

# 蛋白酶对甲壳素制备的影响及不同甲壳素的性质比较

段杉<sup>1</sup>, 李婷<sup>1</sup>, 毛颖超<sup>1</sup>, 肖寅金<sup>2</sup>, 王香君<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 汕头市侨丰集团有限公司, 广东汕头 515133)

**摘要:** 本文研究了发酵法和乙酸结合酸性蛋白酶(酶法)提取甲壳素过程中蛋白酶活力对灰分脱除的影响, 并进一步比较了酶法、发酵法和化学法提取的甲壳素的性质差别。研究表明: 蛋白酶可促进甲壳素中灰分的脱除。酶法和发酵法甲壳素各项指标均很接近, 但与化学法甲壳素有一定差异。其中, 酶法和发酵法甲壳素中蛋白质含量分别为 5.80% 和 5.91%、灰分含量分别为 1.08% 和 1.02%、结晶度分别为 85.8% 和 86.4% 及溶液黏度分别为 57 mPa·s 和 59 mPa·s 均明显高于化学法甲壳素, 而化学法甲壳素中蛋白质含量为 1.24%, 灰分含量为 0.23%, 结晶度为 79.8% 及溶液黏度为 48 mPa·s; 而前二种甲壳素的脱乙酰度低于化学法提取的甲壳素。以上说明酶法和发酵法对甲壳素分子的降解和脱乙酰作用以及结晶结构的破坏均较小。

**关键词:** 甲壳素; 蛋白酶; 酶法; 发酵法; 结晶度; 脱乙酰度; 粘度

文章编号: 1673-9078(2014)11-119-124

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.022

## Influence of Protease Activity on the Preparation of Chitin and Comparison of the Properties of Different Chitins

DUAN Shan<sup>1</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, MAO Ying-chao<sup>1</sup>, XIAO Yin-jin<sup>2</sup>, WANG Xiang-jun<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Qiao Feng Group Corporation Ltd., Shantou 515133, China)

**Abstract:** In this study, the influence of protease activity on the removal of ash during chitin extraction by acetic acid in combination with protease (enzymatic method) and fermentation methods was investigated. The characteristics of the chitins extracted by chemical, enzymatic, and fermentation methods were further compared. The results indicated that protease activity could facilitate the removal of ash. The chitins extracted using the enzymatic and fermentation methods were very similar in all indices but showed obvious difference from the chitin extracted by the chemical method. The protein content, ash content, degree of crystallinity, and solution viscosity of the chemically extracted chitin were 1.24%, 0.23%, 79.8%, and 48 mPa·s, respectively. In contrast, the corresponding data for the chitins obtained using enzymatic and fermentation methods were 5.80% and 5.91%, 1.08% and 1.02%, 85.8% and 86.4%, and 57 and 59 mPa·s, respectively. The parameters for the enzymatic and fermentation methods were obviously higher than those of the chemically extracted chitin. However, the deacetylation degree of the chemically extracted chitin was higher than that of the other two types of chitin. These facts indicate that the enzymatic and fermentation processes cause less degradation, deacetylation, and damage to crystallinity of chitin molecules than the chemical process.

**Key words:** chitin; protease; enzymatic method; fermentation method; crystallinity; degree of deacetylation; viscosity

虾头虾壳中主要含有甲壳素、灰分及蛋白质等。甲壳素的传统生产方法是化学法, 即以盐酸、氢氧化钠交替处理虾头虾壳脱除其中的蛋白质和灰分得到甲壳素; 近年出现了乳酸菌等微生物发酵法和酶法提取甲壳素的技术。化学法工艺简单, 但污染极为严重, 蛋白质等成分无法回收, 且甲壳素降解比较严重; 发酵法和酶法反应条件温和, 避免了污染, 且可以回收

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 广东省海洋与渔业局 2010 年海洋渔业科技推广专项 (A201005103)

作者简介: 段杉 (1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品综合利用; 李婷, 并列第一作者

蛋白质、钙、虾青素等成分。本课题组<sup>[1-2]</sup>曾针对乳酸菌发酵法制备甲壳素的技术进行过系统研究, 筛选到一株嗜酸乳杆菌 SW01, 以该菌发酵虾头虾壳可高效脱除其中的蛋白质和灰分, 获得甲壳素。本课题组在前期研究中发现, 在以乳酸菌发酵时, 虾头虾壳中的蛋白质和灰分的脱除呈现出同步变化的现象, 因此曾推测蛋白质的脱除有利于灰分的脱除, 发酵体系中的蛋白酶在脱除蛋白质的同时, 也促进了灰分的脱除<sup>[2]</sup>, 本论文对此推测进行了验证研究。由于提取方法的不同, 得到的甲壳素的性质可能有一些区别。对于化学法提取的甲壳素的性质已经研究得很充分, 但对于酶法和发酵法提取的甲壳素性质的研究还相对较少, 尤

其是关于不同提取的甲壳素的性质差异方面的研究就更少, 目前国际上仅见少量报道涉及上述问题。M.Susana Cortizo<sup>[3]</sup>, Rodrigo L Lavall<sup>[4]</sup>等用化学法从鱿鱼骨中提取 $\beta$ 甲壳素, 并对 $\beta$ 甲壳素的性质作了比较详细的研究。Sureerat Phuvasate<sup>[5]</sup>, Woo-Jin Jung<sup>[6]</sup>等比较了乳酸菌发酵法和化学法得到的甲壳素中蛋白质和灰分的含量, 没有比较所得甲壳素的粘度、脱乙酰度、分子量及结晶度。Neith Pacheco<sup>[7]</sup>等比较了化学法和乳酸菌发酵法得到的甲壳素的蛋白质和灰分的含量, 分子量及结晶度, 没有比较粘度及脱乙酰度。因此本文从蛋白质和灰分残留量、溶液粘度、脱乙酰度及结晶度等方面对化学法、发酵法以及酶法提取的甲壳素进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

汕头市侨丰集团有限公司提供的南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*, 即凡纳对虾)的虾头虾壳, 经塑料袋密封包装后存放在温度为-20℃的冰箱内储藏。

### 1.2 试剂及仪器设备

酸性蛋白酶, SUKAPro AC, 由米曲霉发酵产生, 由苏柯汉(潍坊)生物工程有限公司专业生产的, 酶制剂, 100000 U/g; 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* SW01), 本实验室从虾头虾壳中筛选; 盐酸, 氢氧化钠, N-甲基-2-吡咯烷酮, N,N-二甲基乙酰胺, 氯化锂、吐温 80、葡萄糖、冰乙酸、七水硫酸镁、硫酸锰、乙酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸二铵, 均为 AR; 蛋白胨、牛肉膏、酵母膏, 均为生化试剂。

凯氏定氮仪, Foss 公司; 粘度计, SNB-1; 傅里叶红外光谱仪, BRUKER Vector 22; X 衍射仪, Philips SEM 505

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 发酵法提取甲壳素中蛋白酶活力对灰分含量的影响研究

将虾头虾壳置于 45℃水浴中 3 h, 令其自溶, 离心后分离上清液和残渣, 上清液即为自溶液, 此时自溶液中只含有虾头虾壳内源性蛋白酶, 以自溶液配制下列(1)~(6)液体; 残渣煮沸 5 min, 以钝化所有的酶, 洗净晾干备用。

(1) 取 100 mL 分离出的自溶液, 加入 5% 葡萄糖(m/m), 并添加 50  $\mu$ L 10% 的青霉素(体系中的青

霉素的浓度为 50  $\mu$ g/mL), 此时体系内只含有虾头虾壳内源性蛋白酶, 测定酸度。

(2) 另取 100 mL 分离出的自溶液, 加入 5% 葡萄糖(m/m), 接种 10% 嗜酸乳杆菌 SW01 在 40℃条件下发酵 48 h, 添加 50  $\mu$ L 10% 的青霉素, 发酵液备用, 此时发酵液中含有虾头虾壳内源性蛋白酶和 SW01 蛋白酶, 测定酸度。

(3) 再取 100 mL 分离出的自溶液将其灭菌后, 加入 5% 葡萄糖, 接种 10% 嗜酸乳杆菌 SW01 在 40℃条件下发酵 48 h, 添加 50  $\mu$ L 10% 的青霉素, 发酵液备用, 此时发酵液中只含有 SW01 蛋白酶, 测定酸度。调整(1)、(2)、(3)的葡萄糖和乳酸量相同。

(4) 未加青霉素的(1) 100℃灭酶 5 min, 然后加入抗生素, 备用(已无蛋白酶)。

(5) 未加青霉素的(2) 100℃灭酶 5 min, 然后加入抗生素, 备用(已无蛋白酶)。

(6) 未加青霉素的(3) 100℃灭酶 5 min, 然后加入抗生素, 备用(已无蛋白酶)。

分别取 20 mL 上述(1)~(6)液体, 与 1 g 上述残渣混合, 并模拟嗜酸乳杆菌 SW01 发酵虾头虾壳时酸度随时间的变化水平<sup>[2]</sup>, 并分别于 0、12、24、36、48 h 用乳酸将各反应体系的酸度调至 0.98、19.64、44.63、33.52、46.54 mmol/100 mL, 各体系加入乳酸的时间和体积完全一致。然后于反应的 0、2、4、8、12、24、48 h 取样测定残渣中的灰分含量。

#### 1.3.2 酶法制备甲壳素中灰分含量和蛋白质含量相关性分析

虾头虾壳解冻后, 45℃摇床自溶 3 h。然后用纱布过滤, 滤渣用蒸馏水清洗干净后, 烘干备用。称取烘干的虾头虾壳, 先加入 20% 的乙酸溶液, 当反应至无气泡产生时, 先调节 pH 至 3.0 左右, 再加入 SUKA 酸性蛋白酶, 调节 pH 至 3.5, 然后 45℃水浴中反应 48 h, 期间定时调节 pH 维持在 3.5, 取出后用蒸馏水清洗滤渣, 直至洗涤液无色中性, 即得甲壳素。以甲壳素中灰分含量为横坐标, 蛋白质含量为纵

坐标, 画出蛋白质含量关于灰分含量的函数图像, 根据函数图像, 判断二者是否具有相关性。

#### 1.3.3 化学法制备甲壳素

虾头虾壳解冻后用 5% 盐酸室温下反应 1 h, 纱布过滤洗净后, 加入 4% 氢氧化钠 90℃水浴 1 h, 过滤洗净后再加入 5% 盐酸室温下反应 0.5 h, 过滤洗净后再加入 4% 氢氧化钠 90℃水浴 0.5 h, 过滤洗净后加入 1% 高锰酸钾 50℃脱色 75 min, 过滤洗净后加入 1% 草酸还原 30 min, 洗净干燥后即得甲壳素, 反应过程料液比均为 1:5。

### 1.3.4 发酵法制备甲壳素的工艺

按照文献<sup>[1]</sup>的条件制备甲壳素,即取 100  $\mu\text{L}$  的菌悬液接入含有 8 mL MRS 液体培养基的试管中, 37  $^{\circ}\text{C}$  下活化 16~18 h, 观察有浑浊或试管底部有沉淀即生长良好。再取 1 mL 活化后的菌悬液接种到 100 mL MRS 液体培养基中于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h。发酵时称取 100 g 解冻后的虾头虾壳, 加入 10% 的菌种, 15% 的葡萄糖, 固液比为 1:0.5, 初始 pH 7.0, 于 40  $^{\circ}\text{C}$  发酵 72 h, 按 1.3.3 方法脱色后, 洗净烘干即得甲壳素。

### 1.3.5 酶法制备甲壳素的工艺

虾头虾壳解冻后, 45  $^{\circ}\text{C}$  摇床自溶 3 h。然后用纱布过滤, 滤渣用蒸馏水清洗干净后, 烘干备用。称取烘干的虾头虾壳, 先加入 20% 的乙酸溶液, 当反应至无气泡产生时, 先调节 pH 至 3.0 左右, 再加入酸性蛋白酶, 调节 pH 至 3.5, 然后 45  $^{\circ}\text{C}$  水浴中反应 48 h, 期间定时调节 pH 维持在 3.5, 取出后用蒸馏水清洗滤渣, 直至洗涤液无色中性。按 1.3.3 方法脱色后, 洗净烘干即得甲壳素。

### 1.3.6 甲壳素中灰分含量的测定

采用灼烧称量法测量甲壳素中的灰分(参考 GB/T 5009.4-2010)。

### 1.3.7 甲壳素中蛋白质含量的测定

称取 1 g 左右干燥的虾头虾壳, 加入 30 mL 4% 的 NaOH 溶液, 加盖保鲜膜, 于 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 60 min, 取出后过滤, 保留滤液。重复上述操作一次, 合并二次的滤液, 定容至 100 mL<sup>[8]</sup>, 然后以凯氏定氮法测定蛋白质浓度(按 GB/T 5009.5-2010)。

### 1.3.8 甲壳素溶液粘度的测量

(1) 酰胺体系中<sup>[9]</sup>: 取 5 g 氯化锂溶解到适量 N-甲基吡咯烷酮和 N-N 二甲基乙酰胺中, 然后各自定容到 100 mL, 称取 1 g 甲壳素溶解到这两种体系中, 在常温下搅拌 48 h, 然后离心去掉不溶的甲壳素, 干燥后称重, 把溶液的浓度稀释到 0.1%, 用粘度计测粘度。剪切速率为 50 m/s, 21 # 转子。

(2) 氢氧化钠/尿素/水体系: 称取 8 g 氢氧化钠, 4 g 尿素溶解到适量水中, 然后定容到 100 mL, 称取 1 g 甲壳素溶解到该体系中, 在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻 4 h, 然后解冻, 如此反复 3 次, 然后离心去掉不溶的甲壳素, 干燥后称重, 把溶液的浓度稀释到 0.1%, 测量条件同上。

### 1.3.9 甲壳素结晶度的测量

X 射线衍射法(XRD), 采用 CuK $\alpha$  射线, 在 40 kV、30 mA 条件及衍射角  $2\theta=10^{\circ}\sim 60^{\circ}$  测定甲壳素的衍射谱图, 本文根据 Neith Pacheco 等<sup>[7]</sup>的方法, 选择甲壳素最强吸收峰(110)晶面结晶指数及结晶度, 来判断不同

方法得到的甲壳素的结晶度的大小, 计算公式如下:

$$I_{CR} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100$$

$$D_{ap[110]} = \frac{K\lambda}{\beta_0 \times \cos\theta}$$

注:  $I_{CR}$ -甲壳素在(110)晶面的结晶度;  $D_{ap}$ -甲壳素在(110)晶面的结晶尺寸;  $I_{110-2\theta}$  为  $20^{\circ}$  左右最强衍射峰的强度;  $I_{am-2\theta}$  为  $16^{\circ}$  处无定形漫散射峰的强度;  $\beta_0$ -在结晶峰最大值处的半峰宽;  $\theta$ -与结晶峰对映的布拉格角的一半;  $\lambda$ -辐射波长;  $K$ -常数, 0.9

### 1.3.10 甲壳素脱乙酰度的测量

傅里叶红外光谱法(FT-IR), 采用溴化钾压片法。把甲壳素粉末和溴化钾粉末置于玛瑙研钵中, 研成极细的粉末, 然后用模具压成透明的片状, 再进行红外吸收光谱测定。测定范围是  $500\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。

## 1.4 数据分析

所有测定均重复三次, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。平均测定的平均值及标准偏差分别通过 Microsoft Excel 2007 中的 AVERAGE 及 STDEV.S 函数计算。组间数据采用 Levene test 检测方差齐性, 若方差齐, 则后续采用 Duncan 方法比较组间差异。所有统计分析均采用 SPSS 16.0 统计软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 完成,  $p < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵法提取甲壳素过程中蛋白酶活力对

灰分含量的影响

本课题组曾筛选到一株嗜酸乳杆菌 SW01 用于发酵虾头虾壳提取甲壳素<sup>[1]</sup>, 该菌不仅产酸快, 而且具有较高的蛋白酶活力, 以 SW01 发酵虾头虾壳可有效脱除灰分和蛋白质获得甲壳素。在甲壳类动物的外壳中, 灰分和蛋白质等成分交织在一起; 在以 SW01 发酵虾头虾壳时, 也曾发现灰分和蛋白质的脱除呈现同步变化的趋势, 因此, 笔者曾推测较高的蛋白酶活力将使蛋白质更易于脱除, 从而使灰分更多地暴露出来, 进而被发酵产生的乳酸溶解脱除<sup>[2]</sup> (蛋白质、矿物质和甲壳素三者是交织在一起的, 脱除蛋白质的同时, 破坏了彼此之间的作用力, 从而有利于灰分的脱除)。本文进一步以实验验证这一推断, 实验结果如图 1 所示。由图 1 可知, 灭酶的 3 个样品中灰分含量始终基本一致, 且一直高于含有蛋白酶的 3 个样品; 2 号样品中即含有虾头内源蛋白酶又含有嗜酸乳杆菌 SW01 的蛋

白酶，其灰分含量始终最低；1号和3号样品中分别只含有虾头内源蛋白酶和SWO1的蛋白酶，其灰分含量始终处于中间。方差分析表明，除了灭酶的3个样品外，其他各样品的灰分含量均存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。上述现象说明，虽然各样品的酸度一直保持一致，但蛋白酶活力差别也会影响到甲壳素中灰分的脱除，蛋白酶活力高有利于灰分脱除。以乙酸代替乳酸，并添加酸性蛋白酶处理虾头虾壳，也发现了同样的现象，即添加酸性蛋白酶不仅提高了蛋白质的脱除率，而且也提高了灰分的脱除效果<sup>[9]</sup>，结果如图2、3所示。

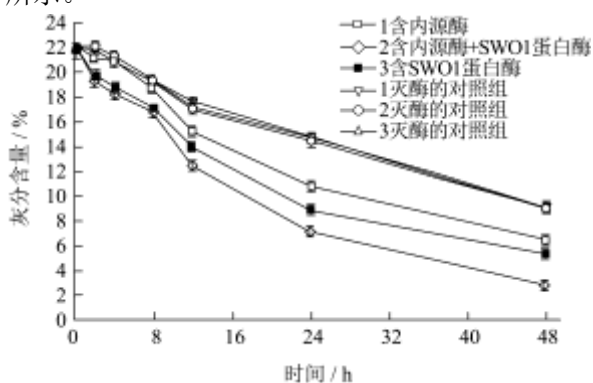


图1 蛋白酶活力对灰分含量的影响

Fig.1 The influence of protease activity on ash content

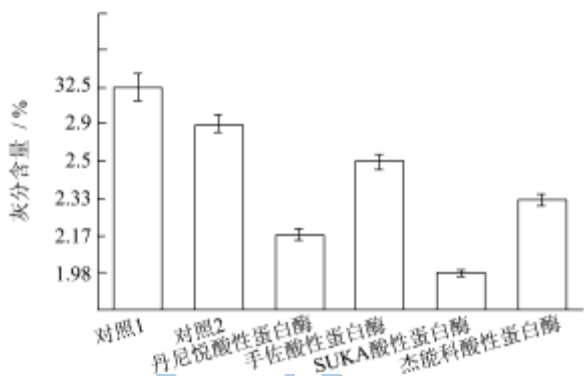


图2 经乙酸及四种酸性蛋白酶共同处理后甲壳素中灰分的含量<sup>[9]</sup>

Fig.2 The ash contents of chitins treated by acetic acid with four different acidic proteases<sup>[9]</sup>

进一步对虾头虾壳中蛋白质含量和灰分含量进行相关性分析，结果如图4所示。从图4的统计结果可以看出，蛋白质含量表现为灰分含量的二次多项式函数，且相关系数  $R^2 = 0.84797$ ，模型显著，即灰分含量和蛋白质含量表现为抛物线相关，说明脱除蛋白质的同时有利于灰分的脱除。

上述实验结果验证了笔者前面的推断，同时也提示以有机酸和蛋白酶处理虾头虾壳应该可以达到与乳酸菌发酵类似的效果。

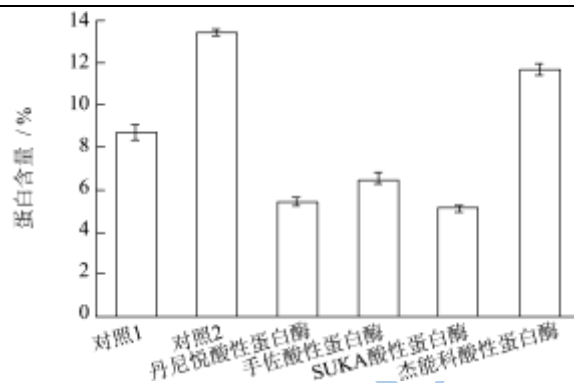


图3 经乙酸及四种酸性蛋白酶共同处理后甲壳素中蛋白质的含量<sup>[9]</sup>

Fig.3 The protein contents of chitins treated by acetic acid and four different acidic proteases<sup>[9]</sup>

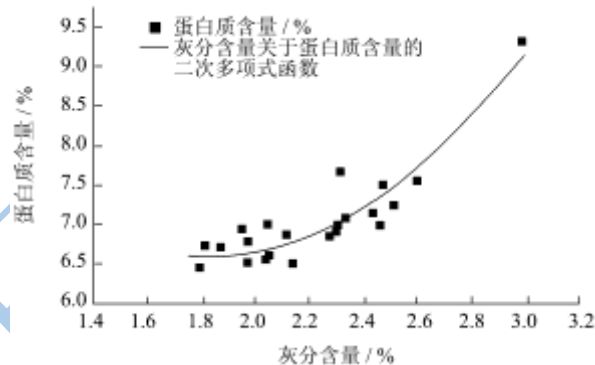


图4 甲壳素中灰分含量与蛋白质含量的相关性分析<sup>[9]</sup>

Fig.4 The correlation between ash content and protein content<sup>[9]</sup>

### 2.3 不同甲壳素的性质比较

本文论述研究表明，以乙酸结合酸性蛋白酶处理虾头虾壳同样可以获得甲壳素，但以这种方法获得的甲壳素与化学法和乳酸菌发酵法获得的甲壳素之间是否存在质量或性能方面的差异？本文对这三种甲壳素进行了详细比较研究。

由表1可以看出，制备方法不同，得到的甲壳素中蛋白质和灰分含量也有差别。化学法得到的甲壳素中蛋白质和灰分含量分别为1.24%和0.23%，明显低于酶法和发酵法提取的甲壳素（其中蛋白质含量分别为5.8%、5.91%，灰分含量分别为1.08%、1.02%），且差异显著 ( $p < 0.05$ )。而酶法和发酵法制备的甲壳素中蛋白质和灰分含量差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

化学法是在强酸强碱的交替作用下进行的，酸碱的浸泡能使甲壳素表面晶体结构溶胀，甲壳素微纤维强度降低，有利于酸碱进入甲壳素分子内部，从而有利于蛋白质和灰分的脱除<sup>[10-11]</sup>。酶法提取甲壳素的过程中，在酸性蛋白酶的作用下，大部分蛋白质被分解，

在 20% 乙酸中浸泡 48 h 后, 不仅能脱除大部分灰分, 而且能使甲壳素的角质层软化, 有利于酶分子进入甲壳素分子内部, 脱除剩余蛋白质。发酵法则是利用 *Lactobacillus acidophilus* SW01 在发酵过程中产生大量的乳酸和一些蛋白酶并结合虾头中内源性蛋白酶的作用, 脱除蛋白质和灰分。该过程产生的大量乳酸不仅有利于灰分的脱除, 而且可以使甲壳素的角质层软化, 有利于酶分子的进入。酶法和发酵法都是利用有机酸结合蛋白酶的作用提取甲壳素, 与化学法相比, 反应条件较温和, 所以蛋白质和灰分的脱除效果比化学法差, 所得甲壳素中蛋白质和灰分含量高于化学法。

表 1 不同方法提取的甲壳素中蛋白质和灰分含量

Table 1 The protein and ash contents of chitins extracted by different methods

成分	化学法	酶法	发酵法
灰分/%	0.23±0.02	1.08±0.01	1.02±0.03
蛋白质/%	1.24±0.05	5.8±0.05	5.91±0.06

### 2.4 不同甲壳素的溶液粘度比较

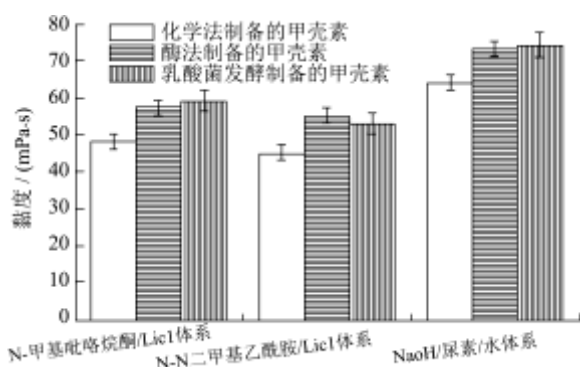


图5 不同方法提取的甲壳素在三种溶剂中的粘度

Fig.5 The solution viscosities of chitins extracted by different methods

从图5可以看出, 化学法得到的甲壳素的溶液粘度小于酶法和发酵法的, 且差异显著 ( $p < 0.05$ ), 而酶法和发酵法得到的甲壳素的粘度相似 ( $p > 0.05$ )。化学法制备甲壳素的过程中, 经过强酸强碱的浸泡后, 甲壳素的表面晶体结构溶胀, 酸碱分子可以进入甲壳素分子内部, 盐酸对糖苷键的水解作用较强, 导致甲壳素分子的主链发生部分降解, 使甲壳素的分子质量减小, 粘度降低; 而酶法和发酵法的处理条件相对于温和, 乙酸和乳酸对甲壳素主链结构的影响小于盐酸, 所以酶法和发酵法得到的甲壳素的粘度高于化学法。

### 2.5 不同甲壳素的脱乙酰度比较

在甲壳素的红外光谱中,  $3485\text{ cm}^{-1}$  左右是 O-H 的伸缩振动吸收峰,  $3263\text{ cm}^{-1}$  左右是 N-H 的伸缩振动吸

收峰, 这两个吸收峰的强度受氢键的影响比较大。 $1659\text{ cm}^{-1}$  左右是酰胺 I 谱带 (C=O) 的吸收峰, 酰胺 I 带的吸收峰与甲壳素的晶型有关。 $1557\text{ cm}^{-1}$  左右是酰胺 II 谱带, 在酰胺 II 的吸收峰随着脱乙酰度的增加逐渐减弱, 因此酰胺 II 的吸收峰与甲壳素的脱乙酰度紧密相连<sup>[12]</sup>。

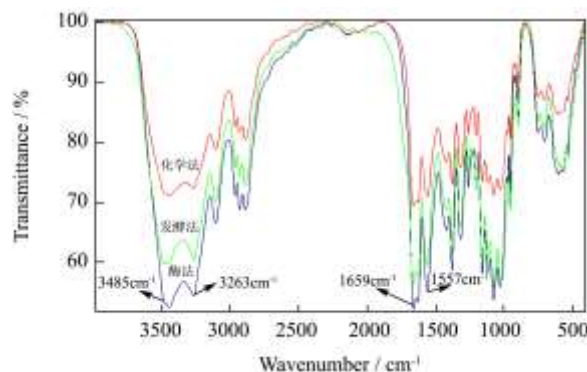


图6 不同方法提取的甲壳素的脱乙酰度

Fig.6 The degree of deacetylation of chitins extracted by different methods

从图 6 可以看出, 本文制备的 3 种甲壳素在  $1557\text{ cm}^{-1}$  处均有吸收峰, 但化学法制备的甲壳素的峰强度低于酶法和发酵法制备的甲壳素, 由于随着脱乙酰度的增加, 甲壳素在  $1557\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰逐渐减弱, 说明化学法制备的甲壳素的脱乙酰度高于酶法和发酵法制备的甲壳素。同时化学法制备的甲壳素在  $3485\text{ cm}^{-1}$  处 O-H 和  $3263\text{ cm}^{-1}$  处 N-H 的伸缩振动吸收峰的强度低于酶法和发酵法制备的甲壳素, 说明化学法在提取过程中, 甲壳素分子间氢键破坏较严重, 分子间氢键作用力减弱, 吸收峰强度减弱, 这使得氢氧化钠更容易接触并脱除甲壳素分子上的乙酰基, 所以得到的甲壳素的脱乙酰度高于酶法和发酵法。但是酶法和发酵法制备的甲壳素在  $1557\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰强度相差不大, 得到的甲壳素可能具有相接近的脱乙酰度。

### 2.6 不同甲壳素的结晶度比较

从图 7 可以得出, 化学法、酶法和发酵法得到的甲壳素在 (110) 晶面都有很强的衍射峰, 但是酶法和发酵法得到的甲壳素在 (110) 晶面的峰强度大于化学法制备的甲壳素, 且二者强度相当。由表 2 的计算结果可知, 化学法得到的甲壳素在 (110) 晶面的结晶度和酶法及发酵法差异显著 ( $p < 0.05$ ), 而酶法和发酵法得到的甲壳素结晶度相似 ( $p > 0.05$ )。化学法在提取甲壳素的过程中, 盐酸和氢氧化钠使甲壳素溶胀, 并进入甲壳素分子内部, 使晶面距离增大, 结晶度降低, 可观察到甲壳素的 X 射线衍射峰强度减弱; 而酶法和发酵法中酶分子不能有效的进入颗粒内部, 致使反应

过程主要集中在甲壳素颗粒表面的无定型区域,无法充分进行反应,所以酶法和发酵法得到的甲壳素在(110)晶面的峰强度大于化学法。

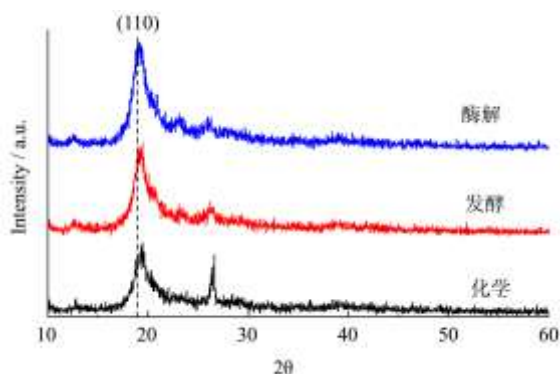


图7 不同方法提取的甲壳素的结晶度

Fig.7 The crystallinities of chitins extracted by different methods

所得数据根据MDI Jade (Jade, 5.0, Materials Data Inc, Japan) 软件处理, 计算结果如表2所示。

表2 甲壳素在特征衍射峰(110)晶面尺寸及结晶度

Table 2 The crystallinity and crystalline size of chitin using diffraction (110)

方法	(110) <sub>2θ</sub>	D <sub>ap</sub> /nm	I <sub>CR</sub> /%
化学法	19.1°	2.57	79.8
酶法	19.2°	2.13	85.8
发酵法	19.24°	2.08	86.4

### 3 结论

3.1 发酵过程中蛋白酶在脱除蛋白质的同时有利于灰分的脱除,且人为地添加酸性蛋白酶和乙酸也有利于蛋白质和灰分的脱除,发酵法和酶法中脱除蛋白质的同时均有利于灰分的脱除,且统计结果表明,脱除灰分和脱除蛋白质之间存在相关性。

3.2 酶法和发酵法得到的甲壳素中蛋白质和灰分含量、溶液的粘度、脱乙酰度及结晶度相似 ( $p>0.05$ ),但与化学法得到的甲壳素有显著差异 ( $p<0.05$ ),说明酶法和发酵法得到的甲壳素性质相似。

### 参考文献

[1] Duan S, Zhang YX, Lu TT, et al. Shrimp waste fermentation using symbiotic lactic acid bacteria [J]. Advanced Materials Research, 2011, 194: 2156-2163

[2] Shan Duan, Li Lei, Liu Shi-ya, et al. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89: 1283-1288

[3] M Susana Cortizo, Carla F Bergho, Jose Luis Alessandrini. Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(5): 10-15

[4] Rodrigo L Lavall, Odilio B G Assis, Sergio P Campaña-Filho.  $\beta$ -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: extraction and characterization [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 2465-2472

[5] Sureerat Phuvasate, Yi-Cheng Su. Comparison of lactic acid bacteria fermentation with acid treatments for chitosan production from shrimp waste [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2010, 19(4): 170-179

[6] Woo-Jin Jung, Gyung-Hyun Jo, Ju-Hee Kuk. Demineralization of crab shells by chemical and biological treatments [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2005, 10(9): 67-72

[7] Neith Pacheco, Monica Garnica-Gonzalez, Miquel Gimeno, et al. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods [J]. Biomacromolecules, 2011, 12: 3285-3290

[8] 姜启兴,夏文水.影响酶法回收蟹虾加工下脚料中虾青素及蛋白质的因素研究[J].食品工业科技,2004,25(4):54-56  
JIANG Qi-xing, XIA Wen-shui. Study on the factors affecting the recovery of astaxanthin and protein from crawfish offal by enzymatic hydrolysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(4): 54-56

[9] 李婷,陈建聪,段杉,等.利用有机酸结合蛋白酶从虾头虾壳中提取甲壳素[J].农产品加工,2014,343(2):1-7  
LI Ting, CHEN Jian-cong, DUAN Shan, et al. Extraction of chitin from shrimp waste with organic acid and protease [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2014, 343(2): 1-7

[10] Y Saito, J-L Putaux, T Okano, et al. Structural aspects of the swelling of a chitin in HCl and its conversion into  $\alpha$  chitin [J]. Macromolecules, 1997, 30: 3867-3873

[11] Yasutomo Noishiki, Hiroko Takami, Yoshiharu Nishiya, et al. Alkali-induced conversion of  $\beta$ -chitin to  $\alpha$ -chitin [J]. Biomacromolecules, 2003, 4: 896-899

[12] Manni Laila, Ghorbel-Bellaaj Olfa, Jellouli Kemel, et al. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from bacillus cereus SV1 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(2): 345-357