

南美白对虾壳聚糖制备工艺的优化及其表征

姜秋焕, 叶盛权, 王宇

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

摘要:利用南美白对虾壳制备壳聚糖, 并对其制备工艺进行了优化。结果表明: 制备壳聚糖的最佳条件为温度 90 °C、时间 150 min、碱浓度 60%, 其脱乙酰度最高为 87.04%, 取得了较好的结果。通过紫外-可见分光光度计、热重/差热分析仪、扫描电镜对产物结构进行表征。壳聚糖表面干燥, 致密, 结晶度好, 热稳定性高。本试验为有效利用南美白对虾壳制备壳聚糖提供了依据。

关键词: 南美白对虾; 甲壳素; 壳聚糖; 制备; 表征

文章编号: 1673-9078(2013)2-306-310

Optimization of the Preparation of Chitosan from

Wastes of *Penaeus vannamei*

JIANG Qiu-huan, YE Sheng-quan, WANG Yu

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Chitosan was prepared from the shell of *Penaeus vannamei*, and the preparation process was optimized. It illustrated that optimum conditions of prepared of chitosan were temperature 90 °C, time 150 min and alkali concentration 60%. Under these conditions, the deacetylation degree of chitosan was 87.04%. The product structure was characterized by the ultraviolet-obvious spectrophotometer, the TG/DTA analyzer and the scanning electron microscope. The surface of chitosan was dry and thickening. The degree of crystallinity was good and the thermal stability was high. It provided theoretical basis for the effective use of *penaeus vannamei* shell.

Keywords: *Penaeus vannamei*; chitin; chitosan; preparation; token

壳聚糖(Chitosan)又名几丁聚糖, 其化学名为聚(1,4)-2-氨基-脱氧-β-D-葡聚糖, 是甲壳素的 N-脱乙酰基产物, 也是甲壳素最重要的衍生物^[1]。甲壳素广泛存在于虾壳、蟹壳等细胞壁中, 是一种天然高分子的多糖化合物, 该产品已在医药、农业、日化、轻纺、环保等领域得到了广泛的应用^[2]。工业化制备壳聚糖大部分都是从蟹壳、日本对虾等^[3-4]中得到, 关于从南美白对虾中制备壳聚糖的研究甚少, 其中陈利海^[5]研究南美白对虾中甲壳素提取, 柠檬酸脱钙工艺的优化。

南美白对虾, 学名凡纳对虾, 是世界养殖虾类产量最高的三大种类之一, 也是“海虾淡养”的优良品种, 是很有发展潜力的养殖虾类^[6]。近年来, 南美白对虾

在我国的养殖取得了一定的进展, 而且已经成为水产养殖业的热点。但是, 我国的南美白对虾, 绝大部分加工成去头冻虾或冷冻虾仁出口, 产生了大量的虾类废弃物, 因此这些废弃物的综合利用显得尤为重要^[7]。

本研究采用南美白对虾加工后产生的虾壳为原料, 探讨了从南美白对虾中提取甲壳素并制备壳聚糖的生产工艺, 并处理温度 80 °C 低于从蟹壳中制备壳聚糖的温度 110 °C^[8], 取得了较好效果, 为南美白对虾壳的综合利用提供了依据, 并为壳聚糖的制备开辟了新的原料来源。另外, 对制备出来的壳聚糖进行了表征, 以期壳聚糖的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南美白对虾 湛江市国联水产开发有限公司。

盐酸, 广州化学试剂厂; 氢氧化钠 天津市百世化工有限公司; 高锰酸钾, 广州化学试剂厂; 亚硫酸氢钠, 广州化学试剂厂。

收稿日期: 2012-10-15

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2008B090500002), 广东海洋大学引进人才科研启动费(1010295)

作者简介: 姜秋焕(1987-)女, 在读研究生。从事水产品深加工方面的研究
通讯作者: 叶盛权(1966-)男, 博士, 教授, 主要从事水产食品安全与质量控制研究

1.2 仪器及设备

电子分析天平, 日本岛津; PHS-25 雷磁酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; HH-8 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; JJ-1 精密增力电动搅拌器, 常州澳华仪器有限公司; Uv2550 紫外分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司; TG/DTA320 型热重分析仪, 日本精工公司; XL30 扫描电镜, 飞利浦电子公司。

1.3 实验方法

1.3.1 甲壳素的提取

1.3.1.1 去矿化处理

将虾壳清洗, 烘干(30 °C), 磨碎, 用 100 目筛子筛分得到大小均匀的颗粒。按照液固比为 40 mL/g 的比例, 将一定量的虾壳浸泡在 0.25 M HCl 中, 室温下保持 2 h, 去矿化处理^[9]。

1.3.1.2 脱蛋白

将得到的固体用蒸馏水洗涤直至中性。按照液固比 20 mL/g 的比例加入 1.0 M NaOH, 在温度 70 °C 反应 24 h。反应后的固体用蒸馏水洗涤至中性。最后用 10 mL/g 的热乙醇洗、煮沸以除去杂质。干燥得到纯化的甲壳素^[10]。

1.3.1.3 脱色

取甲壳素产品, 加入 5 倍量无水乙醇, 加热回流 1 h。过滤, 滤饼用清水漂洗后加入 1% 高锰酸钾溶液(1:2)浸泡 1 h。过滤, 滤饼再用 1% 亚硫酸氢钠溶液(1:2)浸泡 1 h, 得乳白色半透明甲壳素湿品, 晒干, 得灰白色甲壳素干燥品。

1.3.2 壳聚糖的制备方法

取一定量的甲壳素, 按 20 g/L 的比例浸泡于浓溶液中, 保温一定时间进行脱乙酰反应, 其间不时用玻璃棒搅拌反应体系, 以保证反应充分进行反应结束后, 冷却至室温, 过滤, 将滤渣用水洗至中性, 干燥得到壳聚糖^[11]。

1.3.3 壳聚糖制备条件优化

1.3.3.1 处理温度的筛选

在 45% 碱浓度和处理时间 2 h 的条件下, 设定 5 个不同的处理温度(60、70、80、90、100、120、130 °C), 每个处理温度各做 3 个重复, 筛选有利于提高脱乙酰度的适宜处理温度^[12]。

1.3.3.2 处理时间的筛选

在 45% 碱浓度及已经筛选的适宜温度下, 设定 6 个不同的处理时间(30、60、90、120、150、180 min), 每个处理时间各做 3 个重复, 筛选有利于提高壳聚糖脱乙酰度的适宜处理时间。

1.3.3.3 碱浓度的筛选

在已经筛选的适宜温度和处理时间下, 设定 6 个

不同的碱浓度(35、40、45、50、55、60%), 每个碱浓度各做 3 个重复, 有利于提高壳聚糖脱乙酰度的适宜碱浓度。

1.3.3.4 正交试验

根据 1.3.3 单因素实验筛选出的因素水平进行正交试验设计, 对结果进行综合评定寻找最优组合^[13]。选定影响壳聚糖脱乙酰度的三个因素: 温度(A)、时间(B)、碱浓度(C), 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验研究这 3 个因素的相互作用对壳聚糖脱乙酰度的影响, 确定最佳制备工艺。

1.3.4 壳聚糖脱乙酰度的测定

由于电位滴定法的 S 形曲线上等电点的确定较困难, 易造成人为误差, 因而采用线性电位滴定法^[14]。

准确称取 105 °C 干燥恒重的壳聚糖样品 0.25 g 左右于 100 mL 高脚烧杯中, 加入蒸馏水 30.0 mL 及 0.1 mol/L 标准 HCl 溶液 20.0 mL, 在室温下溶解(磁力搅拌, 约 0.5 h)。磁力搅拌下用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定。根据样品量的多少, 加入 2~4 mL 滴定液后才开始测定, 而后每加入 1 mL 测定一次 pH 值, 测定 4 点即可。然后将每个 pH 值所对应的 NaOH 溶液的体积(V)代入以下函数式:

$$f(V) = \frac{V_0 + V}{N_B} \times ([H^+] - [OH^-])$$

注: V_0 -HCl 标准溶液的体积加上稀释用蒸馏水的体积, mL; V -NaOH 标准溶液的体积, mL; N_B -NaOH 标准溶液的浓度, mol/L。

计算出 $f(V)$, 以 $f(V)$ 为纵坐标, V 为横坐标作图, 直线外推与横坐标相交为等电点时所用的 NaOH 溶液的体积(V_e), 按下式计算壳聚糖的脱乙酰度:

$$D.D. = \frac{N_A V_A - N_B V_e}{W} \times 161 \times 100\%$$

注: N_A -HCl 标准溶液的浓度, mol/L; N_B -NaOH 标准溶液的浓度, mol/L; V_A -HCl 标准溶液的体积, mL; V_e -到达等电点时所需 NaOH 标准溶液的体积, mL; 161-壳聚糖中氨基葡萄糖残基的相对分子量; W -样品重量, mg。

1.3.5 表征

用紫外光谱仪、TG/DTA 分析仪、扫描电镜对制备的壳聚糖进行表征^[15]。

2 结果与分析

2.1 处理温度的筛选

温度是影响壳聚糖脱乙酰度的一个重要因素。由图 1 可知, 随着温度的增加, 壳聚糖的脱乙酰度也有所增加, 在 80 °C 时达到最大。由于该反应是亲核取代反应涉及 C-N 键的断裂, 是吸热反应, 提高温度有

利于反应的进行, 得到较高脱乙酰度的壳聚糖。由图可以看出, 当温度达到 80 °C 以上时, 脱乙酰度速度增加缓慢, 几乎保持不变。考虑到节约资源, 因此处理温度 80 °C 为宜。

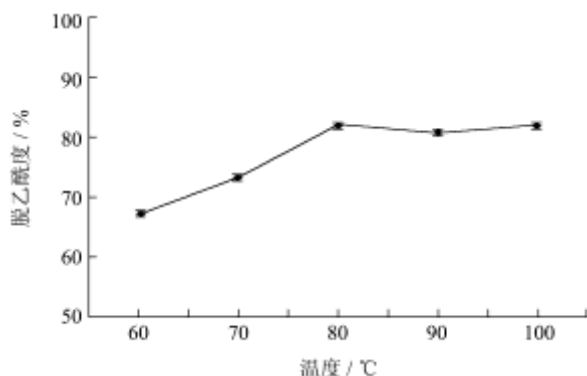


图1 温度对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.1 Effect of temperature on deacetylation degree of chitosan

2.2 处理时间的筛选

时间是影响壳聚糖脱乙酰度的另一个重要因素。图2所示为时间对壳聚糖脱乙酰度的影响趋势。由下图可以看出, 随着时间的增加, 脱乙酰度也快速增加, 但 120 min 以后, 增加缓慢。因为甲壳素脱乙酰基制备壳聚糖这一反应是亲核取代反应, 主要涉及 C-N 键断裂, 需要反应时间。随着反应时间的延长, 当反应达到一定程度时, 酰胺基浓度逐渐降低, 亲核取代程度也相应降低, 脱乙酰度变化较小。故处理时间以 120 min 为宜。

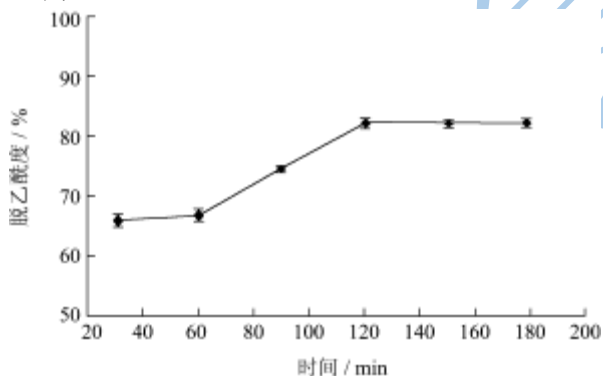


图2 时间对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.2 Effect of time on deacetylation degree of chitosan

2.3 碱浓度的筛选

碱浓度对壳聚糖脱乙酰度的影响如图3所示。由图可知, 当碱浓度较低时, 壳聚糖的脱乙酰度也较低。因为 NaOH 为亲核剂, 当其浓度较低时, NaOH 与乙酰基之间的亲和能力较小, 脱乙酰度较低。但壳聚糖的脱乙酰度随着碱浓度的增加而增加, 当碱浓度达到 55% 之后, 脱乙酰度有所下降。这可能是由于原料与溶液的比例一定时 (20 g/L), 随着碱浓度的增大, 固液比反而下降, 料液混合不均匀, 影响反应结果。因

此 NaOH 浓度为 55% 最佳。

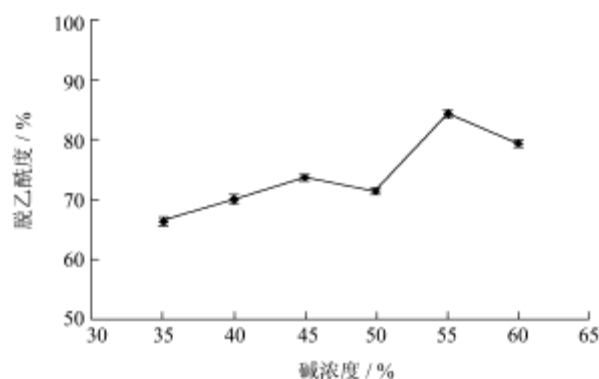


图3 碱浓度对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.3 Effect of alkali concentration on deacetylation degree of chitosan

2.4 正交试验

通过单因素试验, 确定了温度(A)、时间(B)、碱浓度(C)3个因素的最适范围, 每个因素各取3个水平(见表1)。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验研究这3个因素的相互作用对壳聚糖脱乙酰度的影响, 确定最佳制备工艺。正交试验结果见表2。

表1 正交试验水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

| 水平 | A (温度 T/°C) | B (时间 t/min) | C (碱浓度/%) |
|----|-------------|--------------|-----------|
| 1 | 70 | 90 | 50 |
| 2 | 80 | 120 | 55 |
| 3 | 90 | 150 | 60 |

表2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

| 序号 | A | B | C | 脱乙酰度/% |
|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 74.50 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 80.80 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 82.94 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 79.98 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 86.61 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 84.55 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 85.19 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 82.56 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 84.35 |
| K ₁ | 238.24 | 239.67 | 241.61 | |
| K ₂ | 251.14 | 249.97 | 245.13 | |
| K ₃ | 252.10 | 251.84 | 254.74 | |
| R | 13.86 | 12.17 | 13.13 | |
| 最佳条件 | A ₃ | B ₃ | C ₃ | |

甲壳素脱乙酰基制备壳聚糖这一反应属于亲核取代反应, 吸热反应。提高反应温度, 有利于反应的进行, 反应速率大; 当提高到一定温度是, 反应速率几

乎不变,壳聚糖脱乙酰度也保持不变。随着时间的延长,反应进一步进行,当时间达到一定值时,酰胺基浓度减小,脱乙酰度保持不变。NaOH 是亲核剂,增大碱浓度,脱乙酰度增大;当碱浓度增大一定浓度时,脱乙酰度达到最大值。

由表 2 可知, 试验号 5 (A₂B₂C₃), 即温度 80 °C、时间 120 min、碱浓度 60%, 壳聚糖的脱乙酰度最高为 86.61%; 根据正交试验极差分析得出, 各因素对壳聚糖脱乙酰度的影响主次顺序为 A>C>B, 但根据正交优化试验结果, 制备壳聚糖的最佳条件为温度 90 °C, 时间 150 min, 碱浓度 60%。

为验证正交试验法所得结果的可靠性, 根据上述优化条件制备壳聚糖, 平行重复三次, 取平均值。以温度 90 °C, 时间 150 min, 碱浓度 60%, 所得壳聚糖的脱乙酰度为 87.04%, 与正交试验结果高于试验号 5。说明正交试验得出的最优条件具有可靠性。

2.5 壳聚糖结构表征

2.5.1 紫外吸收光谱分析

将制备的壳聚糖溶于 0.1 mol/L NaCl-0.1 mol/L CH₃COOH 水溶液置于紫外-可见分光光度计上, 在 200~400 nm 范围内扫描其吸收峰。壳聚糖的紫外谱图见图 4。

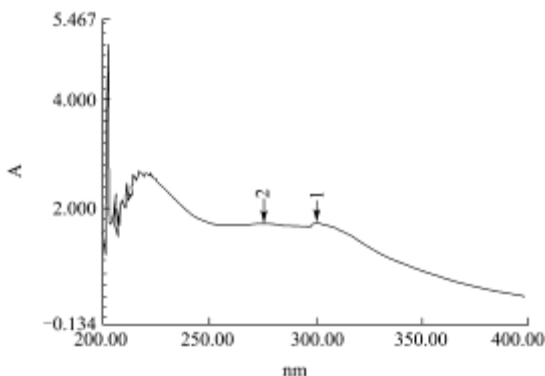


图 4 壳聚糖紫外吸收图谱
Fig.4 UV spectra of chitosan

由图 4 可以看出, 壳聚糖在波长 200~400 nm 范围内, 主要有两个吸收峰。这主要是由于 C-O 与 C-N 之间的相互作用产生。在波长 275 nm 左右, 有一个强而宽的吸收峰, 这是氮的孤对电子发生 n→σ* 跃迁产生的。

2.5.2 热重分析

将壳聚糖粉末进行热重和差热分析, 考察其热稳定性和热分解情况。图 5 为壳聚糖的差热/热重分析结果。

由图 5 可以看出, 在 CTS 的热重曲线中, 其热分解过程基本上分为两个部分, 第一部分是在 25~150 °C 之间物质的质量有 13.3% 失重, 在 135 °C

时达到最低点, 造成失重的原因主要是样品中存在少量的吸附水和空间水的脱除; 第二阶段, CTS 在温度为 283 °C 时, 出现大的失重阶梯, 终止点温度为 749 °C, 在第二失重阶段, 物质的质量共损失了 67.40%。在 283 °C 之前, CTS 的质量基本上保持不变, 证明在此温度之前, 性质比较稳定。749 °C 之后, 质量不变, 性质比较稳定。由 DTA 差热曲线可知, 壳聚糖失水时都是吸热而分解时放热的, 试样所吸收的水的蒸发需吸收热量, 分解时主链断裂而放热, 这与热重分析结果相符。

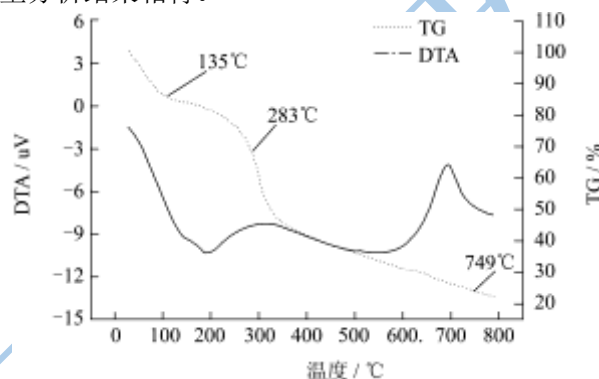


图 5 壳聚糖差热/热重分析结果
Fig.5 DTA/TG results of chitosan

2.5.3 电镜扫描分析

将壳聚糖粉末通过扫描电镜以二次电子像的成像的工作原理进行表面形貌分析, 用扫描电镜观测壳聚糖的形貌见图 6。

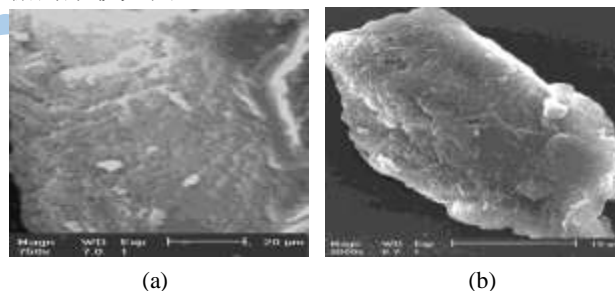


图 6 壳聚糖电镜扫描图

Fig.6 Scanning electron microscope spectra of chitosan

图 6 (a) 和 (b) 表示壳聚糖在不同倍数下电镜扫描图。由图可知, 壳聚糖形貌是片状形, 表面积大, 形状规整, 表面干燥、致密、均匀, 无空洞出现, 表面其结晶度好。这也是壳聚糖制成的膜致密, 对果蔬有保鲜作用的原因之一。另外, 壳聚糖难溶于水, 也有这一方面的原因。

3 结论

3.1 温度、时间、碱浓度对壳聚糖的脱乙酰度有显著影响。经验证试验得知, 正交试验优化结果具有可靠性。处理温度相对降低, 节约了资源。反应在高碱浓

度中进行,预尝试借助物理磁场或添加其他试剂降低碱浓度,达到相同效果。

3.2 紫外图谱显示,壳聚糖在波长 200~400 nm 波长范围内,有两个吸收峰。壳聚糖形貌片状,形状规整,表面干燥、致密、无空洞出现,其结晶度好,热稳定性高。

参考文献

- [1] 姜秋焕,叶盛权,叶春海.壳聚糖涂膜对鲜切菠萝蜜的保鲜作用[J].现代食品科技,2012,28(1):14-17
- [2] 曾林涛.壳聚糖制备及其生理活性研究[D].华中师范大学,2007
- [3] Du Y, et al. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(1): 103-107
- [4] 杨锡洪,章超桦,解万翠.虾头自溶脱蛋白法制备壳聚糖的新工艺[J].现代食品科技,2008,24(7):667-670
- [5] 陈利海,戴桂芝,李德茂.南美白对虾甲壳素提取工艺的优化[J].中国调味品,2009,34(2): 83-85
- [6] Araneda M, E P Pérez and E Gasca-Leyva.White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight[J]. Aquaculture, 2008, 283(1-4): 13-18
- [7] Moss D R, et al.Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [J]. Aquaculture, 2007, 272, Supplement 1(0): S30-S37
- [8] 贾荣仙,聂容春.龙虾壳甲壳素的提取和壳聚糖的制备及性能研究[J].安徽化工,2010,36(1):41-42.
- [9] Nosal W H, et al. V-vis-infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films[J].Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 43(3-4): 131-137
- [10] Munro N H, et al.Preparation and graft copolymerisation of thiolated β -chitin and chitosan derivatives [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(1): 137-145
- [11] 李兆杰.壳聚糖快速制备技术及降血脂、免疫增强活性研究[D].中国海洋大学,2010
- [12] Weinhold M X, et al. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations [J].Carbohydrate Polymers, 2009, 78(4): 678-684
- [13] 唐义宝,谢晶.虾壳、虾头中甲壳素和壳聚糖的制备与应用[J].山西农业科学,2010,38(10):55-59
- [14] 王喆.低分子量壳聚糖的制备[D].长春工业大学,2011.
- [15] 徐倩.丝素/羧甲基壳聚糖共混及其双层复合载药膜的制备与性能研究[D].天津工业大学,2008