

分类号 TS254.6³³01 密级 _____
UDC 689.002

学 位 论 文

河虾加工下脚料中甲壳素和蛋白质的研究

Studies on Chitin and
Protein from Processing
Waste of Freshwater Shrimp

夏 文 水

指导教师姓名 汤逢教授 无锡轻工业学院 江苏无锡

李东庆教授 Rutgers 大学 美国新泽西

申请学位级别 博 士 专业名称 食品科学与工程

论文提交日期 1989. 6 论文答辩日期 1989. 10. 27

学位授予单位和日期 无锡轻工业学院 1989. 12.

答辩委员会主席 丁霄霖教授

评阅人 丁霄霖教授

陈学平教授

刘树楷教授

1989年10月 日

本论文导师和指导小组成员

导 师： 汤 逢教授
李东庆教授

指导小组成员： 汤 逢教授 李东庆教授
向瑞春教授 王 璋副教授
许时婴副教授 全文海副教授
王荣民副教授

论 文 摘 要

本论文主要进行了以下几方面的研究工作：

首先，采用酶法和化学法相结合的方法从河虾加工下脚料中提取甲壳素；研究了甲壳素在浓碱中的脱乙酰化反应动力学；总结出了壳聚糖脱乙酰化度与粘度的关系及主链水解与脱乙酰化度的关系；特别是提出了甲壳素分子中乙酰基团的存在形成分子内氢键和增加立体位阻而影响主链水解的机制。这些内容文献上均无报道。

第二，通过X—衍射和红外光谱对甲壳素和壳聚糖的结构进行了确证；用光散射法和粘度法测定了壳聚糖的分子量；并对壳聚糖的稀溶液性质进行了详细的研究。

第三，将经过一定方法处理后的壳聚糖应用于苹果汁的澄清。测定了苹果汁经壳聚糖处理后其成分含量变化；用柱层析和高效液相层析对重要的酚类化合物进行了定性和定量测定。结果表明：壳聚糖能澄清苹果汁，能除去果胶类物质，降低蛋白质和酚类化合物含量，但不影响其营养成分和风味，且苹果清汁有很好的贮藏稳定性，优于果胶酶结合助凝剂处理而得到的苹果清汁。以上结果尚未见文献报道。

第四，重点研究了壳聚糖的絮凝机理以及壳聚糖最佳澄清剂量（OCD）与其功能性质间的关系。通过对苹果汁中悬浮粒子大小分布和 ζ 电位的测定，从絮凝作用的电性和壳聚糖分子量两方面，较深入地探讨了其絮凝机理，并应用“静电块状模型”

（Electrostatic Patch Model）很好地解释了实验结果。根据絮凝机理，从理论上推导出了OCD与其主要功能性质脱乙酰

量 ($\bar{M}_v$) 有如下关系:

$$\ln \bar{M}_v = \ln D + K_1 \ln D + K_2 \ln \bar{M}_v$$

上, 结果与此式完全相符。这部分内容在壳聚糖的研究中
文献报道。

第五, 采用酶法提取河虾加工下脚料中的蛋白质, 对在酶作用下虾蛋白的溶出动力学进行了研究。这方面尚无文献报道。经酶法得到的提取物, 可作为调味料、风味添加剂和蛋白质补充剂应用于食品中。提出了河虾加工下脚料综合利用和深度加工的最优工艺路线, 具有极大的经济价值。

关键词: 河虾加工下脚料; 甲壳素/壳聚糖; 脱乙酰化; 絮凝剂; 絮凝机理; 苹果汁澄清; 蛋白质; 酶水解

Studies on Chitin and Protein from Processing Waste of Freshwater Shrimp

Xia Wen-Shui Tang Feng Lee Tung-Ching

Abstract

It is included in this dissertation that several researches are as follows. 1. Chitin was extracted from freshwater shrimp processing waste by the chemical method combined with enzyme. The reactive kinetics of deacetylation of chitin in alkaline was studied. The relationships between the degree of deacetylation (DD) and viscosity as well as between the hydrolysis of main chain and DD in chitosan were investigated. Importantly, the mechanism was developed in which the hydrolysis of main chain was inhibited by hydrogen bond and **the stereo-hindrance** in chitin owing to the presence of acetyl group. 2. The structures of chitin and chitosan prepared from chitin were confirmed by X-ray diffraction and infrared spectra. The molecular weight of chitosan was determined by the light-scattering and viscosity

measurements. The properties of chitosan in dilute solution were characterized in detail. 3. The chitosan treated by the chemical methods was applied to the clarification of apple juice. The changes in the content of the components in the apple juice clarified by chitosan were measured. The important phenolics of cider were qualitatively and quantitatively determined by column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). It was showed that the apple juice could be clarified, pectic substances could be removed and the content of proteins and phenolics could be decreased, but the nutritive value and flavor were not affected by the clarifying treatment of chitosan. The clarified cide on the storage stability was better than that treated by pectic enzyme and filter-aid. 4. The emphases were put on the flocculation mechanism of the clarification of apple juice by chitosan and the relationships between the optimum clarification dosage (OCD) and the performances of chitosan. After the size and the electrokinetic

potential of colloidal particles in apple juice were measured, the flocculation behavior was explained by the electrostatic patch model through observations of effects of charge and molecular weight. Based on the flocculation mechanism, the quantitative relationships between OCD and DD and molecular weight ($\bar{M}_v$) could be expressed in the followed equation: $OCD = K_1 + K_2 \ln DD + K_3 \ln \bar{M}_v$. The experimental results were well accorded with the formula. 5. The solubilizing kinetics of proteins from freshwater shrimp processing offal under the enzymatic hydrolysis was studied. The proteins extracted from the processing waste by the enzymatic hydrolysis were used for condiments, flavor additives and protein extenders in foods. The technological process of comprehensive utilization of the processing waste was made up.

Key words: Processing waste of freshwater shrimp; Chitin / Chitosan; Deacetylation; Flocculant; Flocculation mechanism; Clarification of apple juice; Protein; Enzymatic hydrolysis.

简称(缩写)

A U A	anhydrouronic acid
D D	degree of deacetylation
D L V O	Derjaguin, Landau, Vervev and Overbeek
E D T A	ethylene diamine tetraacetic acid
F P C	fish protein concentrate
H P L C	high performance liquid chromatography
M C C	microcrystalline chitin
O C D	optimum Clarification dosage
P D	percent of decrease
P E F	pectic enzyme and filter-aid

1、引言	1
2、甲壳素和壳聚糖的化学	4
3、壳聚糖制备及反应机制探讨	11
3·1 前言	11
3·2 实验材料、方法和内容	13
3·3 结果和讨论	19
3·4 结论	40
4、壳聚糖结构性质的研究	42
4·1 综述	42
4·2 实验内容	44
4·3 结果和讨论	46
4·4 结论	62
5、壳聚糖应用于苹果汁澄清的研究	63
5·1 前言	63
5·2 实验内容	67
5·3 结果和讨论	73
5·4 结论	91
6、壳聚糖絮凝机理及与其功能性质间关系的研究	93
6·1 前言	93
6·2 实验内容	95
6·3 实验结果	101
6·4 讨论	117
6·5 结论	123

7、河虾加工下脚料中蛋白质的利用.....	1 2 5
7 · 1 前言.....	1 2 5
7 · 2 实验内容.....	1 2 6
7 · 3 结果和讨论.....	1 3 2
7 · 4 结论.....	1 4 6
总结.....	1 4 8
致谢.....	1 5 3
参考文献.....	1 5 4

1 引言

近十几年来,甲壳素和壳聚糖的研究十分活跃,正在广泛深入地进行,国际性的甲壳素和壳聚糖学术会议相继在一些国家召开(1,2),发表的论文涉及到纺织、印染、造纸、食品、医药、废水处理、金属提取回收、环境保护、化妆品、烟草等方面(3,4,5,6,7,8,9,81,174,175)。甲壳素和壳聚糖的研究之所以活跃,是因为受到下列三方面的影响和促进。

首先,甲壳素是自然界第二大丰富的生物聚合物,分布十分广泛,是许多低等动物,特别是节肢动物如虾、蟹、昆虫等外壳的重要成份,也存在于低等植物如菌藻类的细胞壁中。据估计自然界每年的生物合成量超过1011吨(7,9),这是一个巨大的天然资源,在当今世界,人口快速增长,工业飞速发展,而资源严重缺乏的情况下,开发利用这部分天然资源,无疑具有重大的现实意义。

其次,随着海洋渔业及水产养殖业的发展,特别是南极磷虾的开发利用(10),导致水产食品加工业的兴旺扩大。与此同时,虾蟹等加工下脚料的处理就成了迫切需要解决的问题。一般来说,虾蟹除去可食部分外,大约有30~80%是作为下脚料。在这种加工下脚料中含蛋白质15~40%,甲壳素达15~30%,钙盐占35~55%(以干基计)(11)。据估计美国每年从虾蟹下脚料中可得到甲壳素 $5.3 \times 10^3 \sim 7.8 \times 10^3$ 吨,全世界每年则有 1.5×10^5 吨(12)。以前,水产加工厂家都将这部分加工下脚料作为废物倒入海洋,这不仅浪费了宝贵资源,而且也产生了严重污染。如果将加工下脚料中 useful 物质提取出来,这不仅化废为宝,使废物处理问题得到缓解,而且也具有相当大的经济效益。美国商业部海洋拨款办公室(U.S. Department of Commerce, NOAA,

Office of Sea Grant) 就发起和资助该研究项目(13)。日本从国家到企业也在进行广泛研究(4, 8, 9, 19)。早在60年代, 从虾蟹加工下脚料中提取甲壳素的生产在许多国家已经工业化(3), 日本月产达56吨, 美国月产达23吨, 我国沿海地区也有生产厂, 年产量约二百吨(14)。因而加快研究开发甲壳素的应用成为研究的重点。

此外, 过去由于甲壳素具有分子内氢键呈晶体结构(15), 在溶剂中的溶解和进行化学反应较困难, 而使其应用性大大受到限制。但是将甲壳素脱去乙酰基成为壳聚糖后, 反应活性大大增加, 可供结构修饰的基团增多, 不仅围绕游离氨基可找到许多在工业中有应用价值的新用途, 而且可制备成各种各样的衍生物(详见第2章), 从而大大地丰富了甲壳素和壳聚糖的研究范围。由此不但可找到类似纤维素的用途, 而且也可发现许多独特、潜在的新用途, 开拓了在各方面的应用(16, 17, 18, 19, 27), 所以引起了许多国家的重视, 吸引越来越多的科学工作者去寻求开发在各个科技领域中有应用价值的研究项目。

在国内, 近年来已开始注意到对甲壳素和壳聚糖的研究, 发表了一些综述性文章(20, 21, 22, 23), 也有少数关于甲壳素和壳聚糖的研究文章(14, 24, 25, 26, 155), 但仅涉及到一些应用研究, 且较简单也没有深入研究的报道, 这方面与国外相比差距很大。我国属太平洋地区国家, 海岸线长, 海洋渔场面积达42亿亩, 海水可养殖面积738万亩。七五期间对虾养殖将发展到十万吨(23)。除了广大的海洋渔业资源外, 淡水渔业也很发达。每年淡水虾蟹的捕获量也相当可观, 以江苏省为例, 全省大约有3—4千吨淡水虾, 仅高邮、宝应、洪泽、兴化、金湖等县中的水产品加工厂每年在5~10月份

旺季生产中，其虾加工下脚料的量都约有1~2百吨之多(28)。因此，开展对甲壳素和壳聚糖的研究，不仅具有学术意义，而且也有较大的经济价值。

本论文旨在国内外研究基础上，结合国内实际情况，研究河虾加工下脚料综合利用和深度加工的最优工艺路线，并着重研究其中几个重要的理论问题：

1、从河虾加工下脚料中提取甲壳素制备壳聚糖，通过分析不同反应条件对壳聚糖粘度和脱乙酰化度的影响以及脱乙酰化反应动力学，探讨壳聚糖主链水解与脱乙酰化度的关系，力图从理论上解释主链水解反应的机制，为壳聚糖制备工艺条件的选择提供依据。

2、对壳聚糖的结构、性质，主要是稀溶液性质进行详细的研究。

3、研究壳聚糖作为絮凝剂对苹果汁的澄清作用，从而用壳聚糖澄清苹果汁以取代传统的果胶酶结合助凝剂的处理方法。

4、主要从絮凝作用的电性和壳聚糖分子量两方面，探讨壳聚糖澄清苹果汁的作用机理，探讨壳聚糖最佳澄清剂量与其功能性质之间的关系。

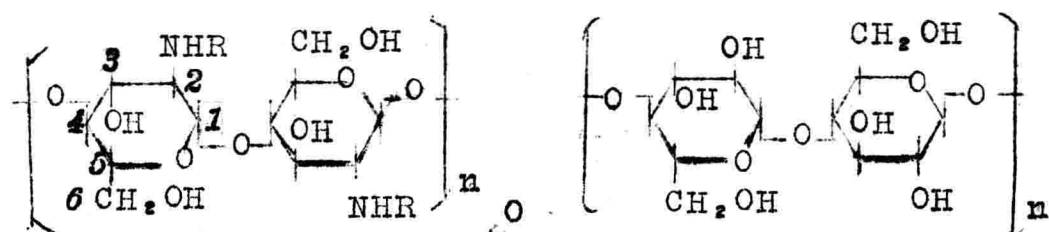
5、利用酶法提取河虾加工下脚料中的蛋白质，并通过对酶水解蛋白质溶出动力学的理论分析，为蛋白质提取最佳条件的选择提供依据。

2 甲壳素和壳聚糖的化学

甲壳素 (Chitin), 原文是希腊文, 意思是被膜、铠甲, 中文又译为几丁质, 壳多糖, 聚乙酰氨基葡萄糖, 甲壳质 (58)。

1811年法国 Braconnot 在用水、乙醇和稀碱连续萃取真菌后, 得到一些白色残渣, 当时他没有察觉残渣含有氮, 而误把它当作纤维素, 并称之为 fungine。1823年, Odier 从昆虫中分离出同样的物质, 也没有察觉残渣含有氮, 又误认为纤维素, 并称为 Chitin。1824年 Children 重复了 Odier 的工作, 发现该残渣含有10%左右的氮, 从而证明不是纤维素。到1876年, Ledderhase 用盐酸水解甲壳素得到了氨基葡萄糖和乙酸 (21)。后来用化学方法和 X—射线衍射证明, 甲壳素是由2—乙酰氨基—2—脱氧葡萄糖单体通过 $\beta-(1, 4)$ 糖苷键连接起来的直链多糖, 其化学名为 (1, 4)—2—乙酰氨基—2—脱氧— β —D—葡聚糖 (I) (46), 化学结构类似于纤维素 (Cellulose) (III)。甲壳素若脱去 C₂ 氨基上乙酰基的产物叫壳聚糖 (Chitosan)* (II)。值得注意的是, 游离氨基完全酰化的甲壳素或完全脱去乙酰基的壳聚糖在自然界中通常难于找到或实验室中难于制备。因而, 甲壳素和壳聚糖两者不能绝对区别。一般来说, 术语甲壳素是指分子中存在绝大多数乙酰胺基, 而仅只有少数失去乙酰基; 术语壳聚糖是指由甲壳素脱乙酰化后的产物, 分子中大部分乙酰基被除去。

* Chitosan 中文又译为脱乙酰壳多糖; 脱乙酰几丁质; 聚氨基葡萄糖 (58)



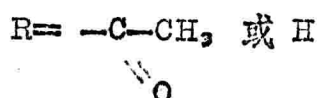
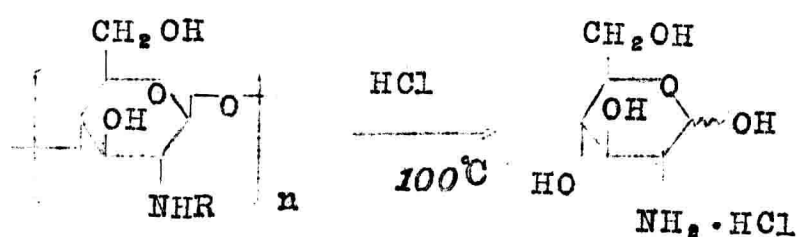
(I) Chitin $R = -C(=O)-CH_3$

(II) Chitosan $R = -H$ (III) Cellulose

甲壳素不溶于稀酸、稀碱和一般的有机溶剂，故又名不溶性甲壳素，在强酸中则被降解而溶解。近年来，发现了甲壳素的若干新溶剂如甲磺酸、三氯乙酸—二氯乙烷，二甲基乙酰胺—5%氯化锂(29)。壳聚糖由于分子中游离氨基增多，其溶解性能大为改善，能在稀酸类介质中溶解，故习惯上又称为可溶性甲壳素。甲壳素和壳聚糖虽然分子结构与纤维素类似，其性质有与纤维素相似的地方，但由于含有乙酰胺基或氨基，其性质又有不同的一面。甲壳素和壳聚糖结构修饰及主要化学反应如下：

1. 主链水解

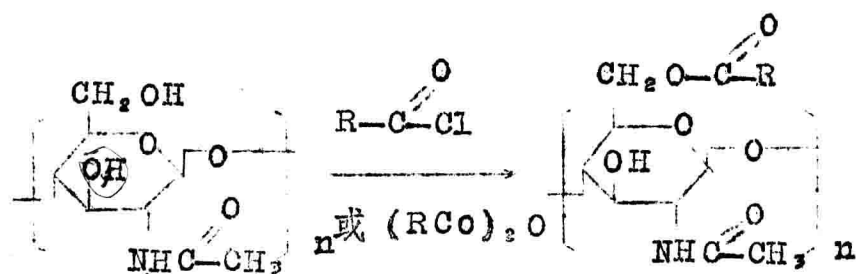
甲壳素和壳聚糖在酸性存在下，主链β—(1,4)糖苷键可发生水解断裂，产物为葡胺糖、葡胺糖的衍生物或各种低分子量的多聚葡胺糖(157)。当在强酸和加热时可使水解加快进行，若充分水解时可得到葡胺糖一种产物(30)，即使在稀的弱酸溶液中也能缓慢降解。



2、与羟基的反应

(1) 酰化

在甲壳素和壳聚糖的羟基上可引入不同分子量的脂肪族或芳香族酰基，使产物在有机溶剂中的溶解性大大改善，这是近几年甲壳素化学中研究较多的一种反应之一(31)。对于壳聚糖可先将氨基保护，再在羟基上酰化。



(2) 酯化

用浓硫酸， SO_2-SO_3 ，氯磺酸等作酯化试剂，可使甲壳素和壳聚糖中的羟基磺化，可得到类似于肝素的抗凝血剂(7, 32, 33, 34)。