

蝇蛆壳制备壳聚糖的工艺条件研究

马翠翠, 任健

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 本试验探索了蝇蛆壳制备壳聚糖的最佳工艺条件。以蝇蛆壳中甲壳素为原料, 采用碱液法制备壳聚糖。通过单因素试验考察了碱液浓度、液料比、反应时间对壳聚糖脱乙酰度的影响; 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 采用三因素三水平响应面分析法优化脱乙酰基反应条件, 依据回归分析确定工艺条件的主要影响因素, 以壳聚糖脱乙酰度为响应值作响应面和等值线图。通过分析各个因素的显著性和交互作用, 得出脱乙酰基反应的最佳工艺条件为: 液料比 57.49:1 (V/m), 碱液浓度 50%, 反应时间 7.3 h。在此条件下所得壳聚糖的脱乙酰度理论值为 83.18%, 实测值为 79.45%, 并得到白色粉末状壳聚糖。

关键词: 蝇蛆壳; 甲壳素; 壳聚糖; 制备

文章编号: 1673-9078(2013)2-331-334

Study on Preparation Condition for the Chitosan from Flies Maggots

MA Cui-cui, REN Jian

(College of Food and Biological Engineering, Hei long jiang Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: To optimize the preparation condition for the chitosan from Flies maggots, chitin from Flies maggots shell was used as raw material, and alkali liquor method was used to prepare chitosan. Effects of sodium hydroxide concentration, ratio of liquid to material and reaction time on the deacelation degree of chitosan were investigated respectively by single-factor tests, and then the process conditions of the deacelation was optimized through response surface methodology with three factors and three levels based on the principle of Box-Behnken design. The results showed that the optimum conditions of the deacelation reaction were as follows: ratio of liquid to material 57.49:1, sodium hydroxide concentration 50%, and reaction time 7.3 h. Under these conditions, the theoretical value of the chitosan deacelation degree was 83.18%, and 79.45%, respectively. The chitosan product was a white powder.

Key words: flies maggots shell; chitin; chitosan; preparation

壳聚糖为天然多糖甲壳素(聚 β -1, 4-N-乙酰-氨基葡萄糖)脱除部分乙酰基的产物, 其化学名为 β -1, 4-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖^[1], 是自然界唯一的碱性多糖, 具有抑菌、抗癌、降脂、增强免疫等多种生理功能, 已广泛应用于医药、食品、轻纺、农业和环境保护等行业^[2]。

目前我国生产甲壳素产品的原料主要是虾、蟹的外壳, 由于原料供应受地域和季节等因素影响, 致使甲壳素产品供不应求。研究发现, 蝇蛆壳中含有丰富的甲壳素(8%~10%), 且其色素及钙盐含量均较低^[3], 是一种不可多得的天然生物资源, 具有很高的应用价值。然而, 蝇蛆壳多以废料的形式被丢弃, 不仅浪费资源, 也对环境造成了污染。本试验选择蝇蛆壳为原料, 在碱液作用的条件下使蝇蛆壳中的甲壳素充分脱

除乙酰基, 制备较高脱乙酰度^[4]的壳聚糖, 通过响应面分析法[RSM], 探求蝇蛆壳甲壳素的脱乙酰基反应的最佳工艺条件, 为蝇蛆壳的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

蝇蛆壳: 由齐齐哈尔市建华区齐佳生态养殖专业合作社提供; 氢氧化钠、冰乙酸、盐酸、过氧化氢: 均为分析纯; 实验用水均为蒸馏水。

1.2 主要仪器

DK-98-II 电热恒温水浴锅: 天津市泰斯特仪器有限公司; TDL-5-A 离心机: 上海安亭科学仪器厂; pH 计 (PB-10) 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 脱乙酰度的测定

采用酸碱滴定法^[5]测定壳聚糖的脱乙酰度。

1.3.2 甲壳素的提取

将蝇蛆壳去杂、粉碎, 经过脱除无机盐、脱除蛋

收稿日期: 2012-10-20

基金项目: 黑龙江省研究生创新项目 (YJSC2012-388HLJ)

作者简介: 马翠翠 (1987-), 女, 在读硕士研究生, 农产品加工及贮藏工程

通讯作者: 任健 (1970-), 男, 博士, 教授, 粮食油脂及植物蛋白工程

白质和脱色处理, 得到甲壳素。

1.3.3 壳聚糖的制备

采用 Hussein 等描述的方法^[6]制备蝇蛆壳聚糖, 略作调整。以提取的甲壳素为原料, 进行脱乙酰基反应。按一定的液料比加入一定浓度的 NaOH 溶液, 沸水浴一定时间, 过滤, 滤渣水洗至中性。重复上述操作, 合并滤液。按液料比 50:1 (V/m) 加 10% 醋酸, 搅拌溶解 1 h, 过滤, 滤液调 pH 值至 7.0。离心, 干燥, 即得壳聚糖。

1.3.4 单因素试验设计

本试验主要研究脱乙酰基反应过程中碱液浓度、液料比、反应时间对壳聚糖脱乙酰度的影响。

1.3.5 响应面分析法试验设计

综合单因素试验结果, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[7-8], 设计三因素三水平响应面分析试验^[9], 优化脱乙酰基反应条件。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验的结果分析

2.1.1 碱液浓度对壳聚糖脱乙酰度的影响

称取一定质量的甲壳素, 碱液浓度分别为 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 反应时间为 6 h、液料比为 50:1 (V/m)、沸水浴的条件下进行脱乙酰基反应, 结果见图 1。

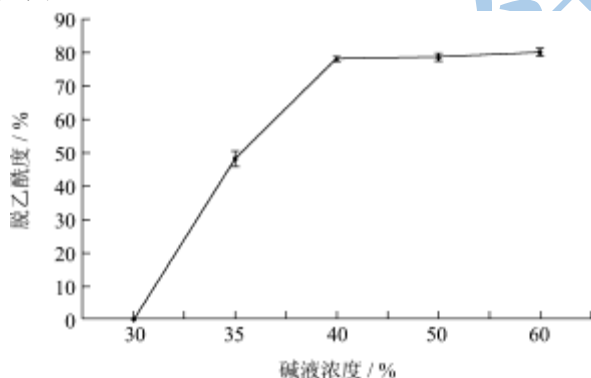


图 1 碱液浓度对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.1 Effects of alkali liquor concentration on deacetylation degree of chitosan

由图 1 可知, 随着碱液浓度的增大, 脱乙酰度值逐渐升高, 40% 后上升不显著 ($P>0.05$)。碱液浓度较低时, 产物脱乙酰基反应只在甲壳素表面进行, 当浓度为 30% 时, 产物脱乙酰度小, 达不到溶于 1% 乙酸的要求。随着碱液浓度增大, 扩散到甲壳素内部的 OH 增多, 促进 OH 与乙酰基的反应, 当浓度大于 40% 时, 造成脱落的乙酰基增多而影响扩散。所以碱液浓度以 40% 为宜。

2.1.2 液料比对壳聚糖脱乙酰度的影响

称取一定质量的甲壳素, 液料比分别为 30:1、40:1、50:1、60:1、70:1 (V/m), 碱液浓度为 40%、反应时间为 6 h、沸水浴的条件下进行脱乙酰基反应, 结果见图 2。

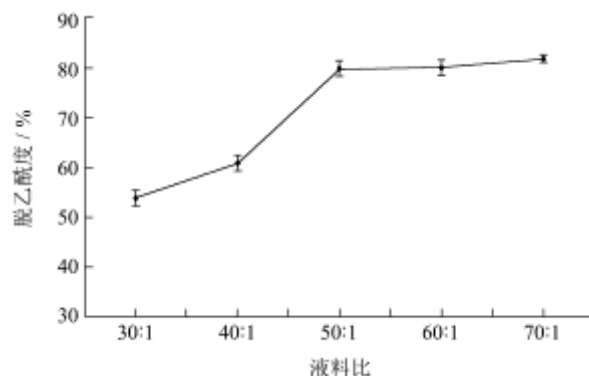


图 2 液料比对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.2 Effects of ratio of material to liquid on deacetylation degree of chitosan

由图 2 可知, 随着液料比的增加, 脱乙酰度值随之增加, 液料比增加到 50:1 至 70:1 时, 脱乙酰度值变化不显著 ($P>0.05$), 这可能是由于液料比达到 50:1 (V/m) 时过多的碱液已使脱乙酰基反应趋于饱和, 所以再增加溶剂比例后, 脱乙酰度值没有明显变化。同时溶剂在后续工作中需经离心除去, 因此液料比 (V/m) 以 50:1 为宜。

2.1.3 反应时间对壳聚糖脱乙酰度的影响

称取一定质量的甲壳素, 反应时间分别为 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 碱浓度为 40%、液料比为 50:1 (V/m)、沸水浴的条件下进行脱乙酰基反应, 结果见图 3。

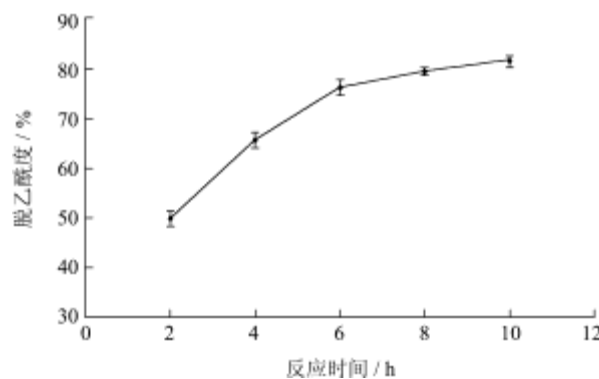


图 3 反应时间对壳聚糖脱乙酰度的影响

Fig.3 Effects of time on deacetylation degree of chitosan

由图 3 可知, 随着反应时间的延长, 脱乙酰度值随之增加。在 6 h 时达到最大, 再延长时脱乙酰度值变化不显著 ($P>0.05$)。这是由于开始反应后, 甲壳素晶体束渐渐打开, 碱液渗入到甲壳素的内部与乙酰基反应, 脱乙酰度值增加。但随着时间的延长, 碱液中乙酰基浓度过大容易吸附在甲壳素表面, 阻碍碱液的渗入, 阻止反应的进一步进行, 脱乙酰度值变化较

小。因此反应时间以 6 h 为宜。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 试验结果及方差分析

响应面试验设计因素和水平见表 1。

Box-Behnken 中心组合试验设计方案及结果见表 2, 应用 Design Expert7.0.0 软件对表 2 中的试验数据进行多元回归拟合分析, 得回归方程:

$$Y=73.71+12.09X_1+4.63X_2+5.78X_3+2.22X_1X_2-2.68X_1X_3+2.10X_2X_3-5.43X_1^2-5.86X_2^2-5.96X_3^2$$

表 1 响应面分析因素与水平

因素水平	-1	0	1
X ₁ 碱液浓度/%	30	40	50
X ₂ 液料比(V/m)	40:1	50:1	60:1
X ₃ 反应时间/h	4	6	8

表 2 响应面设计与试验结果

Table 2 Design and experimental results of RSM

编号	X ₁	X ₂	X ₃	脱乙酰度/%
1	-1	-1	0	49.85
2	-1	1	0	55.33
3	1	-1	0	65.08
4	1	1	0	79.43
5	0	-1	-1	52.35
6	0	-1	1	62.83
7	0	1	-1	56.76
8	0	1	1	75.62
9	-1	0	-1	41.08
10	1	0	-1	75.13
11	-1	0	1	54.87
12	1	0	1	78.20
13	0	0	0	72.49
14	0	0	0	74.12
15	0	0	0	74.51

回归方程的方差分析结果见表 3。对应 F 值表^[10]可知, 响应面回归模型达到显著水平 (P=0.0029<0.0500), 可以应用于工艺条件的优化。模拟失拟项不显著 (P=0.0539>0.0500), 说明该模型拟合程度较好, 未知因素对试验结果干扰小, 可以用此模型对脱乙酰基反应的条件进行分析和预测。由 P 值可知, 各因素中 X₁ 和 X₃ 影响极显著, X₂ 影响显著, 按照对脱乙酰度的影响排序为: X₁>X₃>X₂。X₁²、X₂²、X₃² 影响显著, 表明试验因子对响应值不是简单的线性关系, 二次项对响应值也有很大的关系。

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
Model	1991.07	9	221.23	17.46	0.0029	**
X ₁	1169.1	1	1169.1	92.27	0.0002	**
X ₂	171.4	1	171.4	13.53	0.0143	*
X ₃	266.81	1	266.81	21.06	0.0059	**
X ₁ X ₂	19.67	1	19.67	1.55	0.268	
X ₁ X ₃	28.73	1	28.73	2.27	0.1925	
X ₂ X ₃	17.56	1	17.56	1.39	0.2921	
X ₁ ²	108.75	1	108.75	8.58	0.0326	*
X ₂ ²	126.67	1	126.67	10	0.025	*
X ₃ ²	131.14	1	131.14	10.35	0.0235	*
残差	63.36	5	12.67			
失拟性	61.06	3	20.35	17.73	0.0539	
纯误差	2.3	2	1.15			
总差	2054.43	14				

注: **表示差异极显著, P<0.01; *表示差异显著, P<0.05。

2.2.2 响应面分析及等高线图

根据回归方程, 作出相应的响应面图。

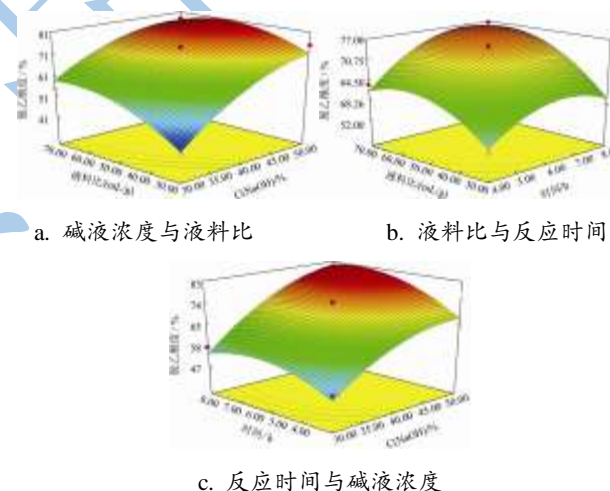


图 4 各两因素交互作用对壳聚糖脱乙酰度影响的响应面图
Fig.4 Response surface plots showing the effects of pairwise interactions among different factors on deacetylation degree of chitosan

图 4 直观的给出了各两因素交互作用的等值线图和曲面图。从曲面图的最高点和等值线可以看出, 在所选的范围内拟合曲面有最大值。通过 Design Expert7.0.0 软件在自变量范围为[-1, 1]内, 进行二次回归模型的预测, 得到最大响应值 (Y) 时 X₁、X₂、X₃ 对应的编码值分别为 X₁=-0.53, X₂=-0.51, X₃=0.31, 与其相对应的脱乙酰基反应的最佳条件为: 碱液浓度

50%，液料比 57.49:1 (V/m)，反应时间 7.3 h，理论最大脱乙酰度值为 83.18%。为了检验结果，采用得到的最佳反应条件进行验证试验，三次平行试验得到的实际平均脱乙酰度值为 79.45%，与理论值相差 4.48%。

3 结论

在甲壳素的脱乙酰基反应过程中，各因素对脱乙酰度的影响排序为：碱液浓度 > 反应时间 > 液料比。通过单因素试验和响应面设计优化了脱乙酰基反应条件，得到壳聚糖脱乙酰度与各因素变量的二次方程模型，该模型回归显著，拟合程度好。并得出脱乙酰反应的最佳工艺条件为碱液浓度 50%，液料比 57.49:1 (V/m)，反应时间 7.3h，在此条件下制成的壳聚糖成品为白色粉末，壳聚糖的脱乙酰度可达到 79.45%，与模型的预测值（83.18%）相差 4.48%，说明该模型合理可靠，有一定实际应用价值。

参考文献

- [1] 段文凯,吕美巧,郑春翠,等.壳聚糖的结构及抑菌作用[J].现代食品科技.2006,22(4):259-261
- [2] 秦秋香,郭祀远.壳聚糖的成膜性及其工业应用进展[J].现

代食品科技.2007,23(4):93-96

- [3] 贺继东,夏文水.工程蝇蛆的开发利用和深度加工[J].食品工业科技.2002,23(12):90-93
- [4] De Alvarenga E S, de Oliveira C P, Bellato C R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(4): 1155-1160
- [5] 蒋挺大.甲壳素[M].北京:化学工业出版社,2003:259
- [6] Hussein M H M, El-Hady M F, Sayed W M, and Hefni H. Preparation of some chitosan heavy metal complexes and study of its properties [J]. Polymer Science Series A, 2012, 54(2): 113-124
- [7] 费荣昌.实验设计与数据处理(第四版)[M].江南大学教材. 2001.59-63
- [8] Box G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data and model building [M]. New Nork: Wiley, 1990
- [9] Yamazaki, Kushida N, Oguchi A, Kikuchi H, et al. Response Surface Design and Analyses [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1987, 149-205
- [10] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社,2005