

蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺及其优化

刘国庆, 凌庆枝, 孙军飞

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 以蛋壳膜为原料, 采用稀碱与酶解相结合的方法提取硫酸软骨素。以胰蛋白酶、胃蛋白酶分解去除杂蛋白, 经酒精沉淀并干燥后得到产品。实验得到的最佳提取工艺为: 料液比 1:1.5, 碱浓度 5%, 碱提温度 40℃, 胰蛋白酶、胃蛋白酶的用量分别为 1.5%、0.8%, pH 值分别为 8.2 和 5.5, 酶的各自最适条件作用时间均为 2.0h。

关键词: 硫酸软骨素; 蛋壳膜; 胰蛋白酶; 胃蛋白酶

Optimization of Extraction Technology of Chondroitin Sulfate from Eggshell Membrane

LIU Guo-qing, LING Qing-zhi, SUN Jun-fei

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Heifei 230009, China)

Abstract: Chondroitin sulfate was extracted from the eggshell membrane with a method of dilute alkali-enzyme hydrolysis. The product of chondroitin sulfate was gotten after ethanol disposition and desiccation by eliminating the protein with trypsin and pepsin. The results showed the optimum conditions of weight proportion 1:1.5 (material:liquid), alkali concentration 5%, temperature 40℃. Dosage of trypsin and pepsin 1.5% and 0.8% respectively, pH value 8.2 and 5.5 respectively and reaction time 2.0h respectively.

Key words chondroitin sulfate; eggshell membrane; trypsin; pepsin

中图分类号: TS253.9

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0283-04

收稿日期: 2007-08-02

基金项目: 合肥市科技攻关项目(2007-1019)

作者简介: 刘国庆(1963-), 男, 副教授, 博士后, 研究方向为天然产物化学。

一个初步的工艺结果。若从规模化提取和纯化的角度看, 还需从降低成本, 提高收率方面下功夫。应主要从减少纯化步骤上考虑。

3 结 论

由上述结果可知, 经过两步盐析, 两步柱层析后, 得到的单一条带的电泳的酶产物。经鉴定为 Cu-Zn-SOD。本研究为从黄粉虫中提取纯化 SOD 提供了一条较成熟的工艺, 也为 SOD 的提取提供了一种新原料。由于黄粉虫是一种易于大规模得到的原料, 从中提取 SOD 是 SOD 产业化的又一个途径。

参考文献:

[1] 张波, 庞第, 王全林. 牛血中 SOD 的提取技术研究[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2002, 23(1): 69-70.

- [2] 白耀宇, 程家安. 我国黄粉虫的营养价值和饲养方法[J]. 昆虫知识, 2003, 40(4): 317-322.
- [3] 王文亮, 孙爱东. 金属离子对胰蛋白酶水解黄粉虫蛋白水解率的影响[J]. 中国食物与营养, 2006(2): 35-36.
- [4] 王文亮, 孙爱东. 胰蛋白酶水解黄粉虫蛋白工艺条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 160-162.
- [5] VINOKUROV K S, ELPIDINA E N, OPPERT B, et al. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2006, 145: 138-146.
- [6] BRADFORD M W. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Ana Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of superoxide dismutase in studying free radical reaction[J]. J Biol Chem, 1969, 24: 6049-6055.
- [8] 邹国林, 罗时文. 一种小白菜叶细胞溶质铜锌超氧化物歧化酶的纯化和性质研究[J]. 生物化学杂志, 1989(5): 182-184.
- [9] 唐云明. 柑叶片蔗糖酶的分离纯化及其部分性质的研究[J]. 植物学报, 1995, 37(8): 594-600.

硫酸软骨素(chondroitin sulfate,简称CS)是来自于动物软骨和鸟类卵的壳膜等组织的一类重要的酸性粘多糖即糖胺聚糖^[1]。硫酸软骨素呈白色或微黄色粉末,无臭,无味,吸水性较强,易溶于水而成黏度大的溶液,不溶于乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂,其盐类对热源较稳定,受热80℃亦不分解。一般硫酸软骨素约含有50~70个双糖的基本结构,按其化学组成和结构,可分为CSA、CSC、CSD三种同分异构体,它们均由D-氨基葡萄糖醛酸和N-乙酰-D-氨基半乳糖组成,只是因硫酸基团位置不同^[1-2]。研究发现,该物质具有良好的抗衰老功能,可以制成各种美容产品和保健食品。如果将其提纯为药品,可治疗某些神经性头痛、关节痛、动脉硬化等病症,还可用于链霉素副作用引起的听觉障碍以及肝功能受损的辅助治疗^[1]。硫酸软骨素作为一种新型药用活性成分,近年来日益受到各国人们的重视。

蛋壳膜是一种以角膜为主体,与黏多糖类相结合的复合蛋白质,溶化后可以获得乙酰氨基葡萄糖半乳糖、葡萄糖醛酸、透明质酸、硫酸软骨素、氨基酸等可溶性高分子化合物的混合物^[3]。我国的蛋壳资源数量巨大,开展蛋制品加工副产业将在很大程度上改变蛋壳来源分散、不易收集、污染严重的现状,同时也为生产硫酸软骨素提供广泛的原料来源。

硫酸软骨素的提取方法有很多种,如高温高压法、中性盐法、碱提法、酶解法等,以上工艺中,浓碱提取工艺产品颜色较深,且废碱液对环境的危害较大;稀碱提取工艺蛋白质含量和氮含量较高,生产周期较长;稀碱稀盐和稀碱浓盐提取工艺,产率和纯度都不高。综合考虑产率和纯度,稀碱-酶解提取工艺是一种较实用的方法^[2,4-6]。本实验以蛋壳膜为原料,通过研究稀碱-酶解提取工艺得到一条优化且实用的提取硫酸软骨素的技术路线,为实际生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

蛋壳膜。

盐酸(分析纯);95%乙醇(分析纯);丙酮(分析纯);氢氧化钠(分析纯);胃蛋白酶及胰蛋白酶;活性炭。

1.2 仪器

721分光光度计;PHS-25精密pH计;DZKW电热恒温水浴锅;101-1干燥箱;JA2002电子天平。

1.3 方法

1.3.1 蛋壳膜分离

实验分别选用浓盐酸,称取100g蛋壳放入1000ml的烧杯中,缓慢加入12mol/L的浓盐酸300ml,搅拌后

放置30min,用清水洗涤,除去残留的酸液,干燥得到蛋壳膜。

1.3.2 分离提取

硫酸软骨素与蛋白质等成分结合在一起,用碱解提取有利于破坏硫酸软骨素与蛋白质之间的键,释放硫酸软骨素,而硫酸软骨素分子上的硫酸基较稳定,一般不会分解断裂而改变分子大小和结构。故在碱解这一步骤中,以蛋壳膜碱解实验中分解率为目标选择最佳工艺条件。通过酶解处理使可溶性蛋白质进一步得到水解,但一次酶解含氮量很难达到要求,所以采用双酶解工艺。

1.3.3 吸附法除杂蛋白

水解完全后,用6mol/L的盐酸调节水解液pH值为6.8~7.0,在搅拌下按1:1(W/V)加入颗粒状活性炭和3%~4%的活性陶土,搅拌吸附1h同时继续维持53℃左右,不时调整pH值6.8~7.0,吸附1h后,用6mol/L的盐酸调节pH值为5.2~5.4,加入2%的氯化钠(W/V),并继续升温近沸(85℃左右)并保温30min,停止加热,趁热用8层纱布过滤,滤液再用滤纸过滤两次得澄清的硫酸软骨素液。

1.3.4 纯化

所得滤液在搅拌下加入乙醇,至乙醇浓度为68%~72%,静置过夜,次日可得胶状沉淀。所得沉淀用无水乙醇及丙酮各洗涤2~3次,用布氏漏斗过滤,滤渣置60~65℃的真空干燥箱中干燥,即得白色的硫酸软骨素粉。

工艺流程:

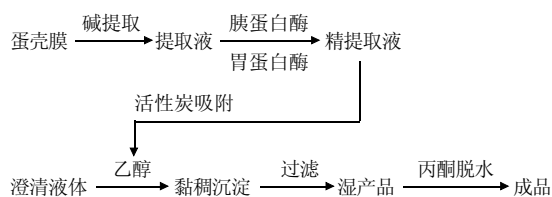


图1 工艺流程

Fig.1 Process of extraction chondroitin sulfate of from the eggshell membrane

1.4 蛋壳膜碱解实验中分解率的计算

实验中蛋壳膜分解率的计算主要是看1g干蛋壳膜经碱解后残留物的多少,为此首先要将碱解后残留物的重量计算出来,主要操作:①按实验号裁取9份4层纱布分别编号1~9;②将编号的纱布边缘有可能要掉的线渣拉去,抖去纱布上杂物,然后称重记录为 m_1-m_9 ;③将碱解后溶液经4层纱布过滤,对好入座;④将纱布与滤渣经干燥箱干燥后一起称重;记录为 M_1-M_9 ;⑤计算分解率。

$$V=(M_i-m_i)/1g$$

1.5 分析方法

原料与产品水分测定：常压恒温干燥法；氮含量测定：自动定氮仪测定产品中的总含氮量；蛋白质含量测定：Folin-酚试剂法测定产品中的蛋白质含量；澄清度测定：用分光光度法测定640nm处溶液的吸收值；含量测定：氨基己糖测定法(Elson-Morgan法)测定硫酸软骨素含量^[7-10]。

1.6 试验设计

本研究设计了正交试验，对影响因素进行分析，找出显著性影响因素，然后再做单因素试验，找出最佳工艺条件。

2 结果与分析

2.1 蛋壳膜碱解优化

实验中用稀碱溶液(NaOH溶液)来对1g干蛋壳膜进行碱解，碱提取过程中主要的影响因素有料液比、碱液浓度、提取温度及提取时间。本研究选取上述四因素三水平 $L_9(3^4)$ 进行正交试验，见表1、2。

表1 蛋壳膜碱解因素水平表
Table 1 Factors and levels of dilute alkali of eggshell membrane

| 水平 | A 料液比 | B 碱液浓度(%) | C 碱解温度(℃) | D 碱解时间(h) |
|----|-------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1:20 | 4 | 40 | 1.5 |
| 2 | 1:30 | 5 | 50 | 2.5 |
| 3 | 1:40 | 6 | 60 | 3.5 |

表2 蛋壳膜碱解正交试验
Table 2 Orthogonal test table of dilute alkali of eggshell membrane

| 试验号 | A | B | C | D | 分解率(%) |
|----------------|---|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 71.3 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 73.0 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 72.3 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 96.1 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 95.3 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 99.9 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 95.9 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 99.6 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 93.4 |
| K ₁ | 216.6 | 263.3 | 270.8 | 260.0 | |
| K ₂ | 291.3 | 267.9 | 262.5 | 268.8 | |
| K ₃ | 288.9 | 265.6 | 263.5 | 268.0 | |
| k ₁ | 72.2 | 87.8 | 90.3 | 86.7 | |
| k ₂ | 97.1 | 89.3 | 87.5 | 89.6 | |
| k ₃ | 96.3 | 88.5 | 87.8 | 89.0 | |
| 极差 | 24.9 | 1.5 | 2.8 | 2.9 | |
| 因素主次顺序 | A D C B | | | | |
| 最优方案 | A ₂ D ₂ C ₁ B ₂ | | | | |

从表2可以看出，料液比、碱液浓度和提取温度

的级差相对较大，说明它们对碱解反应影响较大，属于显著性因素；而pH值和提取时间的级差较小，两者对碱解反应影响不大，属于不显著性因素。确定影响碱解的主次因素依次是：料液比>提取时间>提取温度>碱液浓度。

在碱解部分，最优的工艺组合为：料液比为1:30；提取时间为2.5h；碱液浓度为5%；提取温度为40℃。在此条件下，产品收率较高。

2.2 酶解消除杂蛋白

本实验选取了胰蛋白酶和胃蛋白酶进行充分水解。酶的使用量：胰蛋白酶为1.5%，胃蛋白酶为0.8%。

2.2.1 胰蛋白酶水解优化结果

胰蛋白酶水解时，料液比、水解温度、pH值和水解时间是较大的影响因素。通过预实验，确定了三个水平，每组用1g干蛋壳膜进行正交实验设计，胰蛋白酶水解的因素水平表见表3。

表3 胰蛋白酶水解因素水平表
Table 3 Factors and levels of trypsin hydrolysis

| 水平 | A 酶解温度(℃) | B 料液比 | C 水解时间(h) | D 酶解 pH 值 |
|----|-----------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 40 | 1000:0.5 | 1.5 | 8.2 |
| 2 | 45 | 1000:1.0 | 2.0 | 8.5 |
| 3 | 50 | 1000:1.5 | 2.5 | 8.8 |

表4 胰蛋白酶水解正交试验方案表
Table 4 Orthogonal test table of trypsin hydrolysis

| 试验号 | A | B | C | D | 纯度(%) |
|----------------|---|--------|--------|--------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 63.01 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 66.48 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 60.32 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 56.37 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 75.55 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 73.80 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 68.10 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 62.50 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 69.12 |
| K ₁ | 189.81 | 187.48 | 199.31 | 207.68 | |
| K ₂ | 205.72 | 204.53 | 191.97 | 208.38 | |
| K ₃ | 199.72 | 203.24 | 203.97 | 179.19 | |
| k ₁ | 63.27 | 62.49 | 66.44 | 69.23 | |
| k ₂ | 68.57 | 68.18 | 63.99 | 69.46 | |
| k ₃ | 66.57 | 67.75 | 67.99 | 59.73 | |
| 极差 | 5.30 | 5.69 | 4.00 | 9.73 | |
| 因素主次顺序 | D B A C | | | | |
| 最优方案 | D ₂ B ₂ A ₂ C ₃ | | | | |

从表4实验结果可以看出，pH值的级差最大，影响作用最大，而料液比、水解温度和水解时间的级差较小，影响作用较小。确定胰蛋白酶酶解的主次因素依次为：pH值>料液比>水解温度>水解时间。

酶解时，由于水解的进行和氨基酸的释放，pH值

一直下降,过程中pH值应保持在8.0以上。胰蛋白酶水解的最佳工艺条件是:pH值为8.2,料液比为1000:1,水解温度为45℃,水解时间为2h。

2.2.2 胃蛋白酶水解优化结果

胃蛋白酶水解时,料液比、水解温度、pH值和水解时间对反应的影响较大。通过预实验,确定了三个水平,每组用1g干蛋壳膜进行正交实验设计。胃蛋白酶水解的因素水平见表3。

表5 胃蛋白酶水解因素表
Table 5 Factors and levels of pepsin hydrolysis

| 水平 | A 酶解温度(℃) | B 料液比 | C 水解时间(h) | D 酶解 pH 值 |
|----|-----------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 40 | 1000:0.5 | 1.5 | 5.5 |
| 2 | 45 | 1000:1.0 | 2.0 | 6.0 |
| 3 | 50 | 1000:1.5 | 2.5 | 6.5 |

表6 胃蛋白酶水解正交试验方案表
Table 6 Orthogonal test table of pepsin hydrolysis

| 试验号 | A | B | C | D | 纯度(%) |
|----------------|--------|--------|---|--------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 71.12 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 73.22 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 56.24 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 64.11 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 76.12 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 57.85 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 62.99 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 52.21 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 66.03 |
| K ₁ | 200.58 | 198.22 | 181.18 | 213.27 | |
| K ₂ | 198.08 | 201.55 | 203.36 | 194.06 | |
| K ₃ | 181.23 | 180.12 | 195.35 | 172.56 | |
| k ₁ | 66.86 | 66.07 | 60.39 | 71.09 | |
| k ₂ | 66.03 | 67.18 | 67.79 | 64.69 | |
| k ₃ | 60.41 | 60.04 | 65.12 | 57.52 | |
| 极差 | 6.45 | 7.14 | 7.40 | 13.57 | |
| 因素主次顺序 | | | D C B A | | |
| 最优方案 | | | D ₁ C ₂ B ₂ A ₁ | | |

由表6实验结果可知,各种影响因素的级差相差不大,即各影响因素对纯度的影响不是很大。有关资料

报道,胃蛋白酶对蛋白质的含量有较大的影响,因此在后续工作中,我们将对胃蛋白酶的作用进行分析实验。胃蛋白酶水解最佳工艺:pH值5.5,水解时间2.0h,料液比1000:1,水解温度40℃。

3 结 论

实验得到从蛋壳膜提取硫酸软骨素的最佳条件及纯化条件为:料液比为1:6;碱液浓度为5%;提取温度为40℃;提取时间为2.5h。胰蛋白酶水解的最佳工艺条件是:pH值为8.2;水解温度为45℃;料液比为1000:1;水解时间为2.0h。胃蛋白酶的影响因素相差不大,最佳工艺条件:料液比为1000:1;水解温度为40℃;pH值为5.5;水解时间为2.0h。在此条件下做重复实验,提取出来的硫酸软骨素产品产率可以达到21%,纯度达到76%左右;与优化前的工艺相比,产率、纯度均有所提高。

参考文献:

- [1] 林洪,姬胜利.硫酸软骨素的药理作用及应用研究进展[J].食品与药品,2006,8(12):4-6.
- [2] 王凤琴.硫酸软骨素生产新工艺的研究[J].淮阴工学院学报,2003,12(3):71-73.
- [3] 皮钰珍,王淑琴,李秋红.鸡蛋壳膜资源的开发与应用前景[J].食品科技,2006,27(4):128-130.
- [4] 高华,刘坤,于兹东,等.硫酸软骨素生产新工艺研究[J].青岛大学学报:工程技术版,2003,18(4):55-57.
- [5] 赵培城,高红林,朱顺达.硫酸软骨素提取工艺的研究[J].食品科技,2004,33(4):14-17.
- [6] 李瑞国.硫酸软骨素不同生产工艺的考察[J].中国医药工业杂志,2003,34(5):221-222.
- [7] 刘坤,高华,于兹东.硫酸软骨素快速测定方法的研究[J].青岛大学学报:自然科学版,2003,16(2):39-41.
- [8] 罗曼,蒋立科.硫酸软骨素快速提取法研究[J].动物学杂志,2000,36(5):37-39.
- [9] 朱瑞芬,童心龙,李凝.硫酸软骨素的研制[J].中国医药工业杂志,2000,31(6):255-256.
- [10] 宋国胜,曹珍年.硫酸软骨素的提取及分析鉴定[J].现代科学仪器,2003,13(3):60-61.



日本成功开发大米DNA鉴定技术

8月9日,日本食品综合研究所公布了成功开发大米DNA鉴定技术的消息。主要是从日本酒当中提取原料米的DNA,判定原料米的品种,该技术在世界上还是首例。

研究所还表示,该技术还可应用于葡萄酒原料葡萄的品种判定。通过该技术的发行,希望借此维护优良品种米的培育者的权利,以及确保日本就的良好信赖度。此前,因日本酒含有其他成分的DNA,从而给原料米DNA的判定带来一定困难,而新技术的诞生可能将弥补其不足。