

蛋壳膜中透明质酸的提取 及部分特性研究

赵玉红^{1,2}, 迟玉杰^{1,*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 分别采用胰蛋白酶和胃蛋白酶降解蛋壳膜, 从中提取透明质酸。通过正交实验考察酶解温度、pH、酶用量、料液比和酶解时间对透明质酸提取量的影响, 确定采用胰蛋白酶酶解的最佳条件为: 温度为 50℃, 时间为 7h, 料液比为 1:40, 酶用量为 8000U/g, pH 为 8.5, 提取率为 13.294mg/g; 采用胃蛋白酶酶解的最佳条件为: 温度为 37℃, 时间为 5h, 料液比为 1:40, 酶用量为 11000U/g, pH 为 3.0, 提取率为 24.494mg/g。结果表明, 胃蛋白酶提取透明质酸的效果好于胰蛋白酶, 且壳膜中含有重要数量的透明质酸。通过红外光谱分析和测定葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖的含量, 对提取的透明质酸进行分析鉴定。

关键词: 蛋壳膜, 透明质酸, 提取, 酶, 特性

Extraction and partial characterization of hyaluronic acid from eggshell membrane

ZHAO Yu-hong^{1,2}, CHI Yu-jie^{1,*}

(1. Food College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Forestry College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Hyaluronic acid (HA) was extracted from eggshell membrane with trypsin and pepsin, respectively. The effects of extraction temperature, pH, the amount of enzyme, the ratio of material-fluid, and extraction time were investigated with orthogonal experiment. The optimized parameters of trypsin were obtained and shown as follows: extraction temperature 50℃, pH 8.5, amount of enzyme 8000U/g, the ratio of material-fluid in 1:40, extraction time 7h, the yielding rate of hyaluronic acid was 13.294mg/g (eggshell membrane). The optimized parameters of pepsin were obtained and shown as follows: extraction temperature 37℃, pH 3.0, amount of enzyme 11000U/g, the ratio of material-fluid in 1:40, extraction time 5h, the yielding rate of hyaluronic acid was 24.494mg/g (eggshell membrane). This indicated that the effect of the yielding rate with pepsin was better than trypsin. And indicated that there were significant quantities of HA could be extracted in eggshell membrane. The content and purity were tested by infraction spectrum, glucuronic acid and N-acetylglucosamine.

Key words: eggshell membrane; hyaluronic acid; extraction; enzyme; characterization

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)06-0172-03

蛋壳膜中含有的 N-乙酰氨基葡萄糖半乳糖、葡萄糖醛酸、透明质酸、硫酸软骨素等活性大分子^[1] 正逐步被人们所认识并利用。透明质酸 (Hyaluronic acid, 简称 HA), 是一种酸性多聚粘多糖, 是由 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸通过 β -1,4 和 β -1,3 糖苷键反复交替连接而成。由于其独特的保水、润滑等高分子多糖的性质及天然、无过敏和与人体组织良好的生物相容性, 被广泛应用于化妆品、保健食品和

医药领域^[2]。目前从动物组织中提取透明质酸主要以鸡冠、人脐带、动物眼球等为原料^[3-5], 从其他原料也有提取 HA 的研究^[6,7]。但是由于原料资源的限制, 不能满足市场对透明质酸的需求。最近, 国外学者探测到蛋壳膜中含有高浓度的透明质酸^[8], 而蛋壳是一类容易获得且数量巨大的废弃物, 因此, 若以蛋壳膜作为提取透明质酸的原料, 对蛋壳的深加工利用及提高产品附加值具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

原料 鸡蛋壳、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶; 葡萄糖醛酸标准品、盐酸氨基葡

收稿日期: 2008-04-11 * 通讯联系人

作者简介: 赵玉红 (1968-), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 食品深加工及综合利用。

葡萄糖标准品、咪唑 购于美国 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯。

电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9240, 上海一恒科学仪器有限公司;紫外可见分光光度计 岛津 UV-2401PC; pH 计 pHs-3c, 上海伟业仪器厂;高精度电子分析天平 JA2003, 上海良平仪器仪表有限公司;电热恒温水浴锅 HHS, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;控温磁力搅拌器 85-2, 常州国华电器有限公司;台式高速离心机 JDL-5, 上海安亭科学仪器有限公司;组织匀浆机 JJ-2, 常州国华电器有限公司;高速万能粉碎机 FW100, 天津市泰斯特仪器有限公司;真空旋转蒸发仪 RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 清洗鸡蛋壳,对鸡蛋壳进行破碎,采用简易水分离法使蛋壳和蛋壳膜分离。蛋壳膜经 40℃ 烘干后,用万能粉碎机将其粉碎,过 60 目筛备用。

1.2.2 工艺流程 过筛蛋壳膜→蒸馏水浸泡→加入 1% 氯化钠→搅拌加热 90℃,保温 10min→冷却至室温→分别加胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解→离心过滤收集上清液→浓缩→调 pH→2 倍体积的 95% 乙醇醇沉 12h→离心收集沉淀→无水乙醇脱水 3~5 次→干燥得透明质酸中间品

1.2.3 HA 纯化工艺流程 透明质酸粗品 I→溶解→除蛋白色素等杂质→浓缩→95% 的乙醇醇沉→离心→无水乙醇洗涤→冷冻干燥→透明质酸粗品 II→溶解→CPC 法纯化 HA→透明质酸纯品 I

1.2.4 透明质酸含量的测定 透明质酸含量采用 Bitter-Muir 咪唑法^[9]测定。精密称取葡萄糖醛酸(AR) 10mg,置 50mL 量瓶中,加水溶解至刻度,摇匀备用。精密量取标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL,分别加入 10mL 量瓶中,加水稀释至刻度,得 10、20、30、40 和 50μg/mL 浓度的对照品溶液。取 6 只具塞刻度试管分别加入硼砂硫酸液 5mL,置冰浴中冷至 4℃ 左右。然后分别取空白溶液(蒸馏水)和不同浓度的对照品溶液各 1mL,加入试管中,先轻轻振摇,再充分混匀,并不断用冰浴冷却,将试管置沸水中加热 10min,置常水中冷至室温。加入咪唑试剂 0.2mL,混匀,水浴中再加热 15min,冷至室温。在 530nm 处测定吸光度 A。

取本品 0.1g/L 的溶液 1mL,照标准曲线项下的方法测定吸光度。从标准曲线上查出相应的葡萄糖醛酸浓度,按下式计算含量:葡萄糖醛酸% = (标准曲线查出的浓度/样品液浓度)/(1 - 干燥失重%) × 100%,由于葡萄糖醛酸的含量占整个产量的 46.43%,因此测得醛酸的含量除以 46.43%,就可以得到 HA 的产量。

$$\text{HA 得率} = \frac{\text{处理后 HA 含量} \times \text{样品液体积}}{\text{处理前 HA 含量} \times \text{样品液体积}} \times 100\%$$

1.2.5 氨基葡萄糖的测定 氨基葡萄糖标准曲线测定采用改进的 Elson-Morgan 法,盐酸氨基葡萄糖(105℃ 干燥至恒重)配成 100μg/mL 作为标准溶液。分别吸取标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 置 25mL 具塞试管中,分别加水到 2mL,加入 7% 乙酰丙酮试

液 1mL,置沸水浴中加热 25min,取出后冰浴 5min,放至 60℃,再加入 2.6% 对-二甲氨基苯甲醛试液 1mL,加乙醇至 10mL,放置 60min,以空白管为空白,在 530nm 波长处测定吸收度(A),以氨基葡萄糖浓度对吸收度作标准曲线^[5]。

1.2.6 胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解作用的正交实验因素和水平^[10] 见表 1、表 2。

表 1 影响胰蛋白酶酶解作用的因素和水平

水平	A 温度 (°C)	B pH	C 酶用量 (U/g)	D 料液比 (g/mL)	E 时间 (h)
1	45	7.5	7500	1:35	6.5
2	50	8	8000	1:40	7
3	55	8.5	8500	1:45	7.5
4	60	9	9000	1:50	8

表 2 影响胃蛋白酶酶解作用的因素和水平

水平	A 温度 (°C)	B pH	C 酶用量 (U/g)	D 料液比 (g/mL)	E 时间 (h)
1	30	2.5	9000	1:30	4.0
2	33	3.0	10000	1:35	4.5
3	35	3.5	11000	1:40	5.0
4	37	4.0	12000	1:45	5.5

1.2.7 HA 红外光谱分析 用酒精擦拭研钵、镊子、压片用器具等,在研钵中放入少量样品,加入适量 KBr,调整样品浓度以保证较高的透光率。在红外灯照射下把样品和 KBr 混匀,研成粉末状。取适量样品压片,将样品放入样品室。用傅立叶变换红外光谱仪在 400~4000cm⁻¹ 区间扫描,分辨率设置为 4cm⁻¹,扫描 40 次。

2 结果与分析

2.1 用胰蛋白酶提取 HA 正交实验结果

从正交实验结果可以看出,酶解温度对透明质酸提取量的影响最大,其次是酶用量、液料比、酶解时间,其中溶液的 pH 影响最小。本次正交实验得到的理论上的最佳工艺为: A₂B₃C₂D₂E₂,即胰蛋白酶酶解温度 50℃,溶液 pH 为 8.5,加酶量为 8000U/g,料液比为 1:40,酶解时间为 7h。在此条件下,蛋壳膜中透明质酸的提取量为 13.294mg/g。从方差分析可以看出,酶解温度和酶用量对透明质酸提取量有显著的影响,其它对透明质酸提取量无显著影响。

2.2 用胃蛋白酶提取 HA 正交实验结果

从正交实验结果可以看出,pH 对透明质酸提取量的影响最大,其次是酶解温度、酶解时间、料液比,其中酶用量影响最小。本次正交实验得到的理论上的最佳工艺为: A₄B₂C₃D₃E₃,即胃蛋白酶酶解温度 37℃,溶液 pH 为 3.0,加酶量为 11000U/g,料液比为 1:40,酶解时间为 5h。在此条件下,蛋壳膜中透明质酸的提取量为 24.494mg/g。从方差分析可以看出,酶解温度、pH、料液比对提取量有显著的影响。

2.3 胰蛋白酶和胃蛋白酶提取蛋壳膜中透明质酸提取量比较

在分别用胰蛋白酶和胃蛋白酶提取蛋壳膜中透明质酸后,对 HA 提取效果进行比较(n=3),如图 1 所示。

通过胰蛋白酶和胃蛋白酶从蛋壳膜中提取透明

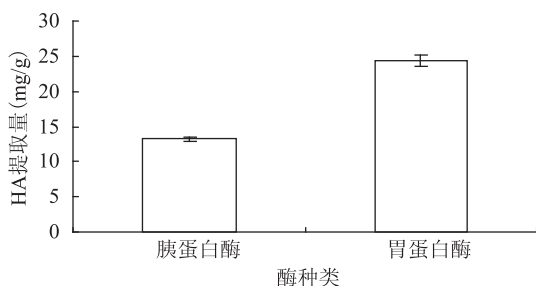


图1 胰蛋白酶和胃蛋白酶提取 HA 效果比较

质酸的效果比较可以看出,采用胃蛋白酶更有利于 HA 的提取,提取量比用胰蛋白酶高出近 1 倍。从组织中提取透明质酸需要使用非专一性酶^[11],本实验说明胃蛋白酶更适合随机切断蛋壳膜中蛋白肽键,从而释放出更多透明质酸。而且(干)蛋壳膜中脂肪含量只占 2.5% 左右^[8],与其它原料相比可以省去脱脂的工艺过程,更有利于透明质酸的提取。提取的 HA 经 1.2.3 方法纯化后进行特性研究。

2.4 HA 提取物特性研究

2.4.1 HA 含量及纯度测定 图 2A 所得标准曲线回归方程为: $y = 0.017x + 0.0027$, 相关系数 $R^2 = 0.9989$, 其中, y : 待测液的吸光度; x : 待测液中葡萄糖醛酸浓度 (mg/L)。葡萄糖醛酸的存在和定量分析是证明提取物是具有多糖聚合物结构的重要力证^[5]。由 Bitter 呋唑法测得, 样品葡萄糖醛酸含量为 41.3%。图 2B 所得标准曲线回归方程为: $y = 0.0067x - 0.0065$, 相关系数 $R^2 = 0.9983$, 其中, y : 待测液的吸光度; x : 待测液中氨基葡萄糖浓度 (mg/L)。采用 Elson-Morgan 法也可以对 HA 制备物中 N-乙酰氨基的存在进行定量测定^[5]。由 Elson-Morgan 法测得, 样品氨基葡萄糖含量为 40.8%, 其摩尔比约为 1:1。

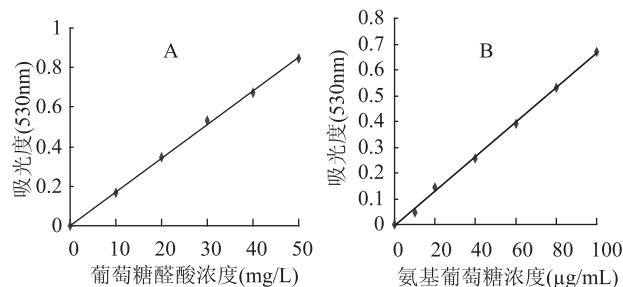


图2 葡萄糖醛酸和氨基葡萄糖标准曲线

2.4.2 HA 提取物红外光谱分析 由图 3A 可见,透明质酸红外吸收图谱在 3412cm^{-1} 处有强烈的 -OH 伸缩振动的特征吸收峰, 表明存在着多糖羟基结构。 1625cm^{-1} 和 1555cm^{-1} 处有 -C=O 和 N-H 弯曲振动的特征吸收峰, 表明存在着乙酰氨基结构。在 1410cm^{-1} 和 1380cm^{-1} 处有 O=C-O- 伸缩振动-OH 弯曲振动耦合产生的两个吸收峰, 表明存在着糖醛酸上解离羧基和多羟基结构, 以上吸收情况与透明质酸标准品的红外图谱(见图 3B)一致。

3 结论

本研究通过以上实验, 得出如下结论: 胰蛋白酶

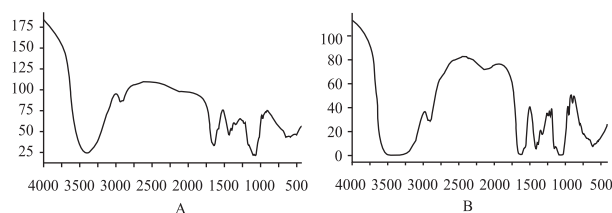


图4 HA 红外光谱

提取蛋壳膜透明质酸的最佳工艺条件为: 酶解温度 50°C , 溶液 pH 为 8.5, 加酶量为 8000U, 料液比为 1:40, 酶解时间为 7h。在此条件下, 透明质酸的提取量为 13.294mg/g 。采用胃蛋白酶提取透明质酸的最佳工艺条件为: 酶解温度 37°C , 溶液 pH 为 3.0, 加酶量为 11000U/g, 料液比为 1:40, 酶解时间为 5h。在此条件下, 蛋壳膜中透明质酸的提取量为 24.494mg/g 。从提取效果看, 采用胃蛋白酶透明质酸的提取率更高, 证明蛋壳膜中含有重要数量的透明质酸。红外光谱分析说明, 提取的样品具有 HA 的特征吸收峰, 从而证明提取物为 HA。样品葡萄糖醛酸含量为 41.3%, 样品氨基葡萄糖含量为 40.8%, 其摩尔比约为 1:1。

参考文献:

- [1] 罗有福, 佟健, 盛绍基. 鸡蛋膜的最新研究进展[J]. 云南化工, 2002, 29(1): 21~23.
- [2] Lapcik L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications [J]. Chem Rev, 1998, 98: 2663~2684.
- [3] 潘红梅. 透明质酸的研究现状综述[J]. 四川食品与发酵, 2003, 39(116): 5~9.
- [4] 顾其胜, 严凯. 透明质酸与临床医学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2003. 263~264.
- [5] Guillermo Lago, Loida Oruna, Jose A Cremata, et al. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 62(4): 321~326.
- [6] 孙智华, 王建军, 侯喜林, 等. 泥鳅粘液中透明质酸的制备及其理化性质的研究[J]. 药物生物技术, 2001, 8(1): 42~44.
- [7] 王大为, 张艳荣, 沙坤, 等. 中国林蛙皮多糖类天然保湿因子的提取与鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(6): 99~102.
- [8] Long, Frank Daniel, Adams, et al. Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane [P]. U S Patent: 004183. 2003-07-09.
- [9] Bitter T, AMuri H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. Anal Biochem, 1962(4): 330~333.
- [10] 郑少华, 姜奉华. 试验设计与数据处理[M]. 北京: 中国建材工业出版社, 2003.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.