

黑曲霉电解法制备甲壳素的研究

曹 健¹, 代养勇², 李 浪¹, 王中泰¹

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450052

2. 山东农业大学食品学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 本试验以实验室发酵的黑曲霉菌丝体为原料, 采用电解法从中提取甲壳素, 再将甲壳素碱法脱乙酰转化为壳聚糖。通过单因素试验和正交试验分析了电解时间、电压、碱浓度及料液比对壳聚糖的脱乙酰度、得率、粘均分子量等指标的影响, 以此间接反映电解法各因素对甲壳素产品的影响。黑曲霉电解法制备甲壳素的最优条件为: 电解时间 1.25h, NaOH 浓度 3%, 电压 8V, 液料比 12:1。试验证明, 利用电解法从黑曲霉中提取甲壳素实践上是可行的。

关键词: 黑曲霉; 电解; 甲壳素; 壳聚糖

Study on Producing Chitin From *Aspergillus niger* by Electrolysis

CAO Jian¹, DAI Yang-yong², LI Lang¹, WANG Zhong-tai¹

(1. School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China

2. Food College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Chitin was prepared by electrolysis from mycelia through small-scale fermentation of *Aspergillus niger* in this paper, while the obtained chitin was further deacetylated into chitosan by alkaline. Through single-factor experiments and orthogonal experiment, the effects of some factors on the degree of deacetylation, yield and molecular weight of the chitosan product were studied. The optimized conditions for preparing chitin product from *A. niger* mycelia by electrolysis were as follows: time of electrolysis 1.25h, concentration of NaOH 3%, voltage 8V and ratio of solvent to meal 12:1. It is found that preparing chitin from the *A. niger* by electrolysis is practically feasible.

Key words *Aspergillus niger*; electrolysis; chitin; chitosan

中图分类号: TS245.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0186-07

收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 河南省教育厅科技攻关计划项目(2003180058)

作者简介: 曹健(1969-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

70% 乙醇基本上可以将芦笋黄酮完全洗脱下来。

3 结 论

3.1 AB-8 树脂对芦笋黄酮吸附量大, 易解吸, 是一种理想的芦笋黄酮吸附剂, 比较适合于对芦笋黄酮的提取分离。

3.2 当芦笋黄酮初提液 pH6, 吸附流速为 3ml/min 时, AB-8 对芦笋黄酮的吸附量较大。

3.3 当用 200ml 体积分数大于 70% 的乙醇水溶液作为芦

笋黄酮的洗脱剂时, 能将芦笋黄酮基本解吸出来, 洗脱峰集中, 对称性好, 无明显拖尾现象。

参考文献:

- [1] 刘树兴, 齐香君, 庞振, 等. 芦笋中芦丁的提取及其鉴定[J]. 食品工业科技, 2001, 22(4): 39-41.
- [2] 杨红. 中药化学实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] 潘廖明, 姚开, 贾冬英. 大孔树脂吸附大豆异黄酮特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(5): 15-18.
- [4] 冯涛. 竹叶黄酮提取纯化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2003.

甲壳素(Chitin)是1811年由法国科学家发现的,是自然界中存在的唯一碱性同聚多糖,含量仅次于纤维素。甲壳素分子链的强烈的包裹作用和结晶区内强烈的氢键使其化学反应活性很低,溶解性也差,因而大大限制了它的实际应用。壳聚糖(Chitosan)是甲壳素经脱乙酰化处理的产物,具有生物相容性、生物降解性、无毒性、几乎无过敏反应等特点,已在食品、化工、农业、医药、生化、环保等领域广泛应用,被誉为继糖、蛋白质、脂类、维生素、矿物质之后的第六生命要素^[1]。

目前,工业化生产的甲壳素和壳聚糖来自于虾、蟹的外壳,这种生产方式存在不少缺陷^[2~4],同时,由于近年来废弃虾、蟹壳被用作饲料生产原料,造成甲壳素/壳聚糖生产原料短缺。随着人们对甲壳素、壳聚糖及其衍生物应用研究的逐渐深入,对甲壳素和壳聚糖及其制品的需求大幅度增长,因而急需寻找新的甲壳素和壳聚糖资源及其生产方法,以解决原料短缺问题,并减轻现有生产方法对环境造成的污染。人们发现,除广泛存在于昆虫、甲壳纲动物(如虾、蟹)的外壳外,甲壳素还是绝大多数真菌细胞壁的主要组成成分,因而真菌有望成为生产甲壳素和壳聚糖的新资源^[3]。与虾、蟹壳相比,从真菌细胞壁中制取壳聚糖有许多优点,例如,大部分真菌可通过工业发酵技术进行大规模培养,不受原料复杂性、季节性、地域性等限制,产品质量和产量易于控制,生产工艺简单,周期短,动力消耗和环境污染小^[5]。此外更有意义的是利用工业生产过程中产生的富含甲壳素和壳聚糖的废弃菌丝生产壳聚糖,在变废为宝的同时还可减少环境污染,经济效益和社会效益十分明显。

目前从黑曲霉中制备甲壳素广泛采用的方法是:将黑曲霉湿菌体与4%~6%的NaOH溶液混合,在100℃反应6h^[6,7],从而使甲壳素与蛋白质、色素、脂类物质、矿物质间的化学键断裂。1991年,Krepets等^[8]人对经过冻干、粉碎的蟹壳采用了在稀碱反应液中通入一定强度的直流电的方法,得到纯度很高的甲壳素。曹健等^[6]人也对利用电解法从黑曲霉制备甲壳素进行了研究,发现电解法是一种理想且经济的方法,碱浓度只需1%~2%,用碱量极少,耗电量也少,所得产品色泽好、纯度高。但目前对于利用电解法从黑曲霉中提取甲壳素的具体反应条件尚需作进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) 中科院微生物研究所。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 菌种斜面培养基

PDA斜面培养基:称取马铃薯200g,去皮,切块,煮沸半小时后用纱布过滤,加20g葡萄糖,溶化后补足水至1000ml,121℃灭菌20min后制成试管斜面备用。

1.1.2.2 葡萄糖-马铃薯液体培养基

称取马铃薯200g,去皮,切块,煮沸半小时后用纱布过滤,加20g葡萄糖,溶化后补足水至1000ml,然后装入500ml三角瓶中250ml,121℃灭菌20min。

1.1.3 主要试剂

甲壳素 福建莆田中盛伟业有限公司;冰醋酸 开封化学试剂总厂;NaOH 开封化学试剂总厂;HCl 洛阳市化学试剂厂;无水乙醇 洛阳市化学试剂厂;醋酸钠 开封试剂厂;葡萄糖 天津市化学试剂一厂;琼脂 广州化学试剂厂。

以上试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器设备

ZK-82A型真空干燥箱 上海市实验仪器总厂;FA25型实验室高剪切分散乳化机 上海弗鲁克机电设备有限公司;UV-2450型紫外-可见分光光度计 日本岛津;Φ0.55乌氏粘度计 郑州至诚化验设备有限公司;LD5-10低速离心机 北京医用离心机厂;IR-Prestige21傅里叶变换红外光谱仪 日本岛津;THZ-82B气浴恒温振荡器 江苏金坛医疗仪器厂;YMQ-L31·400电热自控压力蒸汽灭菌器 北京将台医疗仪器厂;TDGC型调压变压器 上海亚泰电器有限公司;电解装置 自制。

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉菌丝体的制备

在试管斜面上接种黑曲霉,30℃培养96h后,制成孢子悬液(4×10^8 个/ml)。在500ml三角瓶中装250ml培养液中,接种2ml孢子悬液,200r/min、30℃摇瓶培养84h。

将培养好的菌丝球过滤,水洗,用高剪切分散乳化机20000r/min破碎均质2min,抽滤洗涤3次,留滤饼备用(此时称湿菌体)。称取一定量湿菌体,105℃烘干至衡重,测其水分含量(一般在75%左右)。

1.2.2 电解法制备甲壳素

称取40g湿菌体于电解装置的1000ml烧杯中,加入一定量、一定浓度的NaOH溶液,搅拌混匀后,将反应装置放入20℃水浴中,在一定的电压(直流恒压)下进行电解,同时进行搅拌。电解结束后,3000r/min离心15min得沉淀,再将沉淀离心洗涤至中性。

1.2.3 甲壳素脱乙酰

由于甲壳素品质指标的测定尚无一定的方法,因此将电解产物用碱法脱乙酰后得到壳聚糖,再通过壳聚糖品质(脱乙酰度、粘均分子量、得率)的测定间接反映

电解法制备的甲壳素的品质。

在电解所得的电解产物中加入 300ml 50% 的 NaOH 溶液, 140℃ 油浴中恒温反应 4h, 反应过程中进行搅拌, 反应结束后, 将反应产物离心洗涤至中性。

1.2.4 壳聚糖的精制

1.2.4.1 抽提

将脱乙酰产物转移至 500ml 具塞三角瓶中, 加入 10% 的 HAc 250ml, 在 95℃ 水浴中抽提 3h, 离心; 在沉淀再加 10% 的 HAc 250ml, 95℃ 水浴抽提 3h, 离心。将两次抽提所得上清液混合, 用 NaOH 溶液调 pH 值至 10, 所析出的大量白色沉淀即为精制壳聚糖, 离心 (3000r/min, 15min) 洗涤至中性。

1.2.4.2 干燥

将所得的精制壳聚糖在不高于 60℃ 的温度下真空干燥至恒重。

1.2.5 产品检验

1.2.5.1 壳聚糖得率

壳聚糖得率 (%) = 壳聚糖质量 / 干菌丝体质量 × 100%

1.2.5.2 脱乙酰度的测定 (紫外光谱法)

用乙酰氨基葡萄糖作工作曲线, 得到乙酰基浓度 C 与吸光度 A 的线性关系为: $A = 1.7C$ 。

准确称取 8~10mg 壳聚糖试样于 100ml 容量瓶中, 用 10ml 0.01mol/L 的 HCl 溶液使其完全溶解后定容至刻度, 得浓度为 C_1 的壳聚糖溶液。在 199nm 处, 以 0.001mol/L 的 HCl 作参比测其吸光度 A_1 。从工作曲线得到与吸光度 A_1 相对应的乙酰基浓度 C_2 , 再按下式计算脱乙酰度 DD (式中, C 的单位为 mg/ml): $DD\% = 1 - (C_2/C_1)$ 。

1.2.5.3 粘均分子质量的测定

采用粘度法测定壳聚糖的特性粘度及其分子质量。准确称取 0.2~0.5g (精度 0.005g) 干燥试样于 25ml 容量瓶中, 用 0.2mol/L HAc-0.1mol/L NaAc 溶液完全溶解, 定容后得浓度为 C_1 (g/100ml) 的样品溶液, 用 3# 砂芯漏斗过滤, 取 10ml 滤液于乌氏粘度计中, 在 30℃ 的恒温水浴槽中恒温 10~20min 以上, 用秒表读数 (T_1)。样品均需重复一次, 两次的读数偏差不得超过 0.2s, 然后取两次的平均数。如果两次的读数偏差超过 0.2s, 则需重复多次, 再取平均数。然后精确量取 5ml 溶剂小心加入到粘度计中, 将样品溶液摇匀稀释, 此时的溶液浓度为 C_2 , 用同样的方法测定 T_2 。再依次精确量取溶剂 5ml 和 10ml, 分次加入到粘度计中稀释, 浓度分别为 C_3 和 C_4 , 并分别测定 T_3 和 T_4 。

在测定样品溶液的粘度前, 先按上述方法测定溶剂的粘度 (需溶剂 10ml), 测得的时间为 T_0 。

稀释后溶液的浓度分别为: $C_2 = 2/3 \times C_1$, $C_3 = 1/2 \times C_1$, $C_4 = 1/3 \times C_1$ 。对应于各浓度的相对粘度 $[\eta_r]$ 为:

$$\eta_{r1} = T_1/T_0, \quad \eta_{r2} = T_2/T_0, \quad \eta_{r3} = T_3/T_0, \quad \eta_{r4} = T_4/T_0。$$

增比粘度 $\eta_{sp} = \eta_r - 1$, 比浓粘度为 η_{sp}/C 。依次计算得到 4 个比浓粘度, 并对浓度作图, 可以得到一条直线, 将此直线外推至与纵坐标相交得 A 点, 此截距 (A_0) 即为特性粘度 $[\eta_r]$ 。

依据壳聚糖的脱乙酰度公式, 按下式计算出 0.2mol/L HAc-0.1mol/L NaAc 溶液的 K、a 值^[9]: $a = -1.02 \times 10^{-2} DD + 1.82$, $K = 1.635 \times 10^{-30} DD^{14.0}$, 再依据 Mark-Houwink 方程: $[\eta] = KM^a$, 计算出壳聚糖的粘均分子质量。

1.2.5.4 甲壳素 / 壳聚糖产品的红外光谱分析

甲壳素和壳聚糖的结构差别仅仅是 N-脱乙酰度不同, 不过, 由于甲壳素 / 壳聚糖产品的分子量、脱乙酰度不同, 其红外光谱图既相似又有所不同。甲壳素 / 壳聚糖的红外光谱图特征吸收见表 1。

表 1 甲壳素和壳聚糖典型样品主要谱带的位置及归属^[10]
Table 1 Position and source of main band of typical sample of chitin and chitosan^[10]

吸收频率 (cm ⁻¹)	归属
3427~3443	O—H 伸缩振动
2921~2928	CH ₂ 不对称伸缩振动和 CH ₃ 对称伸缩振动
2863~2880	C—H 伸缩振动
1630~1680	酰胺 I 谱带
1558~1561	酰胺 II 谱带
1411~1430	CH ₂ 弯曲和 CH ₃ 变形振动
1378~1384	CH ₃ 对称变形振动和 CH 弯曲振动
1312~1327	酰胺 III 谱带和 CH ₂ 摇摆
1154~1159	不对称氧桥伸缩振动
1069~1078	C—O 伸缩振动
1028~1030	C—O 伸缩振动
886~899	环伸缩振动

称取 0.5~1.0mg 试样, 在玛瑙研钵中研细后与约 100mg 干燥的 KBr 充分研磨混匀, 用压片机制成薄片, 再将制成的压片在 60℃ 下真空干燥 4h, 置于干燥器中冷却至室温后, 将压片置于红外光谱仪中, 以空气为背景进行扫描 (扫描次数 64 次, 分辨率 4cm⁻¹), 同时记录 4000~400cm⁻¹ 范围内的光谱图。

2 结果与讨论

2.1 电解法制备甲壳素影响因素的研究

2.1.1 电解时间对电解反应的影响

取 4 份湿菌体, 每份 40g, 分别加入 400ml 4% 的 NaOH 溶液, 在 10V 下分别电解 0.5、1、1.5、2h, 所得壳聚糖的各项指标见表 2。

电解反应过程中, 随着电解时间延长, 在电流和 NaOH 作用下, 黑曲霉细胞壁上的不同化合物之间的次级化学键会逐渐断开, 而且蛋白质、脂类等有机物逐渐分解并向正极或负极移动, 那么在溶液中残留下来的

表2 电解时间对所得壳聚糖质量的影响

Table 2 Effect of electrolysis time to quality of chitosan product

电解时间 (h)	颜色	得率 (%)	脱乙酰度 (%)	粘均分子量 ($\times 10^4$)
0.5	浅	18.3	81.4	3.0
1.0	较浅	17.5	81.9	11.8
1.5	一般	16.7	85.2	12.7
2.0	较深	16.2	83.8	13.8

就是甲壳素。电解制备的甲壳素纯度越高,脱乙酰后的壳聚糖的纯度也就越高。

由表2可见,随着电解时间的延长,壳聚糖的颜色逐渐加深。这是由于电解过程中电极上会产生一定的热量,从细胞壁上电解下来的蛋白质等物质吸附于电极,影响电极散热,导致电极温度更为升高,并使电极周围的物质变焦。电解时间越长,变焦的物质越多且颜色越深。在制备壳聚糖的过程中,壳聚糖会吸附这些色素,所以电解时间越长壳聚糖颜色越深。

由表2还可看出,随着电解时间延长,粘均分子量在电解初期上升幅度大,1h后上升减缓,脱乙酰度电解初期呈上升的趋势,1.5h之后又开始下降。可见,适当延长电解时间,有利于甲壳素脱乙酰反应制备高品质的壳聚糖。不过,由于随着处理时间延长,制备的壳聚糖颜色逐渐变深,因此一味延长微波反应时间也不可取。到2h时由于壳聚糖颜色太深,使得测定脱乙酰度时吸光值偏高,这是壳聚糖脱乙酰度又有所下降的一个原因。

在试验中还发现,电解0.5h时所得壳聚糖颜色浅、得率最高,但是在测粘均分子量时有相当多的壳聚糖不能溶解,而且所测壳聚糖分子量非常低。这有两个原因,一是由于电解时间太短,甲壳素与蛋白质、色素、脂类物质、矿物质间大部分化学键的还没有断裂,制得的甲壳素混有其他物质,脱乙酰后得到的壳聚糖纯度也较低,导致测粘度时实际溶解的壳聚糖的浓度比计算时使用浓度值低得多,因此计算所得的壳聚糖粘均分子量太低。也就是说,测粘度时实际溶解的壳聚糖的浓度越接近计算时使用浓度,测得的粘均分子量越接近实际值。另外一种原因是黑曲霉细胞中正在合成中的甲壳素分子链较短,尚未交联到细胞壁中或与细胞壁的结合还不够牢固,电解时极易与其他物质分开。电解时间短时所制备的主要是这部分甲壳素,因而经脱乙酰反应后所得壳聚糖的分子量较低。

从壳聚糖的粘均分子量而逐渐变大来看,说明在液料比为10:1,电压为10V,NaOH浓度为4%的条件下,随着电解时间的延长基本上不会使甲壳素分子断裂。实验中还发现,随着电解时间的延长,制备的壳聚糖再溶性变好。

2.1.2 碱浓度对电解反应的影响

取3份湿菌体,每份40g,分别加入400ml 2%、4%和6%的NaOH溶液,在10V下分别电解1.5h,所得壳聚糖的各项指标见表3。

表3 碱浓度对所得壳聚糖质量的影响

Table 3 Effect of NaOH concentration to quality of chitosan product

碱浓度 (%)	颜色	得率 (%)	脱乙酰度 (%)	粘均分子量 ($\times 10^4$)
2.0	最浅	17.8	95.9	15.0
4.0	一般	14.6	87.5	14.5
6.0	最深	14.2	81.2	7.1

由表3可见,随着碱液浓度增大,壳聚糖的颜色逐渐加深,脱乙酰度、得率和粘均分子量呈下降趋势。当碱液浓度大于4%时,粘均分子量下降比较剧烈,但得率下降减缓。

理论上讲,碱浓度越高,溶液的电阻越小,在相同的电压下电流就越大,黑曲霉细胞壁上的蛋白质等物质越容易与甲壳素分开,而这些物质降解越剧烈,制备的甲壳素越纯,壳聚糖的品质越高。当NaOH溶液浓度增大时,电流增大,反应器电极产生的热量增多,使电极附近的物料颜色变深,导致壳聚糖的颜色逐渐变深,并导致测脱乙酰度时样品的吸光度变大,计算所得的脱乙酰度值比实际值要小。因此,碱液浓度为6%时制备的壳聚糖的脱乙酰度测定值比4%时低(从理论上,脱乙酰度不会降低)。

随着NaOH溶液浓度的增大,壳聚糖的得率逐渐降低,当碱液浓度大于4%时,得率降低幅度比较小,但粘均分子质量的下降较快,这说明当碱液浓度比较大时,电解过程将使甲壳素分子降解,在一定程度上也会导致壳聚糖得率下降。但是碱浓度太低时,如浓度为2%时制备的壳聚糖得率虽然高,但纯度低、再溶性差,测得的壳聚糖的脱乙酰度偏高。

2.1.3 电压对电解反应的影响

取3份处理后的湿菌体,每份40g,各加入400ml 4%的NaOH溶液,分别在10、15和20V电压下电解1.5h,所得壳聚糖的各项指标见表4。

表4 电压对所得壳聚糖质量的影响

Table 4 Effect of Voltage to quality of chitosan product

电压 (V)	颜色	得率 (%)	脱乙酰度 (%)	粘均分子量 ($\times 10^4$)
10	最浅	18.0	88.7	13.4
15	较深	16.7	81.7	8.2
20	最深	16.6	83.2	4.4

由表4可见,随着电压的增大,壳聚糖的颜色逐渐加深,得率和粘均分子量逐渐下降,而脱乙酰度先减小后增大。

理论上, 在一定的范围内, 电压越高电解效果越好, 制备的壳聚糖脱乙酰度越高; 超出了这个范围后, 过高的电压将对壳聚糖分子产生破坏作用, 导致得率和粘均分子质量降低。当电压增大时, 电极的温度明显增高, 造成电极上吸附的蛋白质等物质发生严重的焦糊现象, 所以壳聚糖的颜色也逐渐变深, 同时在测脱乙酰度时吸光度会变大, 导致电压为 15V 时壳聚糖脱乙酰度的测定值比 10V 时小。若电压太高 (20V), 虽然在测脱乙酰度时吸光度会变大, 但是电解时物料焦糊现象比较严重, 制备的壳聚糖再溶性变差, 所以壳聚糖脱乙酰度的测定值也会变大。同样 20V 时, 由于壳聚糖的再溶性差, 也会使壳聚糖的粘均分子质量的测定值有一定程度的下降。

2.1.4 液料比对电解反应的影响

取 4 份处理后的湿菌体, 每份 40g, 分别加入 4% 的 NaOH 溶液 200、400、600、800ml, 在 10V 电压下电解 1.5h, 所得壳聚糖的各项指标见表 5。

表 5 液料比(V/W)对所得壳聚糖质量的影响

Table 5 Effect of ratio of NaOH volume to wet weight of thalli (V/W) to quality of chitosan product

液料比 (ml/g)	颜色	得率 (%)	脱乙酰度 (%)	粘均分子质量 ($\times 10^4$)
5:1	一般	11.4	88.4	11.6
10:1	一般	18.0	90.8	12.6
15:1	一般	17.7	92.7	12.5
20:1	较深	17.0	86.9	11.5

随着液料比的增大, 壳聚糖的颜色开始时变化不大, 当液料比达到 20:1 时, 颜色变化较明显。得率和粘均分子质量变化趋势相同, 都是先增大, 当液料比大于 10:1 时又开始逐渐减小。脱乙酰度随着液料比的增大而逐渐增大, 当液料比为 20:1 时又变小。

理论上, 液料比越大越有利于电流和 NaOH 作用, 从而越有利于去除蛋白质等杂质, 电解效果越好, 制备的壳聚糖脱乙酰度越大。但是液料比太大时溶液的电阻变小, 相同的电压下电流变大, 电极上吸附的蛋白质等物质会变焦, 所以液料比为 20:1 时, 壳聚糖的颜色变深, 也导致了壳聚糖脱乙酰度测定值比实际值偏小。相反, 液料比过小时, 反应物较粘稠, 不易于电解反应的进行, 电解后得到甲壳素中仍有较多的蛋白质等残留其中, 而且与甲壳素牢固的结合着, 不利于后边的脱乙酰反应, 制备的壳聚糖的纯度比较低且再溶性差。因此, 液料比为 5:1 时壳聚糖的得率和脱乙酰度都比较低, 并且实际得率和脱乙酰度更低。

液料比增大时, 在相同的电压下电流虽然变大, 但是溶液中的电流密度没有变, 也不会对甲壳素分子产生较强的破坏作用, 所以壳聚糖的分子质量并没有太大

的下降。液料比小时, 反应溶液稠度大, 对甲壳素分子有一定的保护作用, 减少了电解对壳聚糖分子破坏作用, 所以液料比越小制备的壳聚糖分子质量越大。液料比为 5:1 时, 由于制备的壳聚糖纯度低, 再溶性差, 因此粘均分子质量测定值比实际值偏低。

2.2 黑曲霉电解法制备甲壳素的条件优化

根据单因素试验结果, 确定了 A: 电解时间(h), B: NaOH 浓度(%), C: 电压(V), D: 液料比(ml/g)为影响电解效果的主要因素, 各因素的水平见表 6, 采用四因素三水平的正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验, 取 9 份湿菌体, 每份 40g, 结果见表 7~10。

表 6 正交试验因素水平表

Table 6 Factors and levels in orthogonal experiment

水平	A 电解时间 (h)	B NaOH 浓度 (%)	C 电压 (V)	D 液料比 (ml/g)
1	1.25	3	8	8
2	1.50	4	10	10
3	1.75	5	12	12

表 7 黑曲霉电解法制备甲壳素正交试验结果

Table 7 Orthogonal experiment result of preparation of chitin by electrolysis

试验号	粘均分子质量 ($\times 10^4$)	脱乙酰度 DD (%)	得率 (%)
1	12.3	89.1	19.3
2	12.9	88.8	18.1
3	11.8	87.9	17.2
4	13.4	90.3	18.5
5	12.6	84.5	17.8
6	12.0	90.4	17.6
7	12.9	87.2	18.1
8	13.0	89.0	18.7
9	12.3	88.7	17.3

表 8 壳聚糖粘均分子质量的正交试验结果极差分析

Table 8 Range analysis of orthogonal experiment result of molecular weight of chitosan

	A	B	C	D
k ₁	12.33	12.87	12.43	12.40
k ₂	12.67	12.83	12.87	12.60
k ₃	12.73	12.03	12.43	12.73
R	0.40	0.84	0.44	0.33
优化水平	A ₃	B ₁	C ₂	D ₃

表 9 壳聚糖脱乙酰度的正交试验结果极差分析

Table 9 Range analysis of orthogonal experiment result of deacetylation degree of chitosan

	A	B	C	D
k ₁	88.60	88.87	89.50	87.43
k ₂	88.40	87.43	89.27	88.80
k ₃	88.30	89.00	86.53	89.07
R	0.30	1.57	2.97	1.64
优化水平	A ₁	B ₃	C ₁	D ₃

表 10 壳聚糖得率的正交试验结果极差分析
Table 10 Range analysis of orthogonal experiment result of chitosan yield

	A	B	C	D
k ₁	18.20	18.63	18.53	18.13
k ₂	17.97	18.20	17.97	17.93
k ₃	18.03	17.37	17.70	18.13
R	0.23	1.26	0.83	0.20
优化水平	A ₁	B ₁	C ₁	D _{3/1}

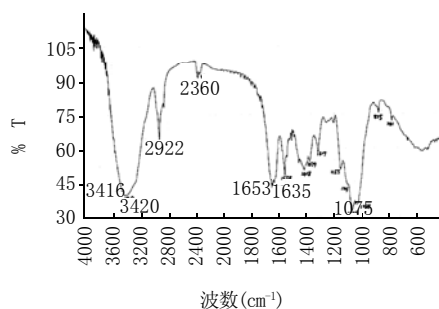


图 1 电解法最佳条件下所得甲壳素产品的红外光谱图

Fig.1 Infrared spectrum of chitin product prepared under optimal electrolysis condition

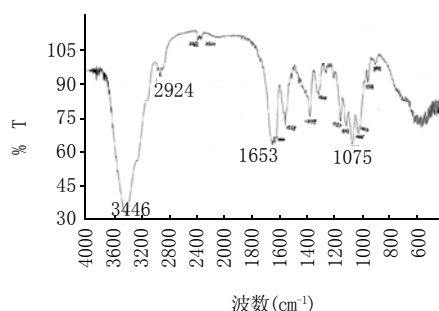


图 2 商品甲壳素的红外光谱图

Fig.2 Infrared spectrum of chitin product of commercial source

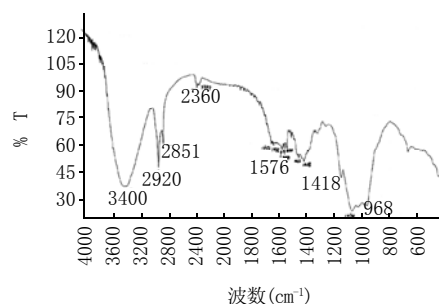


图 3 由电解法最佳条件下所得甲壳素制备的壳聚糖产品的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of chitin product prepared under optimal electrolysis condition

极差分析结果表明,为得到最高粘均分子质量的壳聚糖,电解的最优条件为 A₃B₁C₂D₃,各因素对结果的影响次序为: B > C > A > D。为得到最高脱乙酰度的壳聚糖,电解的最优条件为 A₁B₃C₁D₃,各因素对结

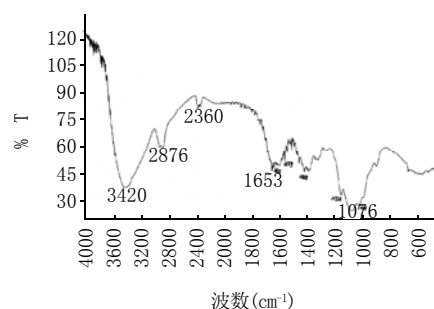


图 4 用商品甲壳素制备的壳聚糖产品的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum of chitosan product prepared from chitin product of commercial source

果的影响次序为: C > D > B > A。为得到最高壳聚糖得率,电解的最优条件为 A₁B₁C₁D₃,各因素对结果的影响次序为: A > B > C > D。

三者综合分析,黑曲霉电解法制备甲壳素的最优条件为 A₁B₁C₁D₃,即电解时间 1.25h,NaOH 浓度 3%,电压 8V,液料比 12:1。在此条件下对黑曲霉进行电解,所得产物干燥后的红外谱图见图 1,图 2 为商品甲壳素的红外谱图,根据表 1 描述并与图 2 的比较可知,电解后得到的产品是甲壳素。该甲壳素产品脱乙酰后制得的壳聚糖脱乙酰度为 89.81%,粘均分子质量为 13.12 × 10⁴,得率为 18.7%,其红外谱图见图 3。与图 4 相比较,并根据表 1 的描述可知,产品为壳聚糖。

3 结论

通过本试验,可以得出以下几点结论。

3.1 用电解法从黑曲霉中提取甲壳素在实践上是可行的。

3.2 在较低的电压电流条件下,适当延长电解时间不会对甲壳素分子造成大的破坏,制备的壳聚糖纯度更高,品质更好,但是时间太长会导致壳聚糖颜色变深。

3.3 NaOH 浓度对电解效果影响较大,浓度变大,反应体系中的电流也会变大,在高电流和高浓度 NaOH 的作用下,对甲壳素分子有较强的破坏作用,导致制备的壳聚糖颜色变深,分子质量也较低。

3.4 随着电压的增大,通过反应体系中的电流变大,对甲壳素分子的破坏作用增强,不仅使壳聚糖产品的颜色变深,而且分子质量也比较小。

3.5 在相同的电压下,适当增加液料比,有利于电流和 NaOH 作用,有利于去除蛋白质等杂质,电解效果好,但对壳聚糖的品质影响不大。

3.6 正交试验结果分析表明,黑曲霉菌丝体电解法制备甲壳素的最优条件为:电解时间 1.25h,NaOH 浓度 3%,电压 8V,液料比 12:1。在该条件下电解最后制得的壳聚糖脱乙酰度为 89.81%,粘均分子质量为 13.12

超滤在大豆多肽分离纯化中应用

邓成萍¹, 薛文通¹, 孙晓琳², 全明海¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2. 保定味群食品工业有限公司, 河北 保定 071000)

摘要: 本试验应用超滤技术对大豆多肽进行分离, 研究了超滤系统几个主要参数对膜通量的影响。研究结果表明: 截留分子量 30000Da 的超滤膜应在压力 0.12MPa、温度 40℃、pH 值 7.0 下运行 40min 为一个周期, 膜通量为 19L/m²·h 左右; 截留分子量 10000Da 的超滤膜应在压力 0.10MPa、温度 < 45℃、自然 pH 值下运行 60min 为一个周期, 膜通量为 25L/m²·h 左右; 截留分子量 5000Da 的超滤膜应在压力 0.10MPa、温度 < 45℃、自然 pH 值下运行 80min 为一个周期, 膜通量为 22L/m²·h 左右; 经分离得到分子量 > 30000Da 的大豆多肽约占 13.21%, 分子量 10000~30000Da 的大豆多肽约占 4.05%, 分子量 5000~10000Da 的大豆多肽约占 6.41%, 分子量 < 5000Da 的大豆多肽约占 76.11%。

关键词: 大豆多肽; 超滤; 分离; 纯化

Application of Ultrafiltration on Separation and Purification of Soybean Peptides

DENG Cheng-ping¹, XUE Wen-tong¹, SUN Xiao-lin², QUAN Ming-hai¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Baoding Way Chain Food Industrial Co. Ltd., Baoding 071000, China)

Abstract: In this experiment, soybean peptides were separated by ultrafiltration. How those major ultrafiltration-system parameters affecting the membrane flux were studied. It has showed that the ultrafiltration membrane with 30000 MWCO

收稿日期: 2005-04-26

作者简介: 邓成萍(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

× 10⁴, 得率为 18.7%。

3.7 总体来说, 最终的壳聚糖产品脱乙酰度的大小受电解条件影响不大, 主要受脱乙酰方法的影响, 但电解时各因素对壳聚糖粘均分子质量的影响都较大, 尤其是电压影响显著, 各因素对最终产品的得率也都有影响。

4 讨论

在本实验条件下所制备的壳聚糖再溶解性不太好, 而测定脱乙酰度、特性粘度及粘均分子质量时都需要将壳聚糖溶解, 因此对这些指标的测定都有影响(但进行横向比较还是可以的)。初步分析认为, 再溶性不好的原因与黑曲霉菌丝体的预处理有关, 不过还需通过进一步的试验来解决。

参考文献:

[1] 代养勇. 真菌几丁质和壳聚糖研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2004,

25(3): 88-90.

[2] Knorr D, Klein JK. Production and conversion of chitosan with cultures *Mucor rouxii* and *Phycomyces blakesleeana*[J]. Biotechnol Lett, 1986, (8): 1-9.

[3] Stephen A White, Peter R Farina, Inge Fulton. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*[J]. Appl Envir Microbiol, 1979, 38(2): 323-328.

[4] Jozef Synowiecki, Nadia Ali, Abdul Quawi, et al. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan[J]. Food Chemistry, 1997, 60(4): 605-610.

[5] 代养勇. 从黑曲霉中制备甲壳素和壳聚糖的研究[D]. 河南工业大学, 2005.

[6] 曹健, 殷蔚申. 黑曲霉几丁质和壳聚糖的研究[J]. 微生物学报, 1995, 22(4): 200-203.

[7] 贺淹才, 许庆清, 许嫣红, 等. 从黑曲霉提取甲壳素和壳聚糖[J]. 生物技术, 2000, 10(2): 20-23.

[8] Krepels, Guennadi I, Mikhailine, et al. US Patent, 5053113, 1991.

[9] 王伟, 簿淑琴, 秦汶. 不同脱乙酰度壳聚糖方程的订定[J]. 中国科学(B辑), 1990, (11): 1126-1131.

[10] Pearson FG, Marchessault RH, Liang CY. Infrared spectra of crystalline polysaccharides V Chitin[J]. J Polym Sci, 1960, 43: 101-116.