

# 虾头自溶脱蛋白法制备壳聚糖的新工艺

杨锡洪, 章超桦, 解万翠, 吉宏武, 曹文红, 吴华荣

(广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 为探索以虾头制备壳聚糖的新工艺, 采用紫外照射激活虾头内自溶酶, 水解脱除蛋白质替代传统的碱加热处理法, 对工艺条件进行了优化, 确定了紫外照射 15 min、自溶 3 h 脱蛋白, 8% HCl 室温处理 3 h 脱钙, 50% NaOH、130 °C 加热 2 h 脱乙酰, 制备的壳聚糖符合质量标准。与传统法和加酶水解法相比较, 自溶法生产成本降低, 操作简单, 对环境污染减少, 极具应用前景。

**关键词:** 虾头; 自溶酶; 脱蛋白; 壳聚糖

中图分类号: TS201.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0667-04

## New Techniques for Preparation of Chitosan via Autolysis of the Shrimp Head Proteins

YANG Xi-hong, ZHANG Chao-hua, XIE Wan-cui, JI Hong-wu, CAO Wen-hong, WU Hua-rong

(Guangdong Ocean University, School of Food Science and technology, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** A novel technique for preparation of chitosan from shrimp head was developed via activating the autolysins using ultraviolet to autolyze the proteins of shrimp head. The processing conditions were optimized as follows: UV-irradiation time of 15min, autolysis time of 3h, decalcification time of 3h with 8% HCl at room temperature, and deacetylation time of 2h using 50%NaOH at 130°C. The achieved Chitosan showed high quality. Compared with traditional chemical method and enzymatic method, this method was greener, simpler and had lower cost, showing a wide application prospect.

**Key words:** shrimp head; autolyze protease; deprotein; chitosan

全球对虾的消费需求量普遍增长, 促进了我国对虾养殖和加工业的稳定发展。对虾虾仁加工过程中会产生大量的虾头、虾壳等废弃物, 其中虾头约占全虾重量的三分之一以上, 仅广东省2006年产生的虾头就达到了6~7万吨。由于目前我国对虾废弃物的综合利用技术水平较低, 仅部分加工成饲料、调味料和壳聚糖等, 其余的直接丢弃, 浪费了宝贵的资源, 同时又污染了环境<sup>[1,2]</sup>。

以虾头制备壳聚糖的传统工艺, 通常采用稀HCl分解无机盐, 用稀碱脱除蛋白质得甲壳素, 再于浓NaOH溶液中高温处理, 脱乙酰基得到壳聚糖。传统生产方法存在的问题是: 壳聚糖的粘度低, 操作步骤多、生产周期长、原料和能量消耗大、生产成本低, 以及废水排放造成环境污染等<sup>[3]</sup>。

为此, 国内外采用酶解法替代稀碱脱除蛋白质,

收稿日期: 2008-03-31

基金项目: 广东省重大科技专项, 项目编号: 2003A2030504

作者简介: 杨锡洪 (1963-), 男, 博士, 主要从事食品添加剂研究

通讯作者: 章超桦, 男, 教授, 博导, 研究方向为海洋资源综合利用和水产品深加工

既加入商品酶制剂, 在一定条件下保温水解, 由此较大地提高了生产成本<sup>[4]</sup>。基于海产品独特的生理特性, 本文将采用紫外诱导提高虾自溶酶的活性, 酶解脱除蛋白质<sup>[5-7]</sup>, 从生产成本、生产工艺和产品的质量指标等方面对制备壳聚糖的新方法进行了研究。因此, 采用新的工艺来缩短反应时间、降低能耗、保护环境, 具有十分重要的意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

虾头: 采自湛江市国联水产公司加工的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); 中性蛋白酶: 广西南宁庞博生物工程有限公司(20万U); 氨基葡萄糖、EDTA、3,5-二硝基水杨酸等为AR。

722S可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 数控电热恒温水浴锅(余姚市东方电工仪器厂); TD-5台式离心机(长沙英泰仪器有限责任公司); NDJ21旋转黏度计(深圳市铭科化工有限公司)。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 传统壳聚糖制备工艺

虾头→粉碎→清洗→酸处理→脱钙[室温, HCl (10%×3 h)]→清洗→过滤→碱煮脱蛋白[100 °C, NaOH (10%) ×2 h]→浓碱脱乙酰[130 °C, NaOH (50%) ×3 h]→过滤→清洗至中性→过滤→干燥(50 °C×5 h)。

### 1.2.2 自溶法制备工艺

虾头→粉碎→紫外照射(15 min)→自溶脱蛋白(室温, 3 h)→清洗→过滤→酸处理脱钙[室温, HCl (10%×3 h)]→清洗→过滤→浓碱脱乙酰[130 °C, NaOH (50%) ×2 h]→清洗至中性→过滤→干燥(50 °C×5 h)。

### 1.2.3 酶水解脱蛋白质法

采用添加中性蛋白酶水解替代稀碱脱除蛋白质的方法, 水解条件为: 中性蛋白酶的添加量1000 U/g干虾头粉, 水解温度55 °C、pH 7.0, 其它操作同1.2.1。

### 1.3 检验方法

水分含量的测定采用常压烘箱干燥法<sup>[8]</sup>; 游离氨基酸含量测定采用三氯乙酸去除蛋白质, 再用紫外分光光度法<sup>[8]</sup>; 钙含量测定方法采用EDTA络合滴定法<sup>[8]</sup>; 脱乙酰度测定采用氨基含量法<sup>[9]</sup>, 壳聚糖粘度采用粘度计法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外照射时间对自溶酶水解蛋白的影响

取7份粉碎后的虾头, 采用紫外灯距离30 cm照射, 时间分别为0 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min和30 min, 室温下自溶水解时间为3 h, 过滤, 收集滤液测游离氨基酸含量, 结果见图1。

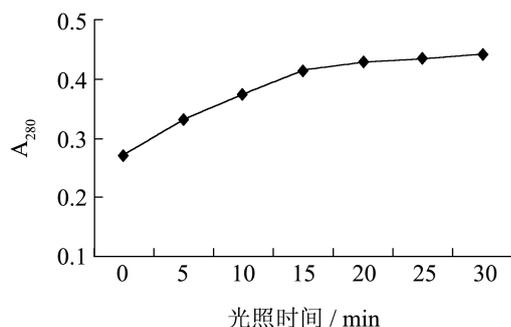


图1 紫外照射时间对蛋白水解的影响

Fig.1 Effect of UV-irradiation time on the autolysis of the proteins in shrimp head

由图1可见, 不经紫外照射的虾头也可以发生自溶现象, 但水解酶活性较低。经紫外照射且随着照射时间的延长, 蛋白水解的程度提高, 表明紫外照射虾头可以激活其自溶酶, 提高虾头中蛋白质的水解速度。在15 min以后, 水解速度增加的不明显, 因此, 选择紫外照射时间为15 min。紫外照射的时间受紫外灯的功率、照射距离以及原料状态的影响, 章超桦等对亨

氏仿对虾和斑节对虾自溶影响因素进行了研究, 指出紫外照射可以激活虾体内自溶酶, 照射强度过低, 仅杀灭微生物, 但强度过高, 可以引起酶的失活<sup>[5]</sup>。因此, 在工业化生产中, 虾头经粉碎后, 分散均匀, 受到照射的强度一致, 如果将紫外灯改装在管路中, 照射时间可以缩短, 适应企业的实际生产。

### 2.2 自溶时间对脱除蛋白的影响

取6份粉碎后的虾头, 紫外照射15 min, 室温下分别水解0 h、1 h、2 h、3 h、4 h和5 h, 过滤, 收集滤液测定游离氨基酸含量, 结果见图2。

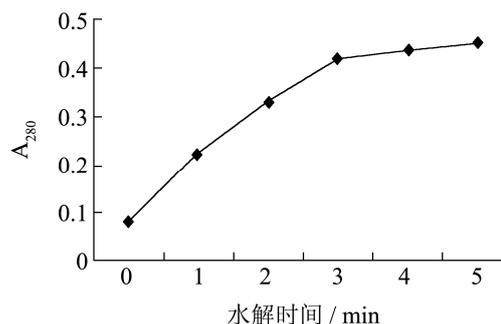


图2 自溶时间对蛋白水解的影响

Fig.2 Effect of autolysis time on the hydrolysis of the proteins in shrimp head

自溶时间对蛋白质水解的影响较大, 由图2可见, 在前3 h, 蛋白质的水解程度提高较快, 但达到3 h以后, 水解产生的游离氨基酸增加不明显, 考虑到缩短生产周期的目的, 将自溶时间确定为3 h。除紫外照射强度外, 影响自溶时间的另一个重要因素是温度。章超桦等对虾自溶温度的研究中发现, 在50 °C条件下亨氏仿对虾和斑节对虾的自溶速度都是最快的, 对刀额新对虾的实验也得到同样的结论, 但通过其独特设计的梯度升温法, 在40~70 °C内, 分段升温水解, 在同样时间内水解速度显著提高<sup>[5,6]</sup>。本文研究中, 为了适合企业生产, 虾头的自溶无需保温处理, 在车间通常温度下进行即可, 但考虑到季节变化, 造成温度的波动, 生产中要依据实际温度调整自溶处理时间。

### 2.3 酸的浓度和处理时间对脱钙的影响

取6份自溶后的样品, 分别于浓度6%、7%、8%、9%、10%和11%的HCl中, 室温放置3 h, 洗涤过滤, 干燥后测定钙含量, 结果见图3。

再取6份自溶后的样品, 于8%的HCl中, 分别室温放置0 h、1 h、2 h、3 h、4 h和5 h, 洗涤过滤, 干燥后测定钙含量。结果见图4。

由图3可见, 随着HCl浓度的提高, 壳聚糖中含钙量下降, 当HCl浓度为8%时, 含钙为0.9%, 低于标准要求的1%。酸浓度的提高, 利于脱钙, 传统制备工艺

中一般采用10%的HCl, 处理3 h可以达到脱钙的要求。但自溶法制备壳聚糖的生产中, 虾头的自溶处理后, 由于蛋白质被水解, 组织中钙的结合强度下降, 同样的处理时间, HCl的浓度在8%时即可达到与传统法中10% HCl脱钙的效果。

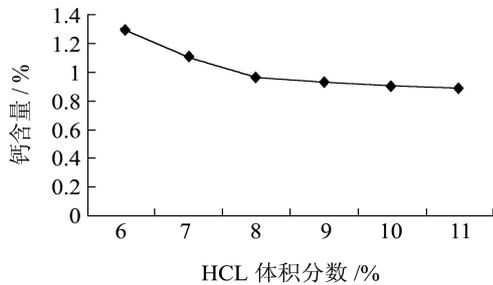


图3 HCl 浓度对脱钙的影响

Fig.3 Effect of HCl concentration on decalcification of the shrimp head chitosan

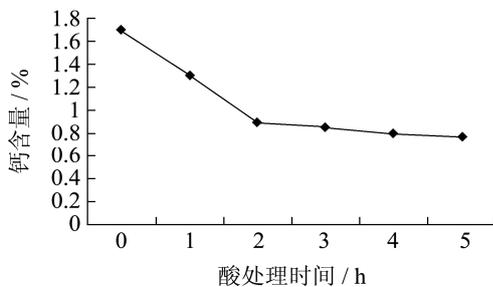


图4 酸处理时间对脱钙的影响

Fig.4 Effect of treatment time with HCl on decalcification of the shrimp head chitosan

由图4可见, 酸处理时间延长, 钙含量下降, 当采用8%的HCl处理3 h以上时, 钙含量低于1%。酸浓度的提高、处理时间延长, 虽然可以提高脱钙的效果, 但加大了对壳聚糖的降解作用, 制备的壳聚糖粘度下降。因此, 确定脱钙的条件为HCl浓度8%, 处理3 h。

2.4 碱浓度、加热时间对脱乙酰和壳聚糖粘度的影响

分别将样品于40%和50%的氢氧化钠中, 130 °C, 处理, 于1 h、2 h、3 h、4 h、5 h和6 h取样, 测定脱乙酰度见图4和粘度见图5。

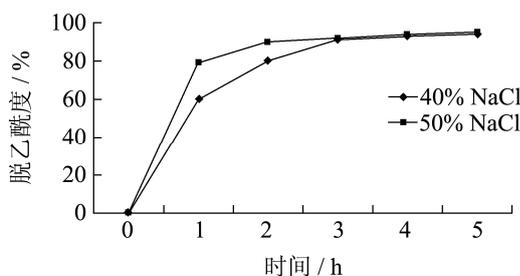


图5 加热时间对脱乙酰度的影响

Fig.5 Effect of time on deacetylation of the shrimp head chitosan

脱乙酰工艺中NaOH的浓度、反应温度和处理时间影响壳聚糖的脱乙酰度和粘度, 传统加工中一般采用50%的NaOH, 130 °C加热3 h, 可以使脱乙酰度达到90%以上。

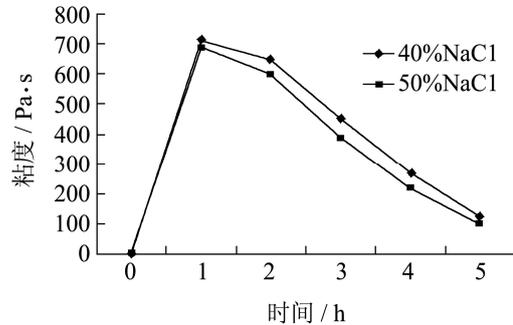


图6 加热时间对壳聚糖粘度的影响

Fig.6 Effect of time on viscosity of the chitosan

由图5可见, 50% NaOH脱乙酰2 h以上时, 壳聚糖的脱乙酰度达到91%, 符合产品标准, 而40% NaOH要在3 h以上时, 脱乙酰度才达到90%以上。又从图6可见, 未脱乙酰的甲壳素在稀酸中难于溶解, 无法测定其粘度。当50% NaOH处理2 h, 壳聚糖粘度为597 cPa·s, 而40% NaOH处理3 h, 壳聚糖粘度显著下降, 达到了450 cPa·s, 因此, 确定脱乙酰的条件为50% NaOH, 在130 °C下处理2 h。

2.5 不同制备壳聚糖方法的比较

分别采用传统法、添加中性蛋白酶水解法和自溶法制备壳聚糖, 测定样品的得率、灰分、水分、脱乙酰度和粘度, 结果见表1。

表1 制备壳聚糖不同方法的比较

Table 1 Compare of different methods for preparation of chitosan

方法	壳聚糖得率/%	钙/%	水分/%	脱乙酰度/%	粘度/cPa.s
传统方法	2.09	0.97	9.88	90.2	486
加中性酶	2.37	0.96	9.89	90.86	510
自溶	2.38	0.99	9.86	91.02	597

从表1可见, 自溶法制备的壳聚糖在产品得率、脱乙酰度和粘度指标都优于传统法和酶解法, 灰分、水分含量都符合壳聚糖产品标准。

传统制备壳聚糖的方法, 经原料成本核算, 每吨壳聚糖需耗氢氧化钠0.416吨, 增加成本约 2400×0.416 = 997.71 元。

采用酶制剂替代强碱脱除蛋白, 反应条件温和, 产品得率提高。按照水解用酶量为 1000 U/g 计, 每吨壳聚糖需耗中性蛋白酶约 2110 元。

自溶法脱蛋白时利用虾头中的自溶酶, 工艺上仅

需要紫外照射激活,而不必添加任何试剂和酶,生产成本低,操作简便,效果好,制备的壳聚糖完全达到标准的要求。

### 3 结论

利用虾头中自溶酶脱除蛋白质制备壳聚糖,得率为2.38%,含钙0.99%,水分含量9.86%,脱乙酰度为91.02%,粘度597 cPa·s,符合壳聚糖的质量标准。生产的原料成本比传统工艺降低900多元,比酶解法节约2000多元,不仅降低了对环境的污染,而且能降低能耗,是一种极具发展潜力的壳聚糖制备方法。

### 参考文献

- [1] 章超桦,邓尚贵.虾组织快速自溶技术在海鲜调味料生产上的应用研究[J].食品与发酵工业,2000,26(2):36-39
- [2] 刘芳,叶克难.虾壳综合加工工艺的研究[J].现代食品科技,2007,23(9):53-54

- [3] 张雪,王雪涛.虾壳制备甲壳素工艺研究[J].粮油食品科技,2007,15(4):36-38
- [4] Asbjom G. Even S. A new process for advanced utilization of shrimp waste[J].Process Biochemistry, 2001, 36: 809-812.
- [5] 章超桦,邓尚贵,洪鹏志.额新对虾的快速自溶技术[J].水产学报,1999,23(4):387-391
- [6] 章超桦,邓尚贵,杨丽明,等.紫外线和温度对虾快速自溶的影响-水产品快速自溶影响因素探讨之一[J].湛江水产学院学报,1994,14(2):51-56
- [7] 朱志伟,曾庆孝,林奕封,等.虾头的内源蛋白酶酶解及复合酶解研究[J].武汉工业学院学报,2003,22(2):4-7
- [8] 李建武,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994
- [9] 王红昌,孙晓飞.不同分子量高脱乙酰度壳聚糖的制备及表征[J].中国海洋药物杂志,2007,26(1):16-19
- [10] 赵惠明,吴建一.甲壳素脱乙酰化研究[J].纺织学报,2007,28(9):19-22

(上接第695页)

由正交试验表4可知,影响饮料风味的主要因素的大小顺序依次为:A>B>C。考虑到节省柠檬酸用量,选C1,最优水平为A2B2C1,即糖液3.5%,蜂蜜3.5%,柠檬酸0.05%。

### 5 产品质量指标

沙枣饮料质量指标符合 GB10789-1996。

#### 5.1 感官指标

色泽:橙红色,鲜亮,色泽均匀一致。

气味与滋味:酸甜爽口,具有沙枣独特风味,口味圆润。

体态:组织形态均匀稳定,无悬浮物、浑浊物、沉淀物,口感细腻。

#### 5.2 理化指标

可溶性固形物含量 $\geq 12.6\%$ ,酸度(以柠檬酸计)0.07 g/100 mL。

#### 5.3 微生物指标

细菌总数(个/100 mL) $\leq 50$ ;大肠菌群(个/100 mL)不得检出,致病菌不得检出。

### 6 结论

6.1 沙枣果汁胶酶解浸提的最佳工艺参数:加入0.7%的果胶酶,调节pH为4.5,在50℃下酶解8h。

6.2 沙枣汁调配的最佳参数:在沙枣汁中按糖液3.5%,蜂蜜3.5%,柠檬酸0.05%的比例加入,沙枣汁饮料色泽明亮,枣香浓郁,酸甜适口。

### 参考文献

- [1] 黄俊华,买买提江,杨昌友,等.沙枣(*Elaeagnus angustifolia* L.)研究现状与展望[J].中国野生植物资源,2005,24(3):26-28
- [2] 姬华,李应彪,翟金兰,等.沙枣食品的开发与利用[J].中国果菜,2006,(4):45-46
- [3] 徐德树.沙枣系列产品工业化生产技术[J].食品科学,1992,(8):34-39
- [4] 常兆丰,屠震栋.沙枣资源开发研究综述[J].林业科技开发,1993,(2):39-40
- [5] 无锡轻工业学院,天津轻工业学院合编.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994
- [6] 韩玉杰,李志溪,杜双奎.红枣酶解法提汁工艺研究[J].食品科学,2003,24(4):85-87
- [7] 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,2004,330-350