

三种昆虫甲壳素提取与分析*

郭宝华^{1,2}, 何 钊², 冯 颖², 陈晓鸣^{2**}(1. 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局
资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:以含氮量和灰分含量为指标,采用酸碱法对蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中甲壳素的提取方法进行了比较研究,确定了三种昆虫最佳提取甲壳素的方法:从蝉蛻中提取甲壳素方法为80℃下与NaOH(6%)反应1h脱蛋白、再在常温下与HCl(0.2 mol·L⁻¹)反应20min,脱除无机盐;从中华稻蝗中提取甲壳素的方法为80℃下与NaOH(7%)反应1h脱蛋白,再在常温下与HCl(0.3 mol·L⁻¹)反应10min,脱除无机盐;从喙尾琵琶甲中提取甲壳素的方法为80℃下与NaOH(7%)反应5h脱蛋白,再在常温下与HCl(0.2 mol·L⁻¹)反应10min,脱除无机盐;红外光谱与X-射线衍射分析表征的结果表明,三种昆虫中提取的甲壳素与标样一致。

关键词:蝉蛻;中华稻蝗;喙尾琵琶甲;甲壳素**中图分类号:**S865.4**文献标识码:**A

Study on Extraction of Chitin from Three Insects

GUO Bao-hua^{1,2}, HE Zhao², FENG Ying², CHEN Xiao-ming²(1. International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. Research Institute of Resources Insects, CAF;
Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The extraction conditions of chitin from *Periostracum Cicadae*, *Oxya chinensis* (Thunberg), *Blaps rynchopetara* Fairmaire were optimized by acid-alkali method laying a strong emphasis on the effects of NaOH and HCl on the removal of protein and inorganic salt. The conditions of extractions of chitin from *Periostracum Cicadae* were: (1) Removing protein: processed the sample with the solution of 6% NaOH, 80℃, keeping for 1 hour; (2) Removing inorganic salt: put the sample in the solution of 0.2 mol·L⁻¹ HCl, keeping for 20 min at room temperature. Extractions from *O. chinensis* were (1) Removing protein: 7% NaOH, 80℃, keeping for 1 hours; (2) Removing inorganic salt: put the sample in the solution of 0.3 mol·L⁻¹ HCl, keeping for 10 min at room temperature. Extractions from *B. rynchopetara* were (1) 7% NaOH, 80℃, keeping for 5 h; (2) 0.2 mol·L⁻¹ HCl, keeping for 10 min at room temperature. The structures of chitin extracting from the three insects were the same as standards according to the IR and X-ray diffraction spectra.

Key Words: *Periostracum cicadae*; *Oxya chinensis*; *Blaps rynchopetara*; Chitin

甲壳素(Chitin)又名几丁质、甲壳质等,化学名为β-(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D葡萄糖^[1],其广泛存在于节肢动物门甲壳纲动物的虾、蟹的甲壳,昆虫纲(如鞘翅目、双翅目翅膀等)的甲壳,真菌类低等

收稿日期:2008-01-15

基金项目:“十一五”科技支撑计划重点项目“物产资源高效利用关键技术研究及示范”项目(2006BAD06B07)、国家林业局引进国外先进农业技术项目“资源昆虫体内活性物质诱导及提取技术引进”(20064116)的部分研究内容

作者简介:郭宝华(1978—),男,河北保定人,硕士,主要从事资源昆虫利用等研究及科研管理工作。

* 红外光谱及X射线衍射分析由云南大学分析测试中心完成,特此感谢!

** 通讯作者。

植物如酵母、霉菌菌丝细胞和藻类细胞及高等植物(如蘑菇)的细胞壁中^[2]。甲壳素及其衍生物具有良好的吸湿性、成膜性、气透性、降解性、生物相容性、无毒副作用以及不污染环境等诸多优良性能,在环保、纺织工业、医药保健、农业、食品和化妆品等方面得到广泛应用^[2-5]。目前工业化生产甲壳素的原料主要来源于水产品虾和蟹壳,来源相对单一,因此开发新的甲壳素资源具有重要意义。

昆虫体壁中含有丰富的甲壳素,是潜在的甲壳素来源^[6]。近年来,国内外开展了针对昆虫甲壳素提取的研究工作,例如对蝇蛆(*Musca domestica* Linnaeus)和云南松毛虫(*Dendrolimus houi* Lajonquiere)等几种昆虫的甲壳素提取进行了深入研究^[7-15]。本文针对目前国内外在昆虫甲壳素研究开发领域的现状及发展趋势,以蝉蜕、中华稻蝗、喙尾琵琶甲为原料,进行甲壳素提取的研究,分析比较三种不同昆虫甲壳素的得率和质量,以期研究和开发昆虫甲壳素提供技术和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料:蝉蜕为蚱蝉(*Cryptotympana atrata* Fabricius)若虫羽化时脱落的皮壳,购自云南省昆明市菊花村中药材市场;中华稻蝗(*Oxya chinensis* Thunberg)成虫、喙尾琵琶甲(*Blaps rynchopetera* Fairmaire)成虫,购自云南省昆明市景星花鸟市场;甲壳素标样(来源于虾)购自 Sigma 公司。

仪器:PE 公司 paragon 1 000 型红外光谱仪,日本理学 D/MAX-3B 型 X-衍射仪。

试验所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 甲壳素提取 采用碱酸法提取甲壳素,主要利用碱溶液脱除原料中的蛋白质,酸溶液脱除无机盐及其它物质。

1.2.1.1 蛋白质脱除 以蝉蜕、中华稻蝗及喙尾琵琶甲为原料,加入 NaOH 溶液进行脱蛋白实验,反应结束后,水洗至中性,干燥后采用凯氏定氮法测定氮含量,根据样品中的氮含量来衡量原料中蛋白质脱除的程度。

(1) NaOH 浓度对脱除蛋白质的影响 反应温度:80 ℃;反应时间:2 h;液固比:8 mL · g⁻¹;蝉蜕脱蛋白的 NaOH 浓度:2%、4%、6%、8%、10%;中华稻蝗的 NaOH 浓度:3%、5%、7%、9%、12%;喙尾琵琶

甲的 NaOH 浓度:3%、5%、7%、9%、11%。

(2) 反应温度对脱蛋白的影响 反应时间:2 h;液固比:8 mL · g⁻¹;NaOH 浓度:7%;反应温度为:50、60、70、80、90 ℃

(3) 反应时间对脱蛋白的影响 NaOH 浓度为 7%;反应温度 80 ℃;液固比:8 mL · g⁻¹;蝉蜕、中华稻蝗的反应时间为:1、2、3、4、5 h;喙尾琵琶甲的反应时间为:1、2、3、5、7 h。

1.2.1.2 无机盐脱除 脱除蛋白质后的干燥样品中加入一定浓度的 HCl,搅拌反应一段时间后,水洗至中性,干燥后采用灼烧法测定灰分含量,根据灰分含量衡量无机盐脱除的程度。

(1) HCl 浓度对无机盐脱除的影响 反应温度:常温;反应时间:20 min;液固比为 15 mL · g⁻¹;与蝉蜕、喙尾琵琶甲反应脱除无机盐的 HCl 浓度为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mol · L⁻¹;中华稻蝗的 HCl 浓度为 0.3、0.6、1.0、1.5、2.0 mol · L⁻¹。

(2) 反应时间对无机盐脱除的影响 反应温度:常温;液固比为 15 mL · g⁻¹;HCl 浓度:1 mol · L⁻¹;蝉蜕、中华稻蝗反应时间:10、30、50、70、90 min;喙尾琵琶甲反应时间:10、20、40、60、80 min。

1.2.1.3 甲壳素提取与分析 根据上述实验结果,分析不同反应条件对蛋白质和无机盐脱除的影响,进行实验条件的优化,根据优化的实验方法对蝉蜕、中华稻蝗及喙尾琵琶甲进行甲壳素的提取,对最后的甲壳素样品测定灰分、氮含量,计算收率。

收率 = 甲壳素样品质量(g) / 昆虫原料(g) × 100%

1.2.2 结构表征 采用红外光谱和 X-射线衍射进行甲壳素结构表征,测定结果与甲壳素标样进行比对。

2 结果与分析

2.1 蛋白质脱除

2.1.1 NaOH 浓度对蛋白质脱除的影响 不同 NaOH 浓度对三种昆虫脱蛋白质影响的实验结果见图 1。由图 1 可知:随着 NaOH 浓度的增加,氮含量逐渐降低,起始降低幅度较大,后逐步趋缓。这主要是由于原料中蛋白脱除的过程是蛋白质的酰胺键(肽键)在碱的作用下发生水解,生成可溶于水的氨基酸过程。随着 NaOH 浓度的升高,蛋白质水解速度加快,当 NaOH 浓度升高到一定程度,水解速度增加变缓,再增加 NaOH 的浓度对加快蛋白质的水解速度影响不大,蛋白质脱除后的样品中氮含量降低

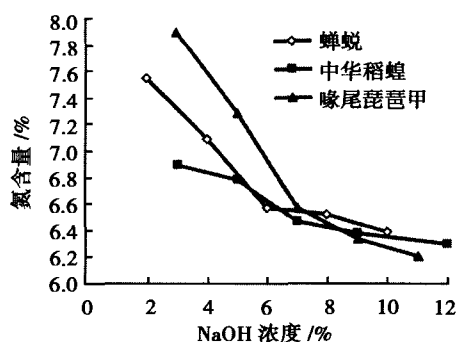


图1 NaOH 浓度与样品中氮含量的关系

的也不明显,而且 NaOH 浓度的增加,对甲壳素品质不利的影响也会增加^[2]。

由此脱除蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中的蛋白质时,综合考虑提取成本和甲壳素品质,NaOH 浓度分别选择6%、7%、7%较为合适。

2.1.2 反应温度对脱除蛋白质的影响 反应温度对脱蛋白影响的结果见图2。由图2可知:反应温度低于80℃时,样品中氮含量随反应温度的升高而逐渐降低,高于80℃时,样品中氮含量降低的就不明显。温度对碱水解蛋白质有较大的影响,一般来说,反应温度越高,蛋白质碱水解的速度越快,但当温度升高到一定值时,蛋白质水解的增加速度开始趋缓,样品中氮含量降低的速度不明显,说明在此温度下,蛋白质的碱水解反应趋于平衡,继续升温对蛋白质的碱水解反应影响不大,相反,如果温度过高,还会引起甲壳素的降解^[2]。

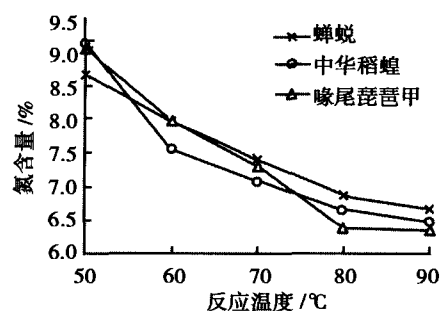


图2 反应温度与样品中氮含量的关系

考虑到能耗和甲壳素品质,脱除蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中的蛋白质时,反应温度选择80℃为宜。

2.1.3 反应时间对脱除蛋白质的影响 反应时间对蛋白质脱除影响的实验结果见图3。由图3可知:随着反应时间的延长,三种昆虫样品中的氮均有所下降,但蝉蛻与中华稻蝗样品中氮含量下降幅度较

小,而琵琶甲在1~5 h内下降幅度较大,而后变缓。一般来说,反应时间越长,蛋白质水解的越彻底,但水解速度逐渐减慢,当反应时间延长到某一刻以后,蛋白质的水解反应接近于平衡,样品中的氮含量降低的也不明显。

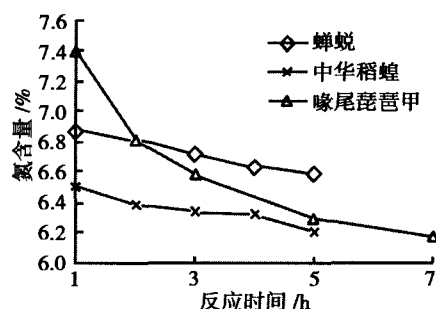


图3 反应时间与氮含量的关系

由此脱除蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中的蛋白质时,反应时间分别选择1、1.5 h为宜。

2.2 无机盐脱除

昆虫体壁中含有的无机盐主要是碳酸钙,用稀盐酸浸泡脱除蛋白质后的样品时,样品中的碳酸钙等无机盐转化成相应的盐酸盐而溶于水,通过洗涤,将其除去。无机盐脱除的彻底与否,主要以所提取甲壳素的残留灰分含量作为评价指标,残留灰分含量越低,说明无机盐脱除的越彻底,相反,残留灰分含量越高,无机盐脱除的越不彻底。

2.2.1 HCl 浓度对脱除无机盐的影响 HCl 浓度对无机盐脱除的实验结果见图4。由图4可知:随着盐酸浓度升高,甲壳素残留的灰分含量基本不变。理论上盐酸的浓度越高,无机盐脱除的越彻底;但由于脱蛋白后的样品中无机盐含量比较低,低浓度的盐酸即可使无机盐的脱除反应达到平衡;此外由于有部分无机盐处于甲壳素的胶状分子团结构之中, HCl 难以渗透到里面,致使 HCl 不能彻底的脱除无机盐。

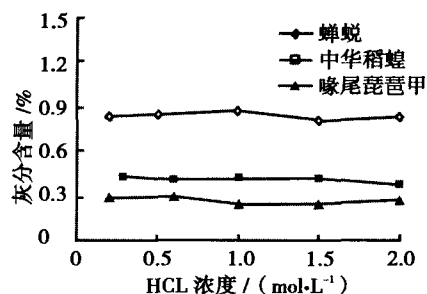


图4 HCl 浓度与灰分含量的关系

由于低浓度的盐酸即可将残留的灰分含量小于 1% (食品级甲壳素标准)^[2], HCl 浓度过高, 对脱除无机盐效果并不明显, 而且还会促进甲壳素分子的降解, 因此, 脱除蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中的无机盐时, HCl 浓度分别选择 0.2、0.3、0.2 mol · L⁻¹ 为宜。

2.2.2 反应时间对脱除无机盐的影响 反应时间对无机盐脱除影响的实验结果见图 5。由图 5 可知: 蝉蛻样品中的灰分含量起始下降较快, 20 min 后变化较小; 而中华稻蝗与喙尾琵琶甲样品的灰分含量整体上略有下降, 变化较小。一般来说, 随着反应时间的延长, 甲壳素残留的灰分含量呈下降趋势, 但当反应时间达到某一时刻后, 下降趋势就不明显了。由此脱除蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中的无机盐时, 反应时间选择 20、10、10 min 即可快速脱除样品

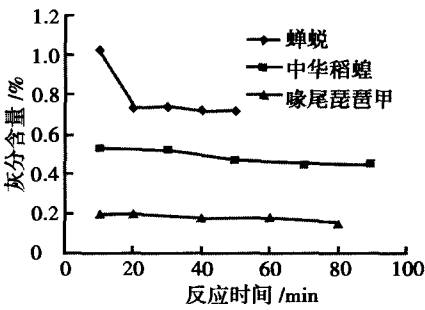


图 5 反应时间与灰分含量的关系

中的无机盐。

2.2.3 甲壳素提取与分析 根据上述实验结果, 优化提取方法, 对蝉蛻、喙尾琵琶甲和中华稻蝗进行甲壳素提取, 并分析提取样品的灰分、氮含量, 计算甲壳素收率, 结果见表 1。

表 1 甲壳素的质量分析

甲壳素类别	提取条件	灰分/%	氮含量/%	甲壳素收率/%
蝉蛻	80 ℃下与 6% NaOH 反应 1 h、再在常温下与 0.2 mol · L ⁻¹ HCl 反应 20 min	0.68	5.95	36.23
中华稻蝗	80 ℃下与 7% NaOH 反应 1 h、再在常温下与 0.3 mol · L ⁻¹ HCl 反应 10 min	0.28	5.79	9.72
喙尾琵琶甲	80 ℃下与 7% NaOH 反应 5 h、再在常温下与 0.2 mol · L ⁻¹ HCl 反应 10 min	0.15	5.54	22.56

灰分含量是甲壳素很重要的一个质量指标^[2], 通过测定, 蝉蛻、中华稻蝗、喙尾琵琶甲原料的灰分含量分别为 3.74%、4.38% 和 4.05%, 脱除蛋白质和无机盐后, 所得甲壳素中灰分含量分别为 0.68%、0.28% 和 0.15%, 均低于 1% (表 1)。所提取甲壳素的各项指标均已达到食品级甲壳素的标准^[2]。

2.3 结构表征

2.3.1 红外光谱结构表征 所提取的三种昆虫甲壳素和甲壳素标样进行红外光谱分析, 根据谱图对照分析, 均有相同的特征峰:

(1) 3 400 cm⁻¹, 是 O-H 伸缩振动吸收峰; (2) 3 270 cm⁻¹, 是 N-H 伸缩振动吸收峰; (3) 2 960 ~ 2 879 cm⁻¹ 的 3 个吸收峰, 是 C-H 伸缩振动吸收峰; (4) 分别在 1 657、1 557、1 315 cm⁻¹ 的吸收峰, 分别是酰胺 I、II、III 谱带, 这 3 个吸收峰是甲壳素的特征吸收峰; (5) 1 030 ~ 1 157 cm⁻¹ 之间的 4 个吸收峰, 是 C-O 伸缩振动吸收峰; (6) 897 cm⁻¹ 是环伸缩振动吸收峰。

由此可见, 蝉蛻甲壳素、中华稻蝗甲壳素和喙尾琵琶甲甲壳素和标样的红外光谱基本相同。

2.3.2 X-衍射结构表征 所提取的三种昆虫甲壳素的 X-衍射图谱和标样甲壳素的 X-衍射图谱相似。甲壳素标样在 2θ = 9.28° 和 2θ = 19.11° 处有

衍射峰, 三种昆虫甲壳素在 2θ = 9.04° ~ 9.25° 和 2θ = 19.05° ~ 19.21° 之间也有明显的甲壳素的结晶特征峰, 是一种晶体化合物。

从蝉蛻、中华稻蝗和喙尾琵琶甲中所提取甲壳素的红外光谱、X-射线衍射图谱和甲壳素标样的红外光谱、X-射线衍射图谱基本相同, 所提取的三种昆虫甲壳素与标样化学结构基本一致, 属于同一种物质。

3 结论与讨论

根据实验结果确定从蝉蛻、中华稻蝗及喙尾琵琶甲中提取甲壳素的方法分别为: 蝉蛻 80 ℃, 6% NaOH 反应 1 h 脱蛋白, 常温 0.2 mol · L⁻¹ HCl 反应 20 min 脱无机盐; 中华稻蝗 80 ℃ 7% NaOH 反应 1 h 脱蛋白, 常温 0.3 mol · L⁻¹ HCl 反应 10 min 脱无机盐; 喙尾琵琶甲 80 ℃ 7% NaOH 反应 5 h 脱蛋白, 常温 0.2 mol · L⁻¹ HCl 反应 20 min 脱无机盐。用红外光谱及 X-射线衍射对提取的甲壳素进行结构表征, 结果表明与甲壳素标准品一致。

昆虫中蛋白质含量较高, 故提取甲壳素的方法与从蟹、虾壳中提取甲壳素的方法^[2] 略有不同, 首先用 NaOH 脱除蛋白质, 再用 HCl 脱除无机盐, 以节约盐酸的用量。从三种昆虫及其白蜡虫^[15] 甲壳素得

率来看,以昆虫体壁角质化程度较高的蝉蜕和喙尾琵琶甲为原料,提取的甲壳素得率最高,而以昆虫体壁角质化程度较低的中华稻蝗、白蜡虫为原料,提取的甲壳素得率较低。由此可见,不同种类的昆虫,甲壳素的含量差别较大。由于只有在昆虫体壁的表皮层部分含有甲壳素,因此在选择提取甲壳素的原料时,应尽量选择体壁角质化程度较高的昆虫。

甲壳素的主要质量指标之一是灰分含量,虾、蟹壳原料中的灰分含量在30%以上,用酸除无机盐,将其残留灰分含量降至1%以下较难,同时原料的来源还受地域和季节的影响^[2];而以昆虫为原料提取甲壳素,由于昆虫本身的无机盐含量较低,在短时间内即可将灰分含量降到1%以下,因此从甲壳素灰分这个角度分析,从昆虫中提取甲壳素,比从虾蟹中提取的甲壳素较有优势,应该充分利用这一资源。

参考文献:

- [1] Majeti N V, Ravi K. A review of chitin and chitosan applications [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2000, 46: 1-22
- [2] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 1-649
- [3] 王小红, 马建标, 何炳林. 甲壳素、壳聚糖及其衍生物的应用 [J]. *功能高分子学报*, 1999, 12(2): 197-202
- [4] 李庆梅, 付增娟, 张洪燕. 壳聚糖对长白落叶松和侧柏种子萌发的影响 [J]. *林业科学研究*, 2007, 20(4): 524-527
- [5] 王鑫, 郑超, 张新歌, 等. 新型生物黏附剂材料疏基壳聚糖的合成与表征 [J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(1): 206-211
- [6] 陈晓鸣. 资源昆虫学研究进展 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1999
- [7] 王敦, 胡景江, 刘铭汤. 从蟋蟀中提取壳聚糖的研究 [J]. *西北林学院学报*, 2003, 18(3): 79-81
- [8] 黄映恒, 黄凤新, 韦华标. 从中华真地鳖壳中提取甲壳素的实验研究 [J]. *河池师专学报: 自然科学版*, 2001, 21(4): 66-68
- [9] 李维莉, 林南英, 李文鹏, 等. 从云南琵琶甲中提取甲壳素的研究 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 1999, 21(2): 139-140
- [10] 赵敏, 陈晓鸣, 孙龙, 等. 云南省喙尾琵琶甲分布及生态环境调查 [J]. *林业科学研究*, 2007, 20(3): 356-362
- [11] 王爱勤, 谭干祖. 从蝇蛹壳中提取甲壳素 [J]. *化学世界*, 1998, 39(1): 29-30
- [12] 王敦, 胡景江, 刘铭汤. 从臭蜣螂中提取甲壳素/壳聚糖的研究 [J]. *林业科学*, 2004, 40(5): 180-185
- [13] 刘高强, 刘卫星, 魏美才, 等. 从害虫马尾松毛虫中提取甲壳素的初步研究 [J]. *西北林学院学报*, 2007, 22(2): 138-141
- [14] 詹永乐, 黄春芳, 陈复生. 家蚕蛹皮制取壳聚糖的最佳工艺条件 [J]. *化学通报*, 2001, 64(7): 450-453
- [15] 冯颖, 陈晓鸣, 何钊, 等. 白蜡虫抗突变实验与主要功效成分分析 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(3): 284-288