

从白星花金龟中提取甲壳素的工艺研究

李小万 王萍莉

(新疆农业职业技术学院生物科技分院, 昌吉, 831100)

摘要 目的:探讨从白星花金龟中提取甲壳素的最佳制备工艺。方法:选取白星花金龟的成虫为原料,采用强酸强碱对成虫粉进行脱除无机盐和蛋白质处理,再脱色后得到甲壳素,用干法灰分法和紫外吸收法分别测定提取物中残余的无机盐和蛋白质。结果:用 1.5 g/L 柠檬酸溶液在室温下按料液比 1:10 浸泡白星花金龟成虫粉 26 h,脱无机盐效果较好;用 10% 氢氧化钠溶液按料液比为 1:10 在 80 ℃ 水浴条件下处理提取物 4.5 h,脱蛋白质的效果较好;用 10% H_2O_2 溶液按料液比为 1:12 在 60 ℃ 水浴浸泡 3 h 脱色,可制得白色粉状甲壳素,得率为 28.3%。结论:该提取工艺简便可行,获得的甲壳素得率高,性状良好,残余蛋白质和灰分含量较低。

关键词 白星花金龟;甲壳素;脱除无机盐;脱除;蛋白质

Study on the Extraction of Chitin from *Protaetia Brevitarsis* Lewis

Li Xiaowan, Wang Pingli

(Xinjiang Agricultural Vocational and Technical College Biological Technology Branch, Changji 831100, China)

Abstract Objective: To study the best preparation process of chitin extraction from *protaetia brevitarsis*, Lewis. **Methods:** The adult larvae of the white star flower are used as raw materials, and the adult powder and protein are removed by strong acids and alkalis. The chitin is obtained after decolorization. The residual inorganic salts and protein in the extract are determined by dry ash method and ultraviolet absorption method. **Results:** 1.5 g/L citric acid solution was used to soak adult *protaetia brevitarsis*, Lewis powder at a ratio of 1:10 at room temperature for 26 h, and the effect of removing inorganic salts was better; 10% NaOH solution was used to the ratio of material to liquid was 1:10, and the extract was processed at 80 ℃ water bath for 4.5 h. The effect of deproteinization was better. The white powdery chitin was obtained by using 10% H_2O_2 solution at a ratio of 1:12 in a water bath at 60 ℃ for 3 h. The yield rate was 28.3%. **Conclusion:** The extraction process is simple and feasible, and the obtained chitin has high yield, good traits and low residual protein and ash content.

Key Words *Protaetia brevitarsis* Lewis; Chitin; Removal of inorganic salts; Removal of protein

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.049

甲壳素又称甲壳质、几丁质,属于氨基多糖,被誉为“人类第六生命要素”,是自然界中一种带正电荷的天然高分子材料,因具有良好的吸湿性、生物降解性、无不良反应以及不污染环境等诸多优良特性,近几年被广泛应用于环保工业、纺织工业、医药保健行业、食品工业、农林业等方面^[1-5]。

甲壳素广泛存在于低等植物菌类、藻类的细胞,节肢动物虾、蟹、蝇蛆和昆虫的外壳,高等植物的细胞壁中^[6]。因来源不同,其甲壳素的含量也不同。据报道:虾壳中含量为 20%~25%,蟹壳中的含量为 15%~18%,昆虫原表皮层中的含量为 25%~60%^[7]等。

目前市场上的甲壳素获得主要是以虾壳和蟹壳为原料来提取制备。以虾蟹为原料,资源成本高,且甲壳素含量低、灰分含量高,提取物中的重金属难以

脱除,同时其生产受到地域性和季节性的限制较大^[8-11],因此,寻找及开发新的甲壳素资源具有重要意义。据报道,白星花金龟虫体中甲壳素含量达 23.3%^[12]。因其作为害虫在农田中分布广泛^[13],比较容易获得,且相关的研究报道较少,故我们以白星花金龟为研究对象,主要研究从其成虫体中提取甲壳素的一种酸碱法的优化工艺,旨在为获取新的甲壳素资源提供参考。

1 材料

1.1 试药 白星花金龟成虫:采自新疆昌吉市周边乡镇;柠檬酸:食品级,郑州中天实验仪器有限公司,生产批号:160508;氢氧化钠:分析纯,上海恒远生物科技有限公司,生产批号:160316;过氧化氢,草酸,高锰酸钾,乙醇,碘-碘化钾,浓硫酸,以上试剂均为分析纯。

基金项目:新疆农业职业技术学院院长基金资助项目(XJNZYKJ2014013)

作者简介:李小万(1978.09—),男,本科,讲师,研究方向:中西药新制剂与新剂型,E-mail:lixw04@sina.com

通信作者:王萍莉(1978.12—),女,博士研究生在读,副教授,研究方向:病虫害防治,E-mail:41186822@qq.com

1.2 仪器 LD-800 型实验室超微粉碎机,长沙常宏制药设备厂;DK-98-I 型恒温水浴锅,泰斯特仪器有限公司;101-2 型电热恒温鼓风干燥箱,北京市永光明医疗仪器厂;SXL-1208 马沸炉,上海精宏干燥箱厂;UV-2450 型紫外分光光度计,日本岛津公司;BS2000S 型电子天平,北京赛多利斯仪器厂等。

2 方法

2.1 工艺流程 白星花金龟成虫→预处理(闷死、清洗、烘干、粉碎)→脱无机盐→水洗至中性→脱蛋白质→水洗至中性→脱色→烘干→甲壳素。

2.2 指标分析检测

2.2.1 定性分析 1)显色反应:取少量提取物倒入小培养皿中,并用镊子将其依次移入含量为 95%、70%、50%、30% 乙醇溶液中清洗,再用蒸馏水冲洗待用;将甲壳素置于自瓷点滴试验板上,加入 1 滴 0.03% 碘-碘化钾溶液,再加 1 滴 1% H_2SO_4 在点滴试样板上,显示紫褐色,再加数滴 75% H_2SO_4 紫色逐渐消失,表明测定物为甲壳素。2) α -萘酚实验:取少量提取物溶于水中,然后再加 98% 浓硫酸,振摇,在糖溶液与浓硫酸两液面间出现了红紫色的环(紫环反应),表明了该提取物为甲壳素^[14]。

2.2.2 定量分析 1)灰分测定:采用干法灰分法,按以下公式计算各实验组的灰分含量,以确定脱除无机盐最佳试验条件;总灰分(%)=(恒重后坩埚和灰分质量-恒重后坩埚质量)/样品质量 $\times 100$ ^[15];2)残余蛋白质含量测定:采用紫外吸收法,采用以下公式计算各实验组的蛋白质含量,以确定脱除蛋白质的最佳试验条件。蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $(1.45A_{280}-0.74A_{260})\times$ 稀释倍数,式中: A_{280} 、 A_{260} 分别为蛋白质溶液在 280 nm、260 nm 处测得的吸光度^[16]。

2.3 预处理

2.3.1 闷死 挑选大小一致的白星花金龟成虫,装入塑料薄膜袋内密封至闷死不动。

2.3.2 清洗 用水反复冲洗至表面无明显污渍,沥干。

2.3.3 烘干 放入恒温鼓风干燥箱中,于 75℃ 烘至白星花金龟虫体硬脆。

2.3.4 粉碎 用小型粉碎机粉碎,过 20 目筛,得白星花金龟虫粉,装袋密封备用。

2.4 脱无机盐

2.4.1 柠檬酸浓度对脱无机盐效果的影响 称取 5 份白星花金龟虫粉,5 g/份,分别置于 100 mL 三角瓶中,按 1:10(g/mL)的固液比分别加入浓度为

0.9、1.2、1.5、1.8、2.1(g/L)柠檬酸溶液,在室温条件下反应 26 h 后,离心并将固体产物水洗至中性,干燥后得脱无机盐的各组样品,分别测定各组样品灰分,以确定柠檬酸的最适浓度。

2.4.2 柠檬酸作用时间对脱无机盐效果的影响

称取 5 份白星花金龟虫粉,5 g/份,分别置于 100 mL 三角瓶中,在柠檬酸浓度 1.5 g/L、固液比 1:10(g/mL)、室温条件下,分别作用 18 h、22 h、26 h、30 h、34 h 后,离心并将固体产物水洗至中性,干燥后得脱无机盐的各组样品,分别测定各组样品灰分,以确定柠檬酸作用的最适时间。

2.4.3 柠檬酸酸浸料液比对脱无机盐效果的影响

称取 5 份白星花金龟虫粉,5 g/份,分别置于 100 mL 三角瓶中,在柠檬酸浓度 1.5 g/L、室温条件下,分别按固液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14(g/mL)加入柠檬酸溶液,反应时间 26 h,离心并将固体产物水洗至中性,干燥得脱无机盐的各组样品,分别测定各组样品灰分,以确定柠檬酸的最适固液比。

2.5 脱蛋白质处理

2.5.1 氢氧化钠浓度对脱蛋白质效果的影响 取脱无机盐最佳条件下所得的滤渣 5 份,分别置于 250 mL 三角瓶中,按固液比 1:10(g/mL),分别加入 6%、8%、10%、12%、14% 氢氧化钠溶液,在 80℃ 水浴锅中作用 5 h,离心并将固体产物水洗至中性,干燥得脱蛋白质的各组样品,分别测定各组样品残余蛋白质含量,以确定氢氧化钠的最适浓度。

2.5.2 氢氧化钠作用时间对脱蛋白质效果的影响

取脱无机盐最佳条件下所得的滤渣 5 份,分别置于 250 mL 三角瓶中,在固液比 1:10(g/mL)、氢氧化钠浓度 10% 的条件下,在 80℃ 水浴锅中分别作用 1 h、3 h、5 h、7 h、9 h,离心并将固体产物水洗至中性,干燥得脱蛋白质的各组样品,分别测定各组样品残余蛋白质含量,以确定氢氧化钠作用的最适时间。

2.5.3 氢氧化钠碱浸温度对脱蛋白质效果的影响

取脱无机盐最佳条件下所得的滤渣 5 份,分别置于 250 mL 三角瓶中,在固液比 1:10(g/mL)、氢氧化钠浓度 10% 条件下,分别置于 60℃、70℃、80℃、90℃、100℃ 水浴锅中,恒温作用 5 h,离心并将固体产物水洗至中性,干燥得脱蛋白质的各组样品,分别测定各组样品残余蛋白质含量,以确定氢氧化钠作用的最适温度。

2.5.4 氢氧化钠碱浸固液比的确定 取脱无机盐最佳条件下所得的滤渣 5 份,分别置于 250 mL 三角瓶中,按固液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14(g/mL)分

别加入 10% 氢氧化钠溶液,在 90 ℃ 水浴锅中恒温作用 5 h,离心并将固体产物水洗至中性,干燥得脱蛋白质的各组样品,分别测定各组样品残余蛋白质含量,以确定氢氧化钠作用的最适固液比。

2.6 脱色处理 取脱无机盐和脱蛋白质最佳条件处理后的样品 3 份,以料液比 1:12 (g/mL),分别加入 3% 高锰酸钾、3% 草酸和 10% H_2O_2 ,在 60 ℃ 水浴浸泡 3 h,水洗,于 110 ℃ 烘箱烘干,观察甲壳素的性状^[17]。

2.7 甲壳素的质量 取白星花金龟成虫按以上的最佳实验条件进行甲壳素提取,并对提取物进行定性和定量分析。

3 结果

3.1 脱无机盐处理

3.1.1 柠檬酸浓度对脱无机盐效果的影响 样品中灰分含量随着柠檬酸浓度的增加,总体呈下降趋势。但当柠檬酸浓度小于 1.5 g/L,曲线下下降较快,当柠檬酸浓度大于 1.5 g/L 时,曲线趋于平缓,所以脱无机盐效果最佳的柠檬酸浓度为 1.5 g/L。见图 1。

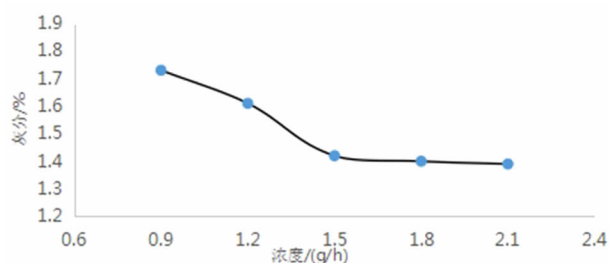


图 1 柠檬酸浓度对脱除无机盐的影响

3.1.2 柠檬酸作用时间对脱除无机盐效果的影响

随着柠檬酸作用时间的延长,灰分含量呈下降趋势,在反应的最初阶段,曲线下下降较快,当反应时间达到 26 h 以后其灰分含量的下降趋势明显减缓。26 h 为脱除无机盐效果最佳的柠檬酸作用时间。见图 2。

响效果不是很大。10% 为脱蛋白质效果最佳的氢氧化钠浓度。见图 4。

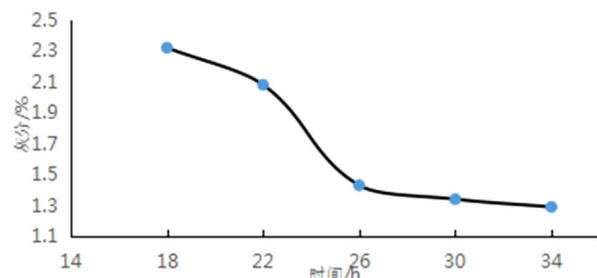


图 2 柠檬酸作用时间对脱除无机盐的影响

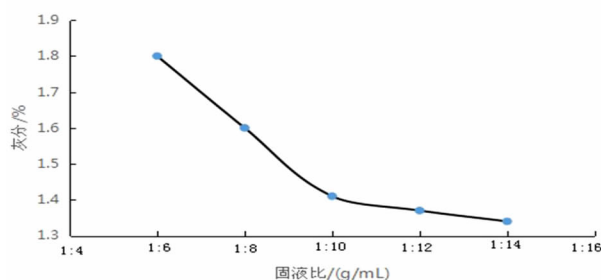


图 3 酸浸料液比对脱除无机盐效果的影响

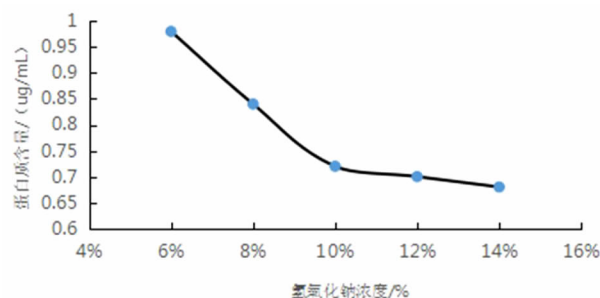


图 4 氢氧化钠碱浸浓度对脱蛋白质的影响

3.2.2 氢氧化钠作用时间对脱蛋白质效果的影响

随着氢氧化钠的作用时间的延长,残余蛋白质含量下降较快,但当氢氧化钠浸泡时间超过 4.5 h 时,曲线趋于平缓,4.5 h 是脱蛋白质效果最佳的氢氧化钠作用时间。见图 5。

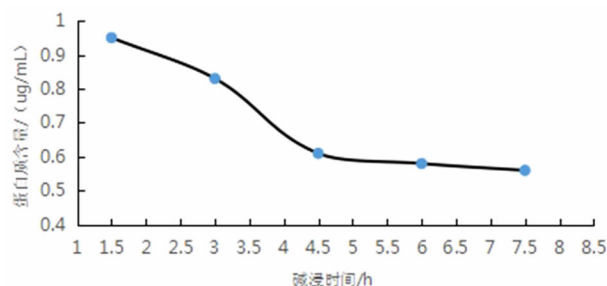


图 5 氢氧化钠碱浸时间对脱蛋白质的影响

3.2.3 氢氧化钠碱浸温度对脱蛋白质效果的影响

氢氧化钠碱煮的温度越高,脱除蛋白效果越明显,但当达到 80 ℃ 以后,残余蛋白质含量下降的趋势减缓。80 ℃ 是脱除蛋白质效果最佳的氢氧化钠

3.2 脱蛋白质处理

3.2.1 氢氧化钠浓度对脱蛋白质效果的影响 当氢氧化钠浓度由 6% 增至 10% 时,残余蛋白质的含量下降较明显,但当氢氧化钠浓度大于 10% 时,残余蛋白质含量下降的趋势平缓,对脱除蛋白质的影

碱煮温度。见图 6。

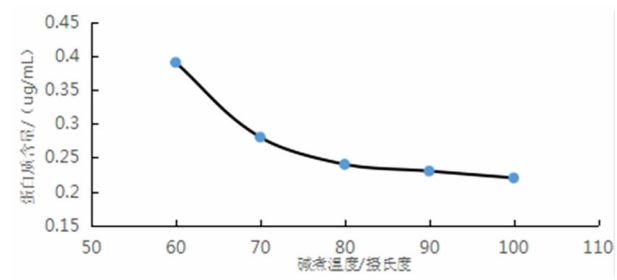


图 6 氢氧化钠碱浸温度对脱蛋白质的影响

3.2.4 氢氧化钠碱浸固液比对脱蛋白质效果的影响 当固液比 1:6 (g/mL) 变至 1:10 (g/mL) 时, 曲线下降较快, 说明脱除蛋白质的效果明显; 但当固液比超过 1:10 (g/mL) 以上时, 曲线平缓, 说明对除蛋白的效果不明显, 因此, 确定 1:10 (g/mL) 为脱除蛋白质的效果最佳的碱浸固液比。见图 7。

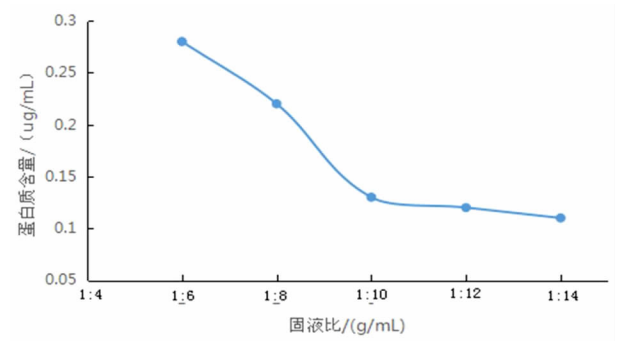


图 7 氢氧化钠碱浸固液比对脱蛋白质的影响

3.3 脱色处理 通过 3 种脱色剂的不同条件处理, 只有 10% 过氧化氢脱色所得的甲壳素颜色最纯, 所以 10% 过氧化氢为最佳脱色剂。见表 1。

表 1 不同脱色剂对甲壳素的脱色结果

序号	脱色剂种类	脱色后甲壳素的性状
1	3% 高锰酸钾	白色稍泛黄色的固体粉末
2	3% 草酸	白色泛灰色的固体粉末
3	10% 过氧化氢	白色固体粉末

表 2 甲壳素的质量分析

原料	提取条件		残余灰分 (%)	残余蛋白质 (μg/mL)	收率 (%)
	脱无机盐	脱蛋白质			
白星花金龟成虫	1.5 g/L 柠檬酸溶液在室温下浸泡 26 h	10% NaOH 溶液在 80 °C 水浴条件下处理 4.5 h	1.25	0.56	28.3

3.4 甲壳素的质量

3.4.1 定性分析结果均呈阳性, 表明所获提取物为甲壳素。

3.4.2 从白星花金龟成虫中获得的甲壳素收率较高, 且残余蛋白质和灰分较低。其中残余灰分为

1.25%, 低于 2%。见表 2。

4 讨论

在借鉴前人研究成果的基础上, 经过预试验筛选, 选择了柠檬酸、氢氧化钠、过氧化氢等试剂对白星花金龟进行脱无机盐、脱蛋白质、脱色处理, 以测定提取物中残余的灰分含量、残余的蛋白质含量、观察甲壳素的性状为质量指标, 最终确定了从白星花金龟成虫中提取甲壳素的最佳工艺条件为: 在白星花金龟虫粉中以 1:10 的料液比, 加入 1.5 g/L 柠檬酸溶液在室温下浸泡 26 h, 进行脱无机盐处理; 再以 1:10 的料液比, 加入 10% NaOH 溶液在 80 °C 水浴条件下处理 4.5 h, 进行脱蛋白质处理; 再以 1:12 的料液比, 加入 10% H₂O₂ 溶液在 60 °C 水浴浸泡 3 h, 水洗, 烘干后得到了白色粉状甲壳素, 得率为 28.3%。可以替代虾蟹壳作为新的甲壳素提取原料。

在本研究的预试验中, 分别以白星花金龟的 4 种不同虫态 (成虫, 幼虫, 蛹, 成虫鞘翅) 作为原料, 经过提取分析后, 发现白星花金龟成虫中的甲壳素得率最高, 其次是成虫鞘翅、再次是蛹、最后是幼虫。这说明甲壳素含量多少与昆虫体壁的角质化程度大小相关。因为甲壳素主要存在于昆虫的体壁的表皮层部分, 所以在提取时应选择体壁中角质化较高且大小均一的白星花金龟作为原料。

甲壳素的定性分析应该用红外光谱法, 但因为试验仪器故障问题, 本试验选用了传统的显色反应来鉴别, 结果的准确性受到一定的影响, 在后续研究中需改进。

灰分含量是衡量甲壳素质量的主要指标之一, 本试验中所获甲壳素中残余灰分虽然降到了 2% 以下, 但只达到了工业级的甲壳素标准^[18], 而未达到食品级的甲壳素标准 (<1%)。原因可能与用柠檬酸代替了盐酸作为除无机盐的试剂有关。

参考文献

[1]王敦,胡景江,刘铭汤.从金龟子中提取壳聚糖的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(4):127-130.

[2]蒋挺大.甲壳素[M].北京:化学工业出版社,2003:1-649.

[3]秦丽芳,刘德明.甲壳素与壳聚糖的应用[J].山西化工,2017,37(5):76-78.

[4]彭靖.甲壳素生物质研究的现状与对策[J].化学工业,2017,35(6):16-18.

[5]李彦艳,张闪闪,任国栋.甲壳动物、昆虫、真菌中甲壳素的提取进展[J].食品研究与开发,2015,36(7):122-126.

[6]郝鲁青,黄国清,肖军霞.从虾头中提取壳聚糖的工艺研究[J].食品研究与开发,2014,35(14):22-24.

[7]索一婷,曲琪环,于娟娟.壳聚糖的提取来源及方法研究[J].吉林农业 C 版,2011(4):343-344.

- [8]王敦,胡景江,刘铭汤.从臭蛭螂中提取甲壳素/壳聚糖的研究[J].林业科学,2004,40(5):180-185.
- [9]张建英,贾龙,张大治,等.从尖尾东螯甲中提取甲壳素的研究[J].食品研究与开发,2016,37(9):66-71.
- [10]张士康,冯立中,支彤彤,等.虾蛄壳中甲壳素的提取工艺探究[J].科技视界,2016(22):173-174.
- [11]张建英,贾龙,杨贵军,等.黑皱鳃金龟甲壳素提取工艺研究[J].环境昆虫学报,2015,37(4):818-826.
- [12]虞以新.变蝗害为美食[J].大自然,1996,4:27-28.
- [13]高峰,任红,马燕燕,等.新疆白星花金龟研究概述[J].农家致富顾问,2015(12):112-114.
- [14]蒋艳忠,蒋琳.蚕蛹甲壳素的提取工艺研究[J].中国食品添加剂,2015(3):88-91.
- [15]中华人民共和国卫生部. GB5009.4-2010 食品安全国家标准食品中灰分的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [16]陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002:166-168.
- [17]陈雪姣,姜启兴,许艳顺,等.南极磷虾甲壳素的脱色工艺研究[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2014,29(3):21-24.
- [18]郭宝华.四种昆虫甲壳素的提取及昆虫壳聚糖和羧甲基壳聚糖的制备[D].北京:中国林业科学研究院,2005.

(2016-10-09 收稿 责任编辑:杨觉雄)

《世界中医药杂志》英文刊 2018 年编委会工作会议将在上海举办

《世界中医药杂志》英文刊第五届编委会工作会议将在 2018 年 8 月 26 日—29 日的“上海中医药与天然药物国际大会”期间召开,本次编委会的编委邀请了来自世界各地的专家学者,以及国内知名专家,会议将围绕《世界中医药杂志》英文刊的工作汇报及近年来的发展进行总结,并讨论各项议题,参会的编委将对杂志的发展提出建设性的意见,同时,此次会议也汇聚了新加入的青年编委,在此次会议上,将举行青年编委的成立仪式并颁发证书,同时进行新一届编委会的换届工作和颁奖工作。

会议地点:上海博雅酒店(上海市浦东新区碧波路 699 号)。

会议主题:本次编委会会议的主题是关于《世界中医药杂志》英文刊的工作汇报及发展,青年编委会的成立,编委的换届及颁奖。

大会介绍:第 11 届上海中医药与天然药物国际大会暨第 66 届国际药用植物和天然产物研究学会(GA)年会(中国·上海,2018 年 8 月 26—29 日)。

本届大会由上海市现代生物与医药产业办公室、中国科学院上海药物研究所主办,上海市生物医药科技产业促进中

心、上海科技会展有限公司承办,国际药用植物和天然产物研究学会协办。

国际药用植物和天然产物研究学会(GA)主要致力于草药的标准化、植物化学、化学毒理学、植物栽培和育种、生物工程学等领域的科学研究,学会聚集了一批在药用植物领域有卓越成就并极富事业心的科学家,并在该领域确认了国际地位。目前已在欧洲、美国、加拿大等国召开了 65 届大会,本届大会也是首次在亚洲召开。

上海中医药与天然药物国际大会自 2008 年以来已成功举办十届,已发展成为中医药与天然药物领域内具有国际影响力的高端专业盛会,有效促进了中医药与天然药物领域的现代化与国际化交流合作,为中医药科技界、企业界代表提供了大量有价值的前沿信息,助推中医药产业继续保持优质、高速、创新发展。

大会拟邀请来自学术界和企业界的杰出代表就大会的主要议题作专题报告,另外,我们也特别期待 Egon-Stahl Awards in Bronze 及 Dr. Willmar Schawbe Award 获奖者带来的精彩演讲。未尽事宜可以关注会议网站(www.ga2018.cn)。