

蛋壳内膜中角蛋白的提取研究

张瑞宇, 陈嘉聪

(重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400060)

摘 要: 对文献曾有提及的蛋壳壳、膜分离方法进行了比较和工艺改进, 发现一步碱处理法简化了工艺程序, 免去了酸的消耗, 并有利于壳、膜彻底分离; 对碱水解壳内膜提取角蛋白时, 碱浓度、温度、固液比这三个主要影响因素分别进行了研究, 在此基础上, 采用正交试验优化提取条件, 最后选用温和的物理处理方式透析除杂、聚乙二醇脱水、真空干燥制成角蛋白产品。在本实验条件下, 角蛋白提取的最佳工艺参数为: NaOH 5.2%、固液比 1:16、温度 85℃。从壳内膜中提取角蛋白的得率为 48.6%。

关键词: 壳内膜; 角蛋白; 水解; 提取

Studies on Extracting Keratin in the Eggshell Membrane

ZHANG Rui-yu, CHEN Jia-cong

(College of Environmental and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400060, China)

Abstract: The methods for separating eggshell from its inner-membrane, which have been mentioned in some literatures before have been compared, and certain improvements of the separating technology have been made. It has been found out that if one-step alkali treatment was only used during separation, any acid needn't be used, and the separation technology could be simplified, the separation was very thorough. Meanwhile, the main factors closely related with the results of keratin hydrolysis, including extracting temperature, alkali concentration and ratio of solid/liquid, have respectively been studied, then based on this, the orthogonal test has been conducted and optimal combination of the three has been obtained, under 85℃, 5.2% of alkali used, and 1:16 of solid/liquid, the extracting rate of keratin from eggshell inner-membrane was 48.6% under this experiment. The keratin in hydrolysis liquid could be purified by dialysis, dehydration by polyethylene glycol, and vacuum drying.

Key words: eggshell membrane; keratin; hydrolyze; extracting

中图分类号 T S201.21

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0251-04

蛋壳是一类数量巨大的废弃物, 据报道, 我国每年约有 400 万吨蛋壳投入环境, 客观上对环境造成日益严重的污染。研究蛋壳中天然钙源的转化利用已有报道, 将蛋壳加工成粉作为饲料添加剂也已有应用实例, 但对蛋壳内膜的研究却一直滞后。事实上, 蛋壳内膜与畜产品加工业的主要副产品: 角、蹄、皮、毛一样, 同为潜在的蛋白质、氨基酸资源, 其共同的特征是含有丰富的角蛋白。

角蛋白(Keratin)是一种纤维性的不溶性蛋白。它广泛存在于人和动物的表皮, 并且是毛发、羽毛、蹄、壳、爪、角中的主要成分, 粗蛋白含量约为 80% 以上, 提纯后得率可达 25% 以上。X 射线衍射研究表明角蛋白在自然状态下有两种结构, 分别为 α 螺旋和 β 折叠^[5,6],

肽链上不同位点结合着不同的侧链。角蛋白中高密度的具有较高键能的二硫键使相邻的肽链和自身肽链的不同部分相交联, 这是天然角蛋白性质非常稳定, 在常规条件下不溶于各种溶剂的原因。研究认为, 当角蛋白 90% 的二硫键被打开时溶解性显著改善。从而成为角蛋白提取的理论依据。

至今, 有关角蛋白的研究仍集中于羊毛、猪毛、羽毛和人发上^[2~4], 并由此而总结出这类角蛋白的提取工艺技术。关于蛋壳角蛋白的研究报道极少见到。不同的是蛋壳角蛋白的提取首先存在一个壳与膜的分离问题, 两者具有不同的资源价值, 因此参考现有技术, 研究适合于蛋壳膜角蛋白的提取技术无疑是必要的。

蛋壳膜由角蛋白和少量粘蛋白纤维构成, 含有丰富的

收稿日期: 2005-06-02

作者简介: 张瑞宇(1947-), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食物资源研究与开发利用。

羟脯氨酸、羟赖氨酸和胱氨酸。传统医学称卵壳膜为“凤凰衣”，确认其有润肺止咳、止喘开音、明目消翳之功效，可用于多种炎症的治疗；在皮肤、头发的清洁、保护和滋养方面也独具优势；在食品应用上，它能使发泡饮料泡沫丰富持久，使食品质地细腻有韧性，改善口感，提高品质；非常适用于保健食品的研发。其它的商业应用价值也不断被发现。

资料报道的壳、膜分离方法主要是简易机械分离法、酸碱处理法。后者指用酸溶胀分离天然角蛋白，再用碱对其水解制备水解蛋白液，并认为酸是有效的壳、膜分离剂^[1]。本文旨在寻求高效实用、可操作性更强的新的提取方法；并完成角蛋白产品制备的工艺研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

新鲜鸡蛋壳 收集于本地面包房。

氢氧化钠、碳酸氢钠、无水乙醇、冰醋酸，均为分析纯。

乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na₂)；聚乙二醇 进口分装。

电子精密天平 PB20B-N、pH 计 HH-6 均为梅特勒—托利多仪器 数显恒温水浴锅 DZF-1型 常州市华普达教学仪器有限公司 真空干燥箱 LD4-2A 上海福玛实验设备有限公司；低速离心机 250V×10A 北京医用离心机厂；家用搅拌机 HL2000；电炉 透析袋(可通过分子量范围：8000~14000 道尔顿)。

1.2 蛋壳预处理和角蛋白提取工艺流程

蛋壳收集→清水浸泡→清洗→餐具洗涤剂浸泡→擦洗去污→净水漂洗3次→沥干→60℃烘干→冷却后立即收藏备用

洗净干燥蛋壳→适度粉碎→过筛→定量取样→碱法水解→调节 pH→分离蛋壳→透析除杂→吸附脱水→真空干燥→角蛋白

1.3 壳膜分离方法的比较研究

1.3.1 机械法 称取干燥蛋壳 20.0g 2份，家用搅拌机粉碎到大量颗粒粒径在 0.1~0.5mm 范围内，作 A、B 二项处理：

A	20g 壳粉	加水 200ml	浸泡 1h	剧烈搅拌 10min，间歇 5min
B	20g	200ml	浸泡 0.5h，煮沸 0.5h	煮沸中经常搅拌

1.3.2 酸分离法 称取干燥蛋壳 20g，6 份，作不同粉碎处理，各加水 200ml，根据文献资料调整确定加酸量※，处理如下。

1.3.3 碱分离法 称取粒度 0.5~1mm 的干燥蛋壳颗粒 20g，4 份，各加水 200ml 处理如下。

	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	F ₁
粉碎程度	0.5~1mm	5~10mm	5~10mm	0.5~1mm	5~10mm	5~10mm
加酸量※(ml)	(HCl)15	15	7	(HAc)20	20	10

※ 缓慢加酸，并根据产气情况适度搅拌。

	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂
加热温度(℃)	18~20	18~20	75	75
NaOH 浓度(%)	4	8	4	8

1.3.4 蛋壳粒度对碱法分离效果的影响

称取蛋壳 20g，5 份，作不同粉碎处理，各加水 200ml，80℃下碱水解，见下表。

	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃	E ₃
粉碎程度	0.5~1mm	5~10mm	10~20mm	不粉碎	不粉碎
碱浓度(%)	4	4	4	4	8

1.4 角蛋白碱水解关键工艺研究

1.4.1 蛋壳膜碱提取单因子试验

以下各试验号均取蛋壳 20g(粒度 5~10mm)，加水 200ml，反应时间 1h。

1.4.1.1 不同 NaOH 浓度对蛋壳膜得率的影响 反应条件：80℃ 固液比 1:15。

	A	B	C	D
NaOH 浓度(%)	2	4	6	8

1.4.1.2 不同温度对蛋壳膜得率的影响 反应条件：NaOH 6%，固液比 1:15。

	A	B	C	D
温度(℃)	30	60	80	90

1.4.1.3 不同固液比对蛋壳膜得率的影响 反应条件 80℃ NaOH 6%。

	A	B	C	D
固液比	1:5	1:10	1:15	1:20

1.4.2 正交实验设计

依据单因素试验得出的结果，在力图降低碱用量、防止角蛋白水解过度的原则下，兼顾充分提取和缩短工艺时间两方面，选择了 L₉(3³) 正交表，作如下实验安排。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

	碱浓度(%)	固液比	温度(℃)
1	4.8	1:16	80
2	5.2	1:17	85
3	5.6	1:18	90

2 结果与讨论

表2 不同壳膜分离方法效果的比较
Table 2 Effects of different methods for separating eggshell from its membrane

	机械法		酸分离法						碱分离法			
	A	B	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	F ₁	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂
反应情况	—	—	++	++	+	++	+	+	—	—	—	—
悬浮膜量	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+	++	++
最后分离	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—

备注 1. 体系反应很激烈++；激烈+；较平静—；平静—；2. 悬浮膜片很多++；多+；较少—；少—；3. 壳与膜最后能彻底分离+；不能彻底分离—；难以分离—。

2.1 不同分离方法的效果

从表2可知机械法不能破坏壳与膜的结合力，即使煮沸后，也只有少量悬浮膜片，这与资料介绍的情况差别很大(蛋壳处理条件相同)。

酸分离法的效果主要取决于酸的强度和浓度。资料报道用12N的盐酸处理，可完全分离。实际上当酸加入体系中时，蛋壳 CaCO_3 就立即与酸反应，产生 CO_2 ，随着酸的强度与浓度的增加，反应越加激烈，泡沫堆积。在酸过量的情况下，最终 CaCO_3 会被耗尽，在此进程中膜也会逐渐脱落，因此可以将膜分离出来，再行碱水解，但膜中角蛋白的结构也必然受到酸的破坏。同时，当大量泡沫产生时，无法观察壳与膜的分离情况。由于蛋壳中 CaCO_3 含量很高，一般为93%以上，因此耗用的酸很多。为了加快分离速度，就必须提高酸的浓度。本实验发现，加酸时如果同时加热，会使气泡急剧涌出，出现“暴沸”现象，引起物料浪费，因此使用强酸或弱酸浓度较高时，不宜加热。

碱处理较易破坏壳、膜间的结合力，这一作用随碱浓度的上升而增强，因此碱浓度较高时，反应体系中很快出现膜片悬浮，但由于处理对象是蛋白质，强碱对蛋白质会造成明显的破坏，实验发现在较低碱浓度下，适当加热(75℃时就有较好效果)，不仅有利于蛋白质的稳定，大大加快反应速度。而且碱法处理一步到位，节省了酸的消耗和工艺操作，还可直接分离出纯净蛋壳提供有机钙的制备。实验还发现最终分离效果与蛋壳的粉碎程度密切相关，对蛋壳粉碎程度的控制是一个重要的技术细节。

2.2 蛋壳粉碎程度对壳、膜分离效果的影响

不同粉碎程度对壳、膜分离效果的影响见表3。

表3 蛋壳粉碎程度与壳、膜的分离效果
Table 3 Relations in degrees of crashing and effects of separating eggshell from its membrane

	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃	E ₃
分离速度	很快	快	较快	较慢	快
悬浮膜量	++	++	+	—	+
最后分离	—	+	+	+	+

A₃由于粉碎度较高，颗粒，尤其是较小颗粒很易悬起，壳、膜分离时，不免有小颗粒和粉状蛋壳混入膜液中，而不加粉碎的蛋壳(D₃、E₃)，最后分离度高，操作简单、方便，但由于整块蛋壳与碱液接触面积小，而蛋膜分子间结合力较强，使分离速度减慢。尽管E₃快于D₃，本实验遵循尽量降低碱浓度的原则，提倡C₃和B₃的处理条件，相比而言，B₃的效果最佳，即颗粒为5~10mm，反应速度较快，壳、膜分离彻底。

2.3 单因子试验结果

2.3.1 不同浓度NaOH处理的蛋壳膜得率

不同浓度NaOH处理后，在规定的时间内，蛋壳膜的得率见图1。

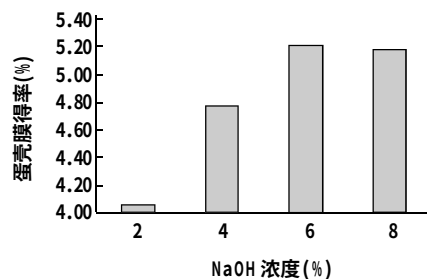


图1 不同NaOH浓度对蛋壳膜得率的影响
Fig.1 Effects on producing rate of membrane with defferent concentrations of NaOH

图1显示，随着NaOH浓度的增加，蛋壳膜得率先增大后略有下降，NaOH浓度为6%时，蛋壳膜得率最高。2%的NaOH浓度过低则碱性弱，双硫键难以打开，以致水解反应极为缓慢；依据以上的数据可推断在NaOH浓度4%~8%之间存在最佳反应浓度。

2.3.2 不同温度处理的蛋壳膜得率

采用不同的分离提取温度，在规定的时间内，蛋壳膜的得率见图2。

图2显示，由于30℃温度过低，水解反应不能顺利进行，可观察到壳、膜分离极为缓慢，在规定的时间内，反应体系无变化，壳、膜基本没有分离；60℃时，水解反应显著加快，蛋壳膜得率明显上升，80℃时达到最大值，由此可推断，温度对壳膜角蛋白的水

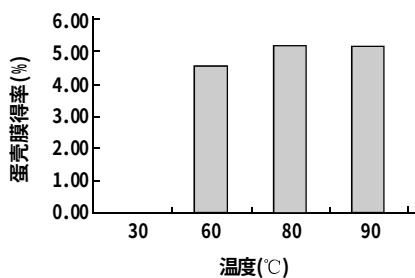


图2 不同温度控制对蛋壳膜得率的影响

Fi.2 Effects on producing rate of membrane with different temperatures used

解有重要作用, 在 80~90℃之间存在最佳反应温度。

2.3.3 不同固液比条件下的蛋壳膜得率

不同固液比条件下, 规定的时间内, 蛋壳膜的得率见图 3。

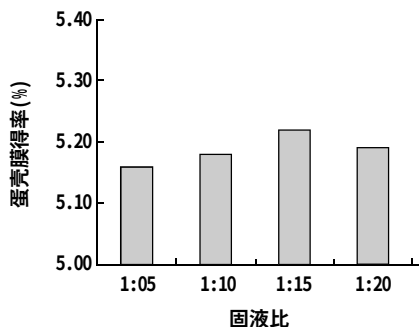


图3 不同固液比对蛋壳膜得率的影响

Fig.3 Effects on producing rate of membrane with different ratios of solid/liquid

图 3 显示, 在试验设置的固液比范围内, 固液比 1:15 时蛋壳膜得率最高, 固液比 1:5 蛋壳膜得率最低, 其原因是 NaOH 的用量增加, 蛋壳内膜中角蛋白与 NaOH 充分反应, 使水解更完全, 二硫键和肽键被破坏, 蛋白质溶解量增大; 同时固液比过小, 使得体系分散不均匀, 局部粘度过高, 不利于蛋壳内膜与 NaOH 间的完全反应, 而固液比过大, 对反应不会起到有利影响, 反而增加后期制备的压力。依据以上数据可推断固液比在 1:10~1:20 之间存在最佳比例。

2.4 水解壳内膜提取角蛋白的工艺优化实验结果

角蛋白提取正交实验结果见表 4。

从表 4 可知提取条件的最佳组合是: A2B1C2, 即 NaOH 浓度 5.2%、固液比 1:16、温度 85℃。在此条件下蛋壳膜中角蛋白的提取率是 48.6%。极差分析结果表明, 碱浓度对角蛋白得率影响最大, 温度次之, 固液比影响较小, 原因在于碱液不仅可破坏二硫键, 打开角蛋白分子主链间和主链内的结合, 促进角蛋白的溶解, 而且碱还会破坏氢键、盐键、肽键等其它化学键,

表4 角蛋白提取正交实验结果表

Table 4 Results of orthogonal test of extracting keratin from eggshell membrane

序号	A	B	C	角蛋白提取量(g)	角蛋白得率(%)
1	4.8	1:16	80	0.431	41.8
2	4.8	1:17	85	0.441	42.4
3	4.8	1:19	90	0.451	43.4
4	5.2	1:16	85	0.501	48.6
5	5.2	1:17	90	0.476	46.1
6	5.2	1:19	80	0.486	46.7
7	5.6	1:16	90	0.457	44.1
8	5.6	1:17	80	0.432	41.9
9	5.6	1:19	85	0.466	45.0
K ₁	127.6	134.5	130.4		
K ₂	141.4	130.4	136.0		
K ₃	131.0	135.1	133.6	平均提取量=0.460	
k ₁	42.5	44.8	43.5	因素影响的主次排序为	T=400.0
k ₂	47.1	43.5	45.3	A > C > B	
k ₃	43.7	45.0	44.5		
R	4.6	1.5	1.8		

使角蛋白分解形成较多的小分子产物, 降低大分子角蛋白得率, 因此控制好碱作用强度非常重要。同时, 提高温度必然加强碱的作用, 有利于加快反应的进行, 但高温则会强化大分子角蛋白的降解, 因此温度也必须予以严格控制。

2.5 角蛋白的分离纯化

2.5.1 角蛋白水解液中和 水解完毕即刻分离出水解液, 在 pH 计监控下, 缓慢滴加冰醋酸并不断搅动水解液使 pH 降至 6.8~7.0。

2.5.2 透析 采用透析法除去水解液中小分子物质。

2.5.3 吸附脱水 用高分子聚合物聚乙二醇吸收透析袋内的大部分水分。

2.5.4 真空干燥 产品在 50℃ 的真空干燥箱中干燥 3h, 即得角蛋白产品。

由于透析法耗时较长, 工业化大生产时, 可以选用离子交换层析法、超滤法等或几种方法结合使用。

参考文献:

- [1] 同其根, 等. 蛋壳的壳膜分离及综合利用[J]. 食品工业科技, 1991, 10.
- [2] 陈宏. 成都科技大学硕士论文, 1994.
- [3] 李志强. 生皮蛋白质化学基础[M]. 成都科大皮革工程系, 1988.
- [4] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996. 81.
- [5] TP Sastry. Leather science, 1987, 34(1): 1.
- [6] PK Sehgal. Leather science, 1986, 33(12): 333.