

陈冬年,刘展,武韶华,等. 超声波辅助法提取小龙虾甲壳素[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):236-238.

超声波辅助法提取小龙虾甲壳素

陈冬年,刘展,武韶华,史燕娇,张勤

(南京理工大学泰州科技学院化工系,江苏泰州 225300)

摘要:在超声波辅助下,以乙二胺四乙酸二钠为脱钙剂,NaOH 为脱蛋白剂,研究从小龙虾壳中提取甲壳素的工艺条件。结果表明,NaOH 的加入,不利于 CaCO_3 的溶解;超声波能显著提高脱钙、脱蛋白速率;室温下最佳脱钙条件为 pH 值 4~5,乙二胺四乙酸二钠浓度 0.3 mol/L,反应时间 80 min;最佳脱蛋白条件为反应温度 55 ℃,NaOH 浓度 1.5 mol/L,反应时间 100 min。

关键词:超声波,脱钙,脱蛋白,甲壳素

中图分类号: O657.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0236-03

甲壳素是由 *N*-乙酰-2-氨基-2-脱氧-*D*-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接形成的多糖,在食品工业、功能材料、医药、农业和轻纺业中有广泛应用,已成为水产品废弃物加工利用的研究热点^[1-5]。目前,工业上主要由虾蟹等动物的甲壳中提取甲壳素,主要过程为在机械搅拌下用盐酸对虾蟹壳脱钙,用较高浓度的碱脱蛋白质^[6]。

盐酸脱钙原理为虾壳中的不溶于水的碳酸钙与盐酸反应,转化为可溶的钙而脱去,在脱钙的同时,盐酸也会破坏甲壳素分子链结构。文献[3-5]报道 EDTA(乙二胺四乙酸或其钠盐)可以在不破坏分子链的情况下脱钙,然而,关于采用何种 pH 值条件才能取得最佳脱钙效果的问题,各文献说法差异较大。

碱脱蛋白的原理为虾蟹壳中非水溶性的蛋白质或与甲壳素共价结合的蛋白质在碱性条件下发生水解转化为可溶性物质而脱去。因为虾蟹壳中蛋白质与其他物质紧密复合在一起,难以分离,所以脱蛋白过程常用碱煮法,耗时较长、能耗较高,脱蛋白速率有待提高。文献[7]报道超声波能在溶液中形成特殊的空化效应,适合于非均相反应。脱蛋白为非均相水解过程,超声波应能提高该过程速率。然而,仅文献[8]报道将超声波应用于虾蟹壳脱钙脱蛋白提取甲壳素,文献[9-10]报道超声波应用于甲壳素脱乙酰制备壳聚糖。

本研究以乙二胺四乙酸二钠为脱钙试剂,NaOH 溶液为脱蛋白试剂,探讨超声波辅助下提取甲壳素的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

虾壳:市售小龙虾(克氏原螯虾)经去肉、清洗、自然晾干、粉碎、烘干形成干虾壳粉;破碎的熟鸡蛋白为自制;乙二胺四乙酸二钠、盐酸、碳酸钙、氢氧化钠、无水乙醇、磷酸等为分析纯;考马斯亮蓝 G250 为国药集团化学试剂有限公司产品;钙-羧酸指示剂为国药集团化学试剂有限公司产品;K-B 指示剂为国家水泥质量监督检验中心提供;蒸馏水为自制;广泛 pH 试纸为上海三爱思试剂有限公司产品。超声波清洗器 KH-400KDV(超声波功率 400 W,频率 40 kHz)为昆山禾创超声仪器有限公司产品;722 可见分光光度计为上海精密科学仪器有限公司产品;电动搅拌器为常州国华电器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 碳酸钙溶解试验 取 1 g 碳酸钙粉末,分别加入 0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液或 0.25 mol/L 的盐酸,室温下,置于超声波清洗器中(搅拌或静置)反应。观察溶解现象,溶液中没有固体沉淀、完全停止冒泡且澄清透明,则视碳酸钙已全部溶解。

1.2.2 熟鸡蛋白溶解试验 取 0.5 g 破碎的熟鸡蛋白,分别加入不同浓度的 NaOH 溶液,室温下,置于超声波清洗器中(搅拌或静置)反应。观察溶解现象,溶液中没有固体沉淀且澄清透明,则视熟鸡蛋白已全部溶解。

1.2.3 虾壳中提取甲壳素 取一定量的干虾壳粉,加入 0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液,超声波振荡反应或搅拌反应。反应中或反应后取一定量的上清液,稀释,用滴定分析法测定提取液中钙的浓度,并依测定结果计算脱钙率。脱

版,2011(3):75-77.

[8] 田海娟. 绿豆淀粉开发及其应用前景[J]. 吉林工商学院学报, 2011,27(5):84-86.

[9] 杨静,郑为完,聂斌英. 绿豆饮品开发利用的研究概况[J]. 江西食品工业,2005(1):37-39.

[10] 张延杰,田金河,曾庆孝,等. 绿豆壳中提取黄酮工艺的研究[J]. 粮油食品科技,2005,13(5):39-40.

收稿日期:2013-05-20

作者简介:陈冬年(1978—),男,江苏泰兴人,硕士,讲师,研究方向为天然高分子材料制备与改性。Tel:(0523)86150058;E-mail: startonychen@sina.com.

[4] 尹凤祥,李健波,肖焕玉,等. 吉林省绿豆生产状况与发展策略[J]. 吉林农业科学,2002,27(5):52-54.

[5] 李发虎,蔡永敏,曹睿亮. 绿豆及其药用和食疗作用[J]. 今日科苑,2007(6):44.

[6] 庄艳,陈剑. 绿豆的营养价值及综合利用[J]. 杂粮作物, 2009,29(6):418-419.

[7] 李萍. 杂粮深加工科技支持对策探讨[J]. 农产品加工·创新

钙完成后,过滤,收集全部滤渣,并用蒸馏水洗涤至中性,干燥。滤渣中加入 NaOH 溶液,超声波振荡反应或搅拌反应。反应中或反应后取一定量的上清液,稀释,用考马斯亮蓝法测定稀释液中蛋白质的浓度,并依测定的蛋白质浓度计算蛋白质脱出量。

1.2.4 乙二胺四乙酸二钠脱钙率计算 取一定质量的干虾壳粉,加入过量的 0.25 mol/L 盐酸,室温搅拌反应 24 h 保证脱钙完全,按文献[11]用络合滴定法测定盐酸脱钙液中钙的浓度,依此计算虾壳中的钙含量。取适量稀释过的乙二胺四乙酸二钠脱钙溶液,按文献[12]用返滴定分析法测定其中钙的浓度,根据稀释倍数计算乙二胺四乙酸二钠脱出钙的质量。按计算公式计算脱钙率:

脱钙率 = $\frac{\text{单位质量虾壳脱出钙的质量}}{\text{单位质量虾壳中含有钙的质量}} \times 100\%$ 。

1.2.5 蛋白质脱出量计算 取适量稀释过的脱蛋白溶液,按文献[13]用考马斯亮蓝法测定此稀释液中蛋白质的浓度,根据稀释倍数计算脱出的蛋白质的质量。按计算公式计算蛋白质脱出量:

蛋白质脱出量 = $\frac{\text{脱出蛋白质的质量}}{\text{脱钙脱蛋白前虾壳的质量}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 乙二胺四乙酸二钠脱钙效果

2.1.1 乙二胺四乙酸二钠溶液 pH 值对碳酸钙溶解的影响 乙二胺四乙酸(EDTA)和乙二胺四乙酸二钠(乙二胺四乙酸二钠)都具有较强的螯合能力,不同文献报道用 EDTA 对虾壳脱钙时介质最佳 pH 值不一致,何兰珍等^[4]报道最佳 pH 值为 4;黄俊炯等^[5]报道最佳 pH 值为 13,并且能在一步中同时实现脱钙、脱蛋白。由表 1 可知,乙二胺四乙酸二钠水溶液能用于脱钙。静置时溶解较慢,搅拌使溶解加快,超声波能显著加快碳酸钙的溶解速度,可能是由于超声波具有特殊的空化效应、热效应和机械效应所致。向乙二胺四乙酸二钠水溶液中加入 NaOH 会使溶钙速率和溶钙能力显著下降。这说明加入 NaOH 会使溶钙能力下降,不应在强碱性介质中用乙二胺四乙酸二钠对虾壳脱钙,而且乙二胺四乙酸二钠脱钙和碱脱蛋白应分步进行。

表 1 不同 pH 值乙二胺四乙酸二钠对碳酸钙的溶解效果

处理	溶解条件				反应前 溶液 pH 值	前期现象	全部溶解时间 (min)
	CaCO ₃ (g)	乙二胺四乙酸二钠(mL) ^a	NaOH(g) ^b	反应方式			
1	1.00	40	0	静置	4~5	少量气泡	2 160
2	1.00	40	0	搅拌	4~5	较多气泡	180
3	1.00	40	0	超声	4~5	大量气泡	50
4	1.00	40	1	超声	9~10	无气泡	360
5	1.00	40	2.8	超声	13~14	无气泡	- ^c
6	1.00	盐酸 ^d	0	静置	未测	泡沫溢出	1

注:a.饱和的乙二胺四乙酸二钠水溶液,浓度为 0.3 mol/L;b.固体氢氧化钠;c.长时间都不能完全溶解;d.用 40 mL 0.25 mol/L 盐酸代替 0.3 mol/L 乙二胺四乙酸二钠水溶液。

2.1.2 反应方式对脱钙效果的影响 室温下,用 0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液对干虾壳粉进行脱钙,固液比为 1 g : 16 mL,反应时间为 50 min,分别采用搅拌和超声波辅助两种反应方式。由表 2 可知,在相同条件下,超声波振荡比机械搅拌更能促进脱钙。

表 2 反应方式对脱钙的影响

反应方式	脱钙率(%)
超声波振荡	83.5
机械搅拌	42.8

2.1.3 反应时间对脱钙的影响 室温下在超声波辅助下,用 0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液对干虾壳粉进行脱钙,固液比为 1 g : 16 mL。由图 1 可知,脱钙时间越长,脱钙效果越好,80 min 时脱钙率即达 96.8%,其后脱钙率有缓慢增长,到 120 min 时脱钙率达 98.4%。若对甲壳素脱钙率要求不高,则以 80 min 为最佳脱钙时间,以提高脱钙效率。Aline 等报道 0.25 mol/L 的盐酸 15 min 即可脱钙完全^[14]。这说明,即使有超声波辅助,0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠水溶液的脱钙速率仍不及 0.25 mol/L 的盐酸。因此,相比乙二胺四乙酸二钠,盐酸是更高效的脱钙剂;若对提取出的甲壳素分子量没有要求,应选用盐酸作脱钙剂,因为脱钙时间可以较短;若要求提取出高分子量的甲壳素,则可选用乙二胺四乙酸二钠为

脱钙剂,但脱钙时间应比较长。

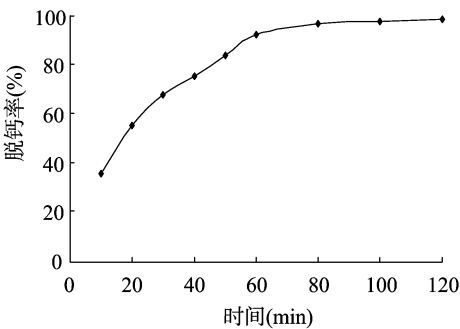


图 1 反应时间对乙二胺四乙酸二钠脱钙的影响

2.2 脱蛋白

2.2.1 NaOH 溶液对脱蛋白效果的影响 以高脱钙率的虾壳渣为原料,用不同浓度的 NaOH 溶液进行脱蛋白试验,固液比为 1 g : 16 mL,超声时间为 60 min,反应温度为 65 ℃。由图 2 可知,NaOH 浓度较低时,单位时间内脱出的蛋白质较少,这是由于在此条件下蛋白质水解反应较慢。随 NaOH 浓度增加,蛋白质水解反应加快,单位时间内脱出的蛋白质增多,NaOH 浓度在 1.5 mol/L 时蛋白质脱出量最高。但当 NaOH 浓度超过 1.5 mol/L 时,测得的蛋白质脱出量反而有所降低。

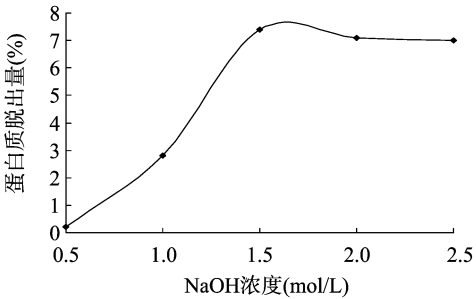


图2 NaOH浓度对蛋白质脱出量的影响

2.2.2 反应温度对脱蛋白效果的影响 以高脱钙率的虾壳渣为原料,在不同温度下进行脱蛋白试验,固液比为 1 g : 16 mL,超声时间为 60 min,NaOH 溶液浓度为 1.5 mol/L。由图 3 可知,在 35 ~ 75 ℃ 范围内,55 ℃ 时蛋白质脱出量最多。温度低于 55 ℃ 时,因为水解反应较慢,所以单位时间内蛋白质脱出量较少。温度高于 55 ℃,可能因为蛋白质变性,所以水解反应反而较慢,单位时间内蛋白质脱出量也会较少。因此,55 ℃ 为最佳脱蛋白反应温度。

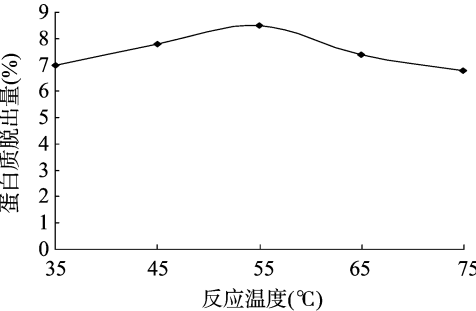


图3 反应温度对蛋白质脱出量的影响

2.2.3 反应时间对脱蛋白的影响 以高脱钙率的虾壳渣为原料,在固液比为 1 g : 16 mL,NaOH 溶液浓度为 1.5 mol/L,反应温度为 55 ℃ 条件下,进行脱蛋白试验。从图 4 可以看出,蛋白质脱出量随反应时间的延长而增加,当反应时间达到 100 min 后蛋白质脱出量几乎不发生变化,因此综合考虑脱蛋白效果和能耗,以 100 min 作为最佳反应时间。

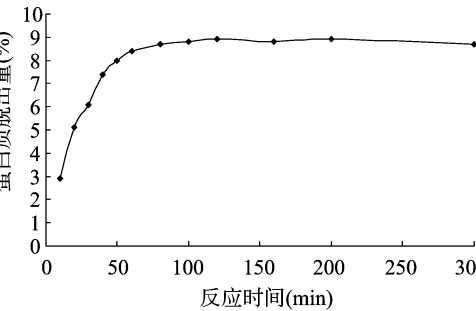


图4 反应时间对蛋白质脱出量的影响

2.2.4 操作方式对脱蛋白的影响 以高脱钙率的虾壳渣为原料,在固液比为 1 g : 16 mL,NaOH 溶液浓度为 1.5 mol/L,反应温度为 55 ℃,反应时间为 100 min 条件下,分别用超声波振荡法和机械搅拌法进行脱蛋白试验。表 3 数据说明,相比于机械搅拌,超声波振荡能显著提高虾壳渣中蛋白质的脱出量。

表 3 反应方式对脱蛋白的影响

反应方式	蛋白质脱出量(%)
机械搅拌	2.7
超声波振荡	8.8

3 结论

超声波辅助法相对于传统的机械搅拌法能显著提高脱钙和脱蛋白的速率。在超声波辅助下,从虾壳中提取甲壳素的较佳工艺条件为:乙二胺四乙酸二钠为 0.3 mol/L,脱钙时间为 80 min,脱钙温度为室温;NaOH 溶液浓度为 1.5 mol/L,脱蛋白温度为 55 ℃,脱蛋白时间为 100 min。较佳工艺条件下提取出的粗甲壳素呈浅粉白色,若需获得白色甲壳素,尚需进行脱色处理。

参考文献:

[1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:化学工业出版社,2003:1-16.
[2] 侯佰立,吉宏武,王 燕,等. 凡纳滨对虾虾头制备甲壳素工艺的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(10):273-276.
[3] 刘 毅,杨 丹,何兰珍. EDTA 脱钙法制备甲壳素[J]. 化学研究与应用,2004,16(2):278-279.
[4] 何兰珍,杨 丹,刘 毅,等. 制备甲壳素过程中 EDTA 脱钙法的研究[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(4):49-52.
[5] 黄俊嫻,杨建男. EDTA 处理虾壳制备甲壳素的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(3):296-297,311.
[6] 顾正桂,林 军,顾美娟. 甲壳素系列产品生产过程的优化及装置的改进[J]. 现代化工,2009,29(1):62-65,67.
[7] 李廷盛,尹其光. 超声化学[M]. 北京:科学出版社,1995:32-93.
[8] 彭元怀,黄 川,赵泽洁. 超声波辅助提取虾壳甲壳素的工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(9):304-308.
[9] 陈 忻,袁毅桦,刘 佳,等. 超声波法制备高黏度的壳聚糖[J]. 水产科学,2007,26(6):352-354.
[10] 莫祺红,卢 洁,黄佩芳,等. 超声波预处理脱乙酰化制备壳聚糖的研究[J]. 食品科技,2009,34(8):224-227.
[11] 程建国. 无机及分析化学实验[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2006:53-55.
[12] 黄俊嫻,杨建男. 返滴定法监测 EDTA 处理虾壳制备甲壳素过程中的脱钙率[J]. 化学分析计量,2007,16(6):49-51.
[13] 史 锋. 生物化学实验[M]. 杭州:浙江大学出版社,2002:92-93.