

从金龟子中提取壳聚糖的研究^{*}

王 敦, 胡景江, 刘铭汤

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以分布广泛、壳聚糖含量高的白星花金龟(*Potosia (L. iocola) brevitarsis* Lewis)为材料, 以单因素试验方法进行了获得较高粘度壳聚糖提取工艺的试验研究。提出了壳聚糖的提取工艺: 脱矿物质。用 0.30 mol/L HCl 预先加热(70~80℃)30 min, 然后室温(20℃)条件下浸泡12~24 h。脱蛋白质、脂类。用 1.25~3.75 mol/L NaOH 在 90~100℃下处理4~6 h。脱乙酰基。用 10~11.25 mol/L NaOH 在 130℃下处理3 h。

[关键词] 金龟子; 壳聚糖; 提取工艺

[中图分类号] Q969.516.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0127-04

甲壳素(Chitin)是一种可再生的丰富的天然资源, 在自然界中的产量仅次于纤维素, 也是20世纪未被充分利用的天然资源之一。壳聚糖(Chitosan)是甲壳素的脱乙酰基产物, 具有许多特殊的生物活性。近年来甲壳素及壳聚糖的应用研究已成为热门课题, 应用范围也从纺织、造纸扩展到了食品、环保、医药、农业、林业、轻工业、生物工程等领域^[1~4]。目前, 甲壳素、壳聚糖的生产原料主要来自于虾蟹壳, 但虾蟹壳中甲壳素含量少、灰分含量高, 提取成本高^[2~4]; 而对世界上生物量最大的优势动物类群及富含甲壳素的生物类群^[5]——昆虫的甲壳素及壳聚糖资源开发, 目前仅仅局限于蝇蛆等个别虫种, 且缺乏系统的提取工艺。为此, 本研究以分布广泛、壳聚糖含量高的白星花金龟(*Potosia (L. iocola) brevitarsis* Lewis)为材料, 进行了壳聚糖提取工艺的试验研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

白星花金龟采集于陕西杨陵、武功、周至3县(区)。

样品预处理: 洗净→捣碎→筛洗→烘干(60℃)→试样。

1.2 方 法

1.2.1 提取方法 用一定浓度的NaOH溶液加热来脱除试样的蛋白质与脂类, 用稀盐酸浸泡脱除其矿物质, 再经过脱色处理, 即可获得甲壳素。甲壳素

在高温下与浓碱反应脱去乙酰基, 成为能溶解于稀酸的壳聚糖^[4, 6~8]。

脱色方法: 质量分数3% KMnO₄ 浸泡30 min→洗净→质量分数2%草酸70℃浸泡5 min→洗净。

1.2.2 反应条件分析 采用单因素试验, 分析不同反应条件对壳聚糖粘度的影响。

(1) 脱矿物质反应中, 不同HCl浓度、处理温度、处理时间对壳聚糖粘度的影响。HCl浓度分别设为0.30, 0.80, 1.90, 2.50, 3.00, 3.50 mol/L; 处理温度分别设为20, 50, 60, 70, 80, 90℃; 处理时间分别设为12, 24, 36, 48, 72 h。

(2) 脱蛋白质、脂类反应中, 不同NaOH浓度、处理温度、处理时间对壳聚糖粘度的影响。NaOH浓度分别设为<1.25, 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25 mol/L; 处理温度分别设为70, 80, 90, 100, 110℃; 处理时间分别设为<3, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h。

(3) 脱乙酰基反应中, 不同NaOH浓度、处理温度、处理时间对壳聚糖粘度的影响。NaOH浓度分别设为≤8.75, 10.00, 11.25, 12.50, 13.75 mol/L; 处理温度分别设为<110, 110, 120, 130, 140℃, 处理时间分别设为<1, 1~2, 3, 4, 5 h。

1.2.3 产品的质量分析 (1) 定性分析方法。采用红外光谱对比法分析壳聚糖的前体甲壳素。标准样品为分析纯甲壳素(原料: 虾壳, 美国SIGMA公司生产); 仪器为EQUINOX 55型红外光谱仪(美国); 测定条件为将甲壳素样品烘干, KBr压片; 测定

* [收稿日期] 2002-09-06

[作者简介] 王 敦(1973-), 男, 青海西宁人, 讲师, 在读博士, 主要从事森林昆虫学研究。

波数 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。

(2) 壳聚糖粘度分析方法。提取甲壳素的工艺及其纯度问题已经在前期进行了研究^[8]。评价提取工艺好坏的关键是产品的粘度。壳聚糖(可溶)粘度高,说明甲壳素(壳聚糖)分子链降解反应少、质量好,则提取工艺也较优。本研究采用 NDJ-1 型旋转式粘度计(上海天平仪器厂),测定以质量分数 1% HAc 为溶剂的质量分数 1% 的壳聚糖溶液。粘度单位为厘

泊(c p)。

2 结果与分析

2.1 定性分析结果

甲壳素样品与标准样品的红外光谱图见图 1,从图 1 的谱带特征可以看出,金龟子中提出的甲壳素与标样化学构成一致。

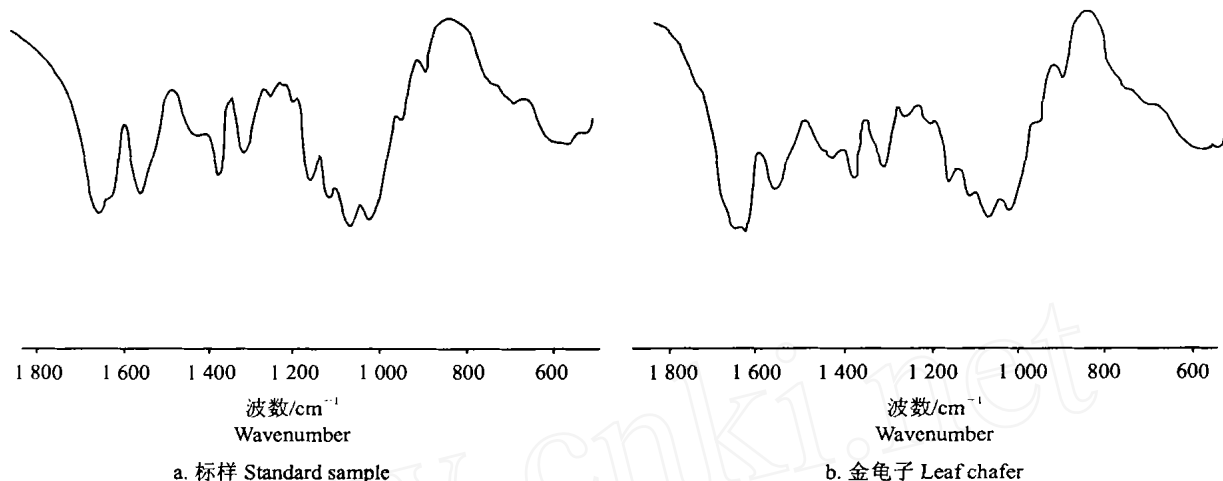


图 1 2 种样品的红外光谱

Fig 1 IR spectra of two samples

2.2 脱矿物质反应条件对壳聚糖粘度的影响

2.2.1 酸浓度对壳聚糖粘度的影响 由表 1 可见,在 20℃,酸处理 24 h 条件下,随着 HCl 浓度增加,壳聚糖的粘度下降。这是由于随着酸浓度的增大,甲壳素长分子链发生了酸降解反应,从而导致粘度降低。用 0.30 mol/L HCl 处理,所得壳聚糖粘度较大。

表 1 酸浓度对壳聚糖粘度的影响

Table 1 The effect of acid solution concentration on consistency of chitosan

HCl 浓度/ (mol · L ⁻¹) Concentration of HCl	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	HCl 浓度/ (mol · L ⁻¹) Concentration of HCl	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
0.30	216	2.50	197
0.80	213	3.00	159
1.90	211	3.50	136

2.2.2 酸处理时间对壳聚糖粘度的影响 由表 2 可见,在 20℃,HCl 浓度为 0.80 mol/L 条件下,随着处理时间的增加,粘度下降。这是由于随着酸处理时间的加长,甲壳素长分子链逐渐发生了酸降解反应,导致粘度逐渐下降。在酸处理 12~24 h 时粘度较大。

表 2 酸处理时间对壳聚糖粘度的影响

Table 2 The effect of acid treatment duration on consistency of chitosan

时间/h Duration of reaction	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	时间/h Duration of reaction	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
12	216	48	189
24	213	72	176
36	200		

2.2.3 酸处理温度对壳聚糖粘度的影响 将昆虫样品与 0.80 mol/L HCl 溶液混匀后在不同温度下加热 30 min,然后停止加热,并放置 24 h。由表 3 可以看出,随着温度的升高,粘度增加,当温度达到 80℃后,又随温度升高而下降。这是由于在酸溶液温度升高后,矿物成分与酸反应程度增加,甲壳素长链分子与矿物质的团状螯合结构随温度升高而逐步被打开,矿物质与甲壳素分子链团状螯合结构减少,从而导致随后制备壳聚糖的脱乙酰基反应进行得较为充分,得到的可溶性甲壳素多,粘度也就随之增大。在粘度达到最大值后温度继续升高,不仅甲壳素长链分子与矿物质的团状螯合结构被打开,同时甲壳素长链分子也发生了酸降解,故又导致粘度降低。在制

备甲壳素的试验研究中还发现, 酸溶液温度在 70~80 时, 由于昆虫体表蜡质被破坏, 体壁内矿物质成分易于溶出, 残留的灰分少, 因此仍以此温度为最佳选择。

表 3 酸处理温度对壳聚糖粘度的影响

Table 3 The effect of acid solution temperature on consistency of chitosan			
温度/ Temperature of HCl solution	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	温度/ Temperature of HCl solution	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
20	213	70	228
50	217	80	225
60	221	90	207

2 3 脱蛋白质、脂类反应条件对壳聚糖粘度的影响
由于脂类物质与强碱发生皂化反应而易于洗脱除去, 故只分析了蛋白质的影响因素。

2 3 1 碱浓度对壳聚糖粘度的影响 由表 4 可见, 在 100 , 碱处理 5 h 条件下, NaOH 浓度小于 1.25 mol/L 时, 在后续反应中得不到可溶的壳聚糖, 这是由于脱除蛋白质程度低, 甲壳素分子与蛋白质分子吸附结合的胶团状结构大量存在, 从而导致在随后的脱乙酰基反应中不能正常脱去乙酰基得到壳聚糖。随着 NaOH 浓度增大, 壳聚糖粘度呈下降趋势, 这是由于高浓度的碱液在脱去蛋白质的同时, 使甲壳素分子发生了断链降解反应。脱除蛋白质反应时, NaOH 为 1.25~ 3.75 mol/L 时, 获得的壳聚糖粘度较大。

表 4 不同碱浓度对壳聚糖粘度的影响

Table 4 The effect of alkali solution concentration on consistency of chitosan			
NaOH 浓度/ (mol · L ⁻¹) Concentra- tion of NaOH	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	NaOH 浓度/ (mol · L ⁻¹) Concentra- tion of NaOH	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
< 1.25	/	3.75	201
1.25	216	5.00	188
2.50	213	6.25	162

2 3 2 碱处理温度对壳聚糖粘度的影响 由表 5 可见, 在碱液浓度为 2.50 mol/L, 反应时间 5 h 和 80~ 100 时, 随温度升高, 壳聚糖粘度下降。这是由于温度升高, 在碱液作用下壳聚糖分子发生降解反应的程度加重造成的。而在 80 时, 尽管壳聚糖粘度较大, 但壳聚糖溶液中有少量不溶物, 说明在 80 条件下脱蛋白不充分, 导致随后的脱乙酰基反应不很充分。80 以下脱除蛋白质极不充分, 导致无法进一步脱除乙酰基而得到壳聚糖。而温度达到

110 又因碱液爆沸溢流无法进行脱蛋白反应, 只有在 90~ 100 时能正常反应制得壳聚糖。

表 5 不同碱处理温度对壳聚糖粘度的影响

Table 5 The effect of alkali treatment temperature on consistency of chitosan			
温度/ Temperature	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chito san	温度/ Temperature	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chito san
70	/	100	213
80	263 ↓	110	B
90	225		

注: “/”表示未得到可溶的壳聚糖; “↓”表示壳聚糖溶液中有少量不溶物, 即脱乙酰基反应进行不完全。“B”表示常压下碱液爆沸溢流, 无法进行反应。下表同。

Note: “/” represents that the treatment is not available for chitosan, and “↓” represents that the solvency is not perfect because the deacetylation wasn't processed completely under such condition of treatment The letter “B” represents that boiling solution was out of control under normal pressure The meaning of the signs in the tables below is the same

2 3 3 碱处理时间对壳聚糖粘度的影响 由表 6 可知, 在 NaOH 浓度为 2.50 mol/L, 反应温度 100 条件下, 随碱处理时间延长, 壳聚糖粘度随之下降。3 h 时, 虽然粘度较大, 但壳聚糖中有少量不溶物, 这是由于脱乙酰基反应不很充分造成的。在 4~ 6 h 时反应正常进行, 且粘度较大。

表 6 不同碱处理时间对壳聚糖粘度的影响

Table 6 The effect of duration of alkali treatment on consistency of chitosan			
时间/h Duration of alkali treatment	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chito san	时间/h Duration of alkali treatment	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chito san
< 3	/	6	208
3	227 ↓	7	117
4	225	8	147
5	213	9	129

2 4 脱乙酰基反应条件对壳聚糖粘度的影响
2 4 1 碱浓度对壳聚糖粘度的影响 由表 7 可见, 在 130 温度下反应进行 3 h, 当 NaOH 溶液浓度小于 8.75 mol/L 时, 得不到可溶性的壳聚糖, 这是由于反应底物浓度过低, 发生脱乙酰基反应少, 无法正常进行脱乙酰基反应, 造成脱乙酰基不充分而导致。而随着碱液浓度的升高, 壳聚糖粘度随之下降, 这是由于碱液浓度过高时导致壳聚糖分子链发生断裂、降解, 致使壳聚糖粘度下降。在 10~ 11.25 mol/L NaOH 溶液条件下, 制得的壳聚糖粘度较大。

2 4 2 温度对壳聚糖粘度的影响 由表 8 可看出, 反应时间 3 h, 碱液浓度为 11.25 mol/L 时, 温度过低, 脱除乙酰基不充分, 得不到可溶性的壳聚糖, 过高又无法在常压下进行反应。仅在 130 条件下反

应正常进行。

表 7 脱乙酰基反应中不同碱浓度对壳聚糖粘度的影响

Table 7 The effect of alkali solution concentration on consistency of chitosan in deacetylation			
碱浓度/ (mol·L ⁻¹) Concentration of alkali solution	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	碱浓度/ (mol·L ⁻¹) Concentration of alkali solution	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
≤8 75	/	12 50	181
10 00	210	13 75	150
11 25	213		

表 8 不同脱乙酰基温度对壳聚糖粘度的影响

Table 8 The effect of treatment temperature on consistency of chitosan in deacetylation			
温度/ Temperature	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	温度/ Temperature	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
< 110	/	130	213
110	/+ ↓	140	B
120	↓		

注：“/ + ↓”表示只能得到小部分溶解的壳聚糖，即脱乙酰基反应发生很不完全。下表同。

Note: “/ + ↓” represents that the deacetylation was almost not processed under such condition of treatment. The meaning of the signs in the tables below is the same.

2.4.3 反应时间对壳聚糖粘度的影响 由表 9 可知，在反应温度 130℃，碱液浓度 11.25 mol/L 条件

下，反应时间少于 1 h 则不能脱除乙酰基得到壳聚糖。在 1~2 h 时，脱除不完全，而时间过长又易发生壳聚糖分子链的降解反应，使粘度下降。在反应时间为 3 h 时，脱除乙酰基较充分，粘度也较大。

表 9 脱乙酰基不同反应时间对壳聚糖粘度的影响

Table 9 The effect of duration of deacetylation on consistency of chitosan			
反应时间/h Duration of treatment	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan	反应时间/h Duration of treatment	壳聚糖粘度/ c p Consistency of chitosan
< 1	/	4	165
1~ 2	↓	5	149
3	213		

3 结 论

本研究结果表明，通过脱除蛋白质、脂类、矿物质、色素可以得到与标准样品化学结构一致的甲壳素产品，再通过脱乙酰基反应即可得到壳聚糖。从试验结果得出，获取粘度较高的壳聚糖的适宜提取工艺为：脱矿物质。用 0.30 mol/L HCl 溶液，在 70~80℃ 条件下预先加热 30 min，然后在室温（20℃）条件下浸泡 12~24 h。脱蛋白质、脂类。用 1.25~3.75 mol/L NaOH 溶液，在 90~100℃ 条件下处理 4~6 h。脱乙酰基。用 10~11.25 mol/L NaOH 溶液，在 130℃ 下处理 3 h。

[参考文献]

[1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996: 1-460.
[2] 严瑞煌. 水溶性高分子[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 519-565.
[3] 朱定和. 甲壳素/壳聚糖及其衍生物的应用[J]. 韶关大学学报(自然科学版), 1998, 19(3): 147-149.
[4] Skjak-Braek G, Anthosen T, Sandford P. Chitin and Chitosan[M]. London: Elsevier, 1986: 1-217.
[5] 杨冠煌. 中国昆虫资源利用和产业化[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 1-4.
[6] 陈长琨. 昆虫生理生化实验[M]. 北京: 农业出版社, 1991: 4-6.
[7] 钱合生. 甲壳素脱乙酰化反应[J]. 中国纺织大学学报, 1998, 24(2): 100-103.
[8] 王 敦, 胡景江, 刘铭汤. 从油葫芦中提取甲壳素的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(增刊): 63-65.

The research of abstraction chitosan from leaf chafer

WANG Dun, HU Jing-jiang, LIU Ming-tang

(College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *U sing Potocia (L iocoea) brevitarsis* Lewis, the widely distributed species which contains rich chitin in its body, as sample, this study investigated the abstraction process for chitosan with higher concentration. By the experimentation of single factor method on the technique of abstraction chitosan, the research showed the appropriate conditions of reaction of the technique: Removing mineral matter, put the sample in the solution of 0.30 mol/L HCl, heat for 30 min between 70- 80℃, then lay aside for 12- 24 h under natural temperature (20℃). Removing protein and grease, processed the sample with the solution of 1.25- 3.75 mol/L NaOH, 90- 100℃, keep for 4- 6 h. Deacetylation, process the chitin with the solution of 10- 11.25 mol/L NaOH, keep for 3 h under 130℃.

Key words: leaf chafer; chitosan; extraction technique