

网状壳聚糖固定化黄鱼中甲醛残留的条件优化

时伟¹, 李敬爱², 李厚培¹, 李敬龙¹

(1. 山东轻工业学院 食品与生物工程学院, 山东济南 250353) (2. 济南市食品科学研究所, 山东济南 250000)

摘要: 以壳聚糖为载体, 甲醛浸泡过的黄鱼、人血清白蛋白为材料, 研究一种壳聚糖法固定黄鱼中甲醛的方法。本文对影响固定化的关键因素: 戊二醛浓度、甲醛-人血清白蛋白 (FA-HSA) 用量、吸附温度等展开研究, 以 FA-HSA 吸附率为指标, 分别进行单因素实验和正交实验, 探索其固定化最佳条件。实验结果表明, 当戊二醛浓度为 5%, FA-HSA 用量为 14 mL, 吸附温度为 42 °C, 吸附时间为 4 h 时, FA-HSA 的吸附量为最大值, 且达到 59.2%。

关键词: FA-HSA; 壳聚糖; 交联法; 固定化

文章编号: 1673-9078(2013)4-822-825

Immobilization of Formaldehyde Residue in Yellow Croaker on Reticular Chitosan

SHI Wei¹, LI Jing-ai², LI Hou-pei¹, LI Jing-long¹

(1.School of Food and Biology Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China)

(2.Jinan Institute of Food Science, Jinan 250000, China)

Abstract: With Chitosan as a carrier, a method for immobilizing formaldehyde residue in yellow croaker was developed. Effects of several key factors, including glutaraldehyde concentration, the amount of FA-HSA, adsorption temperature and so on, on immobilization were investigated taking the adsorption rate of FA-HSA as the indicators. Through single factor experiments and orthogonal test, the best condition of formaldehyde immobilization on chitosan were determined as: glutaraldehyde concentration 5%, the amount of FA-HSA 14mL, adsorption temperature 42 °C and the adsorption time 4 h. Under the optimum immobilization conditions, the adsorption rate of FA-HSA reached the highest rate of 59.2%.

Key word: FA-HAS; chitosan; crosslinking; immobilized

我国是世界第一水产养殖和贸易大国, 年产量占世界总量 70% 以上, 年出口额居世界首位。然而近年一些商家为了改善市售水产品的感官性状、延长其保鲜时间, 过量使用甲醛进行防腐保鲜处理, 导致水产品中残留有大量甲醛。这不仅对消费者的健康造成危害, 而且成为我国水产品进出口贸易的主要技术壁垒, 由此影响到我国水产品产业的持续健康发展。

目前甲醛的检测方法主要是采用传统的物理或化学测定方法, 而这两种方法都不能快速、高效、准确地检测出待测样品中甲醛含量, 尤其当一些水产品中甲醛含量较低时就更难测定^[1-3]。因此, 开发一种简便、灵敏、准确的甲醛检测方法-同位素标记甲醛抗体法, 对水产品质量保证和快捷出口具有现实意义。图 1 是其大体流程。

以壳聚糖为原料的固定化研究在国内外虽有大量

报道, 但未见利用人血清白蛋白作为中间物固定甲醛的相关研究报道。本实验以黄鱼为材料, 在其甲醛萃取和 FA-HSA 加合反应工艺的基础上, 研究了网状壳聚糖对 FA-HSA 复合物的固定化技术^[4-8], 探索了其最佳固定条件, 为探索水产品甲醛含量免疫检测新方法提供抗原。

同位素标记甲醛抗体法流程图如下:

黄鱼中甲醛的萃取→甲醛与人血清白蛋白的加合→FA-HSA 的固定化→抗体与 FA-HSA 的免疫反应→³⁵S 标记的甲醛抗体制备→杂交瘤细胞的制备→放射性检测得出的甲醛含量

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

黄鱼捣碎液: 市场购买; 人血清白蛋白 (HSA): 北京鼎国生物技术发展中心; 磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.0): 为溶剂配制并经 0.45 μm 滤膜过滤; 壳聚糖 (网状的): 生化试剂, 山东青岛利中壳聚糖厂; 考

收稿日期: 2012-11-09

作者简介: 时伟 (1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向为现代酿酒技术

通讯作者: 李敬龙, 教授

马斯亮蓝 G250: 上海沪宇生物科技有限公司; 甲醛标准溶液: 国家标准物质研究中心; 戊二醛、乙酸、氢氧化钠均为分析纯。Cary50 紫外可见分光光度计, 美国瓦里安; ZHWY-110X50 水浴恒温摇床, 上海智诚有限责任公司; KJ-I 型控温强磁力搅拌器, 苏北生化仪器厂; pH-3 型酸度计, 上海第二分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 甲醛的萃取工艺

称取被甲醛处理过的黄鱼捣碎液(1 ± 0.01) g, 置于 250 mL 的碘量瓶中, 加 100 mL 蒸馏水, 盖紧盖子, 在温度为 60 °C 的条件下, 保温 40 min, 每 5 min 摇瓶一次, 冷却过滤得到甲醛萃取液。

1.2.2 甲醛与血清白蛋白的加合作用

准确量取一定量的甲醛萃取液置于 250 mL 的碘量瓶中, 按 1:3 的混合比例加入一定量的人血清白蛋白溶液, 再向其中加入一定量的磷酸盐缓冲溶液, 然后置于恒温水浴摇床, 15 °C 下, 以一定的转速, 维持 120 min, 使其中的甲醛与人血清白蛋白共价结合得到甲醛-人血清白蛋白加合物 (FA-HSA) 缓冲溶液。

1.2.3 甲醛-人血清白蛋白 (FA-HSA) 的固定

取一定量的壳聚糖溶于 1% 的乙酸水溶液中, 在磁力搅拌下, 滴加 2% 的氢氧化钠水溶液至溶液 pH=5.5 后, 加入一定量的戊二醛水溶液反应 1 h, 然后在快速搅拌下滴加 5% 的氢氧化钠水溶液至溶液 pH=7.5, 抽滤收集沉淀, 可得预交联的网状壳聚糖白色细小微球。

将一定量上述壳聚糖微球置于 50 mL 的锥形瓶中, 加入一定量的 FA-HSA 缓冲液, 放入摇床 (100 r/min) 在一定温度条件下吸附一定时间, 即可得 FA-HSA 的固定化产物。

1.2.4 FA-HSA 的吸附量测定

固定化过程结束后, 取上清液, 利用考马斯亮蓝染色法用紫外可见分光光度计测定 595 nm 波长下的吸光度值, 计算剩余人血清白蛋白浓度, 即可得到。

2 结果与分析

2.1 固定化条件的选择

2.1.1 交联剂对 FA-HSA 固定化的影响

本研究采用戊二醛作为交联剂, 固定化 FA-HSA。戊二醛是一种固定化效率高而低毒的交联剂, 先与带有氨基的壳聚糖微球连接, 再与人血清白蛋白分子上的-NH₂ 反应, 从而将人血清白蛋白分子固定在载体上。固定其它条件, 分别选用不同浓度的戊二醛制备固定化 FA-HAS, 结果见图 1。

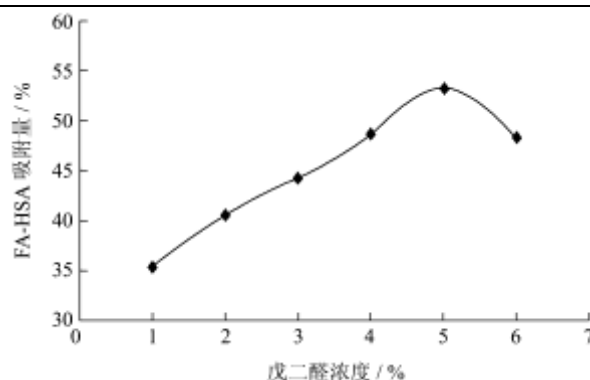


图 1 戊二醛浓度对 FA-HSA 固定化的影响

Fig.1 Effect of glutaraldehyde concentration on the immobilization of FA-HSA

由图 1 表明, 当戊二醛浓度较低时, FA-HSA 的吸附量随戊二醛浓度的增加而增加, 当浓度继续增大时, FA-HSA 的吸附量呈降低趋势, 当戊二醛浓度为 5.0% 时, FA-HSA 吸附量达到最大程度。这是因为, 当戊二醛浓度较低时, 浓度的增大有利于载体与戊二醛的交联反应, 使得单位面积的载体上面覆盖有足够的戊二醛, 促进了与 FA-HSA 的交联作用, 当浓度超过一定范围时, 抑制作用会成为主导, 致使固定化效率降低, 吸附率转而下降。

2.1.2 FA-HSA 用量对其固定化的影响

在戊二醛浓度为 5.0% 时, 固定其他条件不变, 分别选用不同量的 FA-HSA 对其进行固定化制备。结果见图 2。

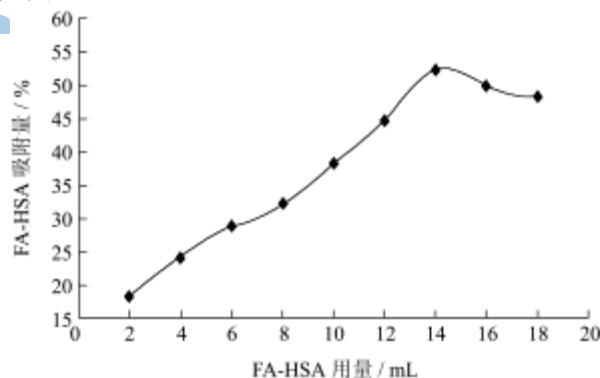


图 2 FA-HSA 用量对其固定化的影响

Fig.2 Effect of the amount of FA-HSA adduct on the immobilization of FA-HAS

由图 2 表明, 当 FA-HSA 用量较低时, 其固定程度随它用量的增加而增加, 当用量继续增大时, FA-HSA 的固定程度呈降低趋势, 当 FA-HAS 用量为 14 mL 时, FA-HSA 吸附量达到最大程度。这是因为, 壳聚糖微球的固定化结合位点数量是有限的, FA-HSA 的用量越高, 其与载体结合越多, 当结合位点趋于饱和后, 增加 FA-HSA 用量, 其的吸附量也不

再继续增高。

2.1.3 吸附温度对 FA-HSA 固定化的影响

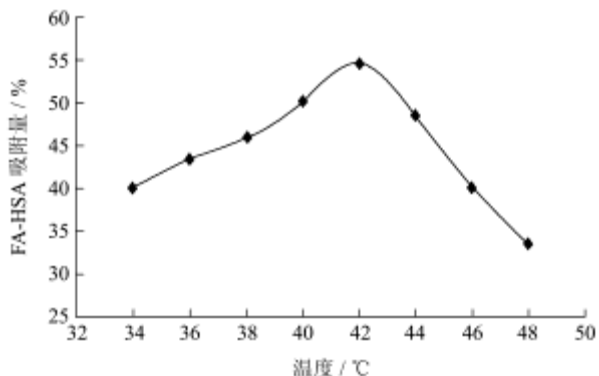


图3 吸附温度对 FA-HSA 固定化的影响

Fig.3 Effect of the adsorption temperature on the immobilization of FA-HSA

由图3表明,在温度较低时,随着吸附温度的提高,FA-HSA的吸附量随之增加,当达到42℃时,其吸附量达到最大值,随之快速下降。这是因为温度较低时,FA-HSA的活性受到抑制,从而使FA-HSA与交联剂的结合降低,温度太高时,容易破坏其结合的化学键,从而降低热稳定性。

2.1.4 吸附时间对 FA-HSA 固定化的影响

在戊二醛浓度为5.0%,FA-HSA用量为14 mL,吸附温度保持在42℃时,固定其他条件不变,选择以不同吸附时间制备固定化FA-HSA。结果见图4。

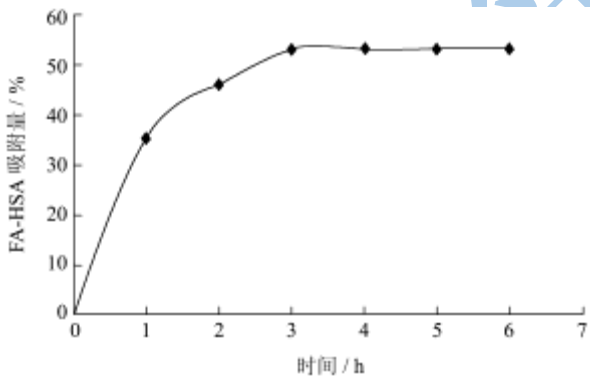


图4 吸附时间对 FA-HSA 固定化的影响

Fig.4 Effect of the adsorption time on the immobilization of FA-HSA

由图4表明,壳聚糖微球在1h后对FA-HSA的吸附量达到35.4%,具有一个很大的吸附初速度,后期增长缓慢,3h后FA-HSA吸附量不再发生变化,表明微球对FA-HSA的吸附已达到饱和。这是因为小粒径的微球有较大的比表面积,所以吸附性很强,相应的吸附时间也较短,同时由于微球的固定化结合位点数量是有限的,随着结合位点的减少,吸附速度减缓,直到最后其吸附量不再继续增高。

2.2 固定化工艺的优化

为确定FA-HSA的最佳固定化条件,在单因素实验基础上,进行正交实验,对戊二醛浓度、FA-HSA用量、吸附温度、吸附时间等这四个因素,设置不同水平进行研究。因素水平见表1,正交实验结果见表2。

表1 因素水平表

水平	因素			
	A(戊二醛浓度/%)	B(FA-HSA用量/mL)	C(吸附温度/°C)	D(吸附时间/h)
1	4	12	40	2
2	5	14	42	3
3	6	16	44	4

表2 正交实验结果

实验序号	A	B	C	D	吸附量/%
1	1	1	1	1	48.1
2	1	2	2	2	54.2
3	1	3	3	3	52.3
4	2	1	2	3	53.6
5	2	2	3	1	53.4
6	2	3	1	2	52.6
7	3	1	3	2	49.8
8	3	2	1	3	51.9
9	3	3	2	1	53.6
k ₁	51.533	50.500	50.867	51.700	
k ₂	53.200	53.167	53.800	52.200	
k ₃	51.767	52.833	51.833	52.600	
极差	1.667	2.667	2.933	0.900	
最优方案	A ₂	B ₂	C ₂	D ₃	

表3 正交实验的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F值	F临界值	显著性
戊二醛浓度	4.887	2	0.607	4.460	
FA-HSA用量	12.667	2	31.74	4.460	*
吸附温度	13.407	2	63.66	4.460	*
吸附时间	1.220	2	0.152	4.460	
误差	32.18	8			

由直观分析可知,4个因素对FA-HSA固定化的影响主次顺序为:C>B>A>D,即吸附温度>FA-HSA用量>戊二醛浓度>吸附时间,最优方案为A₂B₂C₂D₃,即吸附时间为4h,戊二醛浓度为5%,FA-HSA用量为14 mL,吸附温度为42℃。经验证性试验发现在最佳固定化工艺条件下,FA-HSA的吸附量为最大值且

为 59.2%，并在该最佳条件下进行了 13 次重复试验，其中标准偏差为 1.53%。为了确定这四个因素对实验结果的影响显著性，进一步对正交实验结果进行方差分析，结果见表 3。

表 3 中，“*”表示达到显著水平，由表 3 可知，FA-HSA 用量、吸附温度这两个因素对 FA-HSA 固定化的影响达到显著水平，而戊二醛浓度和吸附时间则未达到显著水平，这与直观分析相符。

3 结论

以黄鱼为材料，探索了利用网状壳聚糖法固定黄鱼中甲醛的最佳条件，其中戊二醛浓度为 5%，FA-HSA 用量为 14 mL，吸附温度为 42 ℃，吸附时间为 4 h。验证性试验表明 FA-HSA 的最大吸附量为 $(59.2 \pm 1.53)\%$ 。

参考文献

- [1] 李跃红. 甲醛检测方法的研究进展[J]. 职业与健康, 2006, 22(15):1151-1153
- [2] 杨柳, 王建立, 葛兴, 等. GC-MS-SIM 法测定水发食品中痕量甲醛[J]. 动物科学和医药, 2003, 21(7):28
- [3] 陈炎, 孙东红, 李舒, 等. 乙酰丙酮荧光分光光度法测定环境空气中的微量甲醛[J]. 中国环境监测, 2000, 16(4):30-32
- [4] 夏文水, 谭丽. 壳聚糖酶固定化研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(6):7-10
- [5] 徐鑫煤, 陈英, 沈树宝, 等. 壳聚糖固定化酶和细胞研究新进展[J]. 化工科技, 2006, 14(1):54-57
- [6] 曾嘉, 郑连英, 余世清, 等. 壳聚糖微球固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(1):29-31
- [7] 刘颖, 王鑫, 岳文静, 等. 磁性壳聚糖固定化转谷氨酰胺酶的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(9):1081-1082
- [8] 苏豫梅, 李清清, 李秉超, 等. 不同固定化菊粉酶方法的比较及条件优化[J]. 现代食品科技, 2008, 24(12):1296-1299