ANGÓS I, et al. Effect of fortification with eggshell powder on in jera quality[J]. Lwt, 2022, 158: 113156.

[7] 周艳华, 马美湖, 蔡朝霞. 蛋壳膜中角蛋白与胶原蛋白的提取分离技术及功能多肽的研究[J]. 中国家禽, 2008, 30(15): 34−37. [ZHOU Yanhua. MA Meihu. CAI Zhaoxia. Extraction and separation technology of keratin and collagen in eggshell membrane and research on functional polypeptides[J]. The Chinese Journal of Chinese Poultry, 2008, 30(15): 34−37.]

[8] WANG S S, ABOU-ELSOUD M, LI Z Y, et al. Structural modulation of eggshell membrane hydrolysates by tannic acid: Simultaneous enhancement of antioxidant and emulsifying properties [J]. Food Chemistry, 2025, 479: 143827.

[9] KHALID M, FAROOQ M, ADNAN M, et al. Green and sustainable electrospun poly(vinyl alcohol)/eggshell nanofiber membrane with lemon-honey for facial mask development[J]. ACS Omega, 2025, 10(13): 12972−12982.

[10] ZHANG Tao, LI Yanhong, MIAO Ming, et al. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2011, 128(1): 28−33.

[11] ZHANG Haifeng, FU Gang, ZHANG Dawei. Cloning, characterization, and production of a novel lysozyme by different expression hosts[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(10): 1405−1412.

[12] YANG Danmin, LIU Qun, ZENG Xu, et al. Novel pH-responsive indicator films based on bromothymol blue-anchored chitin for shrimp freshness monitoring[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 127052.

[13] WAN Shoumei, LIU Qun, YANG Danmin, et al. Characterization of high amylose corn starch-cinnamaldehyde inclusion films for food packaging[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134219.

[14] YANG Danmin, LIU Qun, GAO Yahui, et al. Characterization of silver nanoparticles loaded chitosan/polyvinyl alcohol antibacterial films for food packaging[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108305.

[15] LI Shuangjian, LIU Xiaoli, ZHANG Xiaoqian, et al. Preparation and characterization of zein-tannic acid nanoparticles/chitosan composite films and application in the preservation of sugar oranges[J]. Food Chemistry, 2024, 437: 137673.

[16] ZHOU Yifan, ZHONG Yixin, LI Ling, et al. A multifunctional chitosan-derived conformal coating for the preservation of passion fruit[J]. LWT, 2022, 163: 113584.

[17] WANG Chunchun, GUO Jiayi, LIU Qun, et al. The characterization and analysis of the compound hemostatic cotton based on Ca^{2+}/poly (vinyl alcohol)/soluble starch-fish skin collagen[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262: 130084.

[18] ZHENG Wenhui, YANG Danmin, ZENG Xu, et al. Utilization of the waste aqueous phase from tea residue hydrothermal carbonization for preparing active food packaging films[J]. Food Chemistry, 2024, 448: 139141.

[19] JIANG Yuxin, ZHAO Guoyu, YANG Xiaoling, et al. Preparation and characterization of nano-SiO_2-modified emulsified film and its application for strawberry preservation[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2023, 40: 101181.

[20] 王海佳. 紫外分光光度法研究维生素 C 的稳定性及蔬果和果汁中含量的测定[D]. 太原: 山西医科大学, 2015. [WANG Haijia. Study the stability of Vitamin C by ultraviolet spectrophotometry and determination of the contents in several kinds of fruits, vegetables and juices[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015.]

[21] KUEPETHKAEW S, ZHANG Y, KISHIMURA H, et al. Enzymological characteristics of pepsinogens and pepsins purified from lizardfish (*Saurida micropectoralis*) stomach[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130532.

[22] NAGHDI S, REZAEI M, TABARSA M, et al. Extraction of sulfated polysaccharide from Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera using alcalase enzyme and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) visceral semi-purified alkaline proteases[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023, 32: 101033.

[23] BAI Yuan, WU Wei. The neutral protease immobilization: Physical characterization of sodium alginate-chitosan gel beads[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(5): 2269−2283.

[24] YU Dianyu, CHEN Kuiren, LIU Jingyang, et al. Application of magnetic immobilized papain on passivated rice bran lipase[J].

International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 51−59.

[25] MAO Y H, KRISCHKE M, HENGST C, et al. Comparison of the influence of pH on the selectivity of free and immobilized trypsin for β-lactoglobulin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2018, 253: 194−202.

[26] ZHAO Q C, ZHAO J Y, AHN D U, et al. Separation and identification of highly efficient antioxidant peptides from eggshell membrane[J]. Antioxidants, 2019, 8(10): 495.

[27] RIKO M, RISA H, MUTSUMI K, et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 750−755.

[28] ANDONEGI M, HERAS K L, SANTOS-VIZCAÍNO E, et al. Structure-properties relationship of chitosan/collagen films with potential for biomedical applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 237: 116159.

[29] SHANKAR S, TANOMROD N, RAWDKUEN S, et al. Preparation of pectin/silver nanoparticles composite films with UV-light barrier and properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 842−849.

[30] WANG Honglei, LI Juanhua, CHEN Guojian, et al. Hydrophobic polyethylene film prepared by film blowing process for preservation of fried shrimp rolls[J]. Food Chemistry, 2024, 453: 139680.

[31] GAO Yang, KAN Chaonan, CHEN Ming, et al. Effects of chitosan-based coatings enriched with cinnamaldehyde on *Mandarin fruit* cv. ponkan during room-temperature storage[J]. Coatings, 2018, 8(10): 372.

[32] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展.[J]. 中国农业科技导报, 2013(5): 53−58. [DONG Liang, HE Yongzhi, WANG Yuanliang. Research progress on application of superoxide dismutase (SOD)[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013(5): 53−58.]

[33] NGUYEN V T B, NGUYEN D H H, NGUYEN H V H. Combination effects of calcium chloride and nano-chitosan on the postharvest quality of strawberry (*Fragaria* x *Ananassa* Duch.)[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 162: 111103.

[34] DURSUN A, ÇALIŞKAN O, GÜLER Z, et al. Effect of harvest maturity on volatile compounds profiling and eating quality of hawthorn (*Crataegus azarolus* L.) fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 288: 110398.