

菌酶联合法提取松墨天牛甲壳素

刘信旭¹, 曾 辉², 时 鹏¹, 马晓光³, 石 娟^{1*}

(1. 北京林业大学 林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083;

2. 辽宁林业有害生物防治检疫局, 辽宁 沈阳 110804; 3. 北京水光科技有限公司, 北京 100052)

摘 要:甲壳素(chitin)是一种重要的可再生资源。松墨天牛(*Monochamus alternatus*)是松属植物的重要蛀干害虫,其壳质化程度高,是甲壳素的优质资源。以松墨天牛为原料,探讨“菌酶联合法”提取昆虫甲壳素的可行性和应用前景。结果表明:1)联合发酵最佳条件是8%松墨天牛粉末、8%葡萄糖液体培养基,接种11%的凝结芽孢杆菌,恒温摇床温度为50℃,转速为100 r/min,同时加入蛋白酶K和凝结芽孢杆菌发酵5 d后得到发酵产物,最终甲壳素得率为32.51%,产物中甲壳素纯度为72.78%,灰分残留量占甲壳素产品的1.42%,蛋白质残留量占甲壳素产品的25.74%。2)红外光谱鉴定结果表明,通过菌酶联合法制取的甲壳素相比于传统酸碱法提取的甲壳素品质好,具有良好的应用前景。

关键词:甲壳素;菌种发酵;蛋白质酶解;松墨天牛

中图分类号:S718.7

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2019)02-0179-08

Bacterium-protease Combined Method to Extract Chitin from *Monochamus alternatus*

LIU Xin-xu¹, ZENG Hui², SHI Peng¹, MA Xiao-guang³, SHI Juan^{1*}

(1. Key Laboratory of Beijing Municipality for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Forestry Pest Control and Quarantine Bureau of Liaoning, Shenyang 110804, Liaoning, China;

3. Beijing Shuiguang Technology Co., Ltd., Beijing 100052, China)

Abstract: Chitin is an important renewable resource. *Monochamus alternatus*, is an key pest to genus *Pinus*. Compared to other insects, it has a higher degree of chitinization and a higher content of chitin, it is a high-quality of chitin resource. In view of this, this paper used *M. alternatus* as the raw material to explore the feasibility and application prospect of the extraction of chitin by the “bacterium-protease combined method”. The main findings were as follows: 1) The optimum conditions for combined fermentation were 8% *M. alternifolius* powder, 8% glucose liquid medium, inoculation of 11% *Bacillus coagulans*, constant temperature shaker at 50℃, rotation speed at 100 r/min, and simultaneous addition of proteinase K After fermentation with *B. coagulans* for 5 days. After being identified as chitin, the final yield of chitin was 32.51%, the purity of the chitin in the product was 72.78%, the residual ash content was 1.42% of the chitin product, and the protein residue was 25.74% of the chitin product. 2) The infrared spectrum identification results indicated that the chitin prepared by the bacterium-protease combined method had higher quality than the traditional acid-alkali method extraction, and thus had more advantages and application prospects.

Key words: chitin; bacterium fermentation; protein enzymolysis; *Monochamus alternatus*

甲壳素(chitin)又名几丁质、甲壳质、壳聚糖等, 是一种天然聚合分子,其分子式(C₈H₁₃NO₅)_n。甲

收稿日期:2018-05-28 修回日期:2018-09-15

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(2016ZCQ07);国家自然科学基金面上项目(31770687)。

作者简介:刘信旭,男,在读硕士,研究方向:林木有害生物防治。E-mail:XinxuLiu@foxmail.com

*通信作者:石 娟,女,博士生导师,研究方向:林业外来生物入侵、植物检疫。E-mail:shi_juan@263.net

壳素广泛存在于多种动物体内,是地球上仅次于纤维素的再生资源。据估算,自然界中甲壳素的年合成量达 100 亿 t^[1]。甲壳素已成为了现阶段可再生资源研究的热点之一,更是被誉为“人类第六生命要素”^[2-4]。可以预见,甲壳素的开发与利用将会成为新时代具有巨大开发前景的产业之一。

目前商品化的甲壳素生产中,原料主要来自于虾、蟹壳^[5]。近年来,甲壳素的研究领域中出现了以昆虫为原料提取甲壳素的新趋势^[6],利用昆虫提取甲壳素,产品杂质更少、纯度更高^[7-8]。

松墨天牛(*Monochamus alternatus*)是一种次期性森林害虫,松树一旦遭受其害,常常导致枯死,损害林业经济。而且松墨天牛是中国松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus*)的传播媒介昆虫^[9-10],是国家林业和草原局公布的重点害虫之一,在我国分布广泛^[11-12],主要危害我国的马尾松林^[13-14]。松墨天牛严重威胁着我国林业和林业相关产业的健康发展。松墨天牛是鞘翅目昆虫,壳质化程度高,分布广泛,虫体获取相对容易。利用松墨天牛来生产甲壳素,可以“变废为宝”。

目前,提取甲壳素的方法比较成熟的有酸碱法^[15-16]、酶解法^[17]及微生物发酵法^[17-21]等,其中,以发酵法最为热门^[22-26]。本研究以松墨天牛为原料,结合前人的酶解法和发酵法,利用“菌酶联合法”提取甲壳素。通过单因素试验和正交试验,确定在提取甲壳素过程中灰分去除效率最高的菌种,并探究最佳发酵条件;通过单因素试验,确定在提取甲壳素过程中蛋白质去除效率最高的蛋白酶,并探究最佳酶解条件;利用“菌酶联合法”提取甲壳素,确定在提取过程中的菌酶最优添加方式以及联合发酵的最佳条件;最后,将“酸碱法”和“菌酶联合法”2种方法提取到的甲壳素进行红外光谱分析,并计算甲壳素得率,分析甲壳素纯度,比对甲壳素质量,评价2种提取甲壳素方法的优劣。其结果可为今后以昆虫为原料规模化生产甲壳素提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

松墨天牛供试虫源:诱捕于浙江省杭州市富阳区。粉碎后筛选 20~100 目粒级的粉末,干燥后达到恒重于本试验提取甲壳素的原料。

本试验供试菌种包括凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus hel-*

veticus)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。菌种购自北纳生物公司。

供试蛋白酶包括蛋白酶 K、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、复合蛋白酶。蛋白酶生产厂家为 Solarbio LIFR SCIENCES。

1.2 试验方法

1.2.1 松墨天牛粉末(干燥至恒重)成分测定方法

蛋白质含量的测定:凯氏定氮法^[27];

灰分含量的测定:燃烧法^[28];

脂肪含量的测定:氯仿-甲醇法^[29];

甲壳素含量的测定:酸碱法^[30],先用 1 mol/L 的氢氧化钠在 95℃ 下处理 2 h 去除蛋白质,清洗后再用 1 mol/L 盐酸在 60℃ 下处理 1 h 去除灰分。使用此种方法提取了松墨天牛甲壳素并进行甲壳素质量测定,最终与“菌酶联合法”提取的甲壳素进行质量比较。

1.3 发酵和酶解条件筛选

1.3.1 微生物发酵最优条件筛选 按照单因素试验规则,取 100 mL 干燥三角瓶,加入干燥后的 4 g 筛选出的松墨天牛粉末、4 g 葡萄糖,加蒸馏水配置成 8% 松墨天牛粉末、8% 葡萄糖的液体培养基,用高压灭菌锅在 121℃ 条件下灭菌 30 min。冷却后分别接种不同种类待选菌种,接种量为 5%,置于恒温摇床中发酵培养,发酵温度设置为 47℃,摇床转速设置为 100 r/min,3 d 后停止发酵。发酵结束后用 100 目筛网过滤,留固体成分,清水冲洗 2 次,灭菌后干燥,测定固体残留物灰分含量,计算去除率,通过比较去除率,对比筛选出最优发酵菌种。筛选出提取昆虫甲壳素过程中去除灰分效果最佳的发酵菌种。以优化后的发酵条件进行下一个发酵条件筛选。

在优化菌种的基础上设置不同试验进行以下因素的筛选:接种量、摇床转速、发酵温度、碳源种类、葡萄糖浓度及发酵时间,最后,选择接种量、发酵温度以及发酵时间 3 个变量作为考察对象,每个因素设置 3 个水平,进行正交试验。

1.3.2 蛋白酶酶解最优条件筛选 按照单因素试验规则,筛选酶解去除蛋白质效果最佳的蛋白酶种类,并继续进行酶添加量、初始 pH 值、温度及酶解时间的筛选试验。

1.3.3 菌酶联合发酵探究 在单因素试验的基础上,以筛选后的试验条件探究“菌酶联合”提取甲壳素时,菌酶添加方式和培养基是否灭菌对甲壳素提取的影响。

1.3.4 产物定性红外光谱分析 对于标准甲壳素、利用酸碱法制得的甲壳素及利用菌酶联合法制得的

甲壳素, 利用红外光谱仪对以上 3 种甲壳素用 $400 \sim 450 \text{ cm}^{-1}$ 进行光谱扫描, 分析其分子基团特性。

2 结果与分析

2.1 松墨天牛主要成分及含量

经过检测, 松墨天牛的各主要成分及相应比重如表 1 所示。

表 1 松墨天牛主要成分及含量

Table 1 The main components and content of the *Monochamus alternatus*

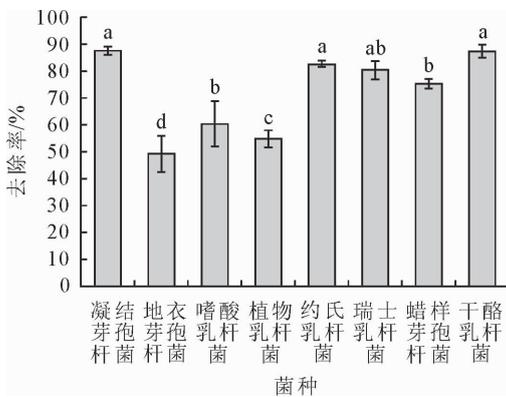
成分	含量/%
蛋白质	52.14 ± 0.53
灰分	4.10 ± 0.21
脂肪	15.13 ± 0.46
甲壳素	23.53 ± 0.34

2.2 酸碱法提取甲壳素

本试验用酸碱法提取松墨天牛甲壳素, 最终蛋白质平均去除率为 $(95.89 \pm 0.30)\%$, 灰分去除率为 $(98.30 \pm 0.30)\%$, 甲壳素得率为 25.74% 。本试验未做脱色处理, 制得甲壳素为黑褐色、粉末状。

2.3 发酵条件筛选

由图 1, 方差分析结果表明凝结芽孢杆菌、干酪乳杆菌约氏乳杆菌的灰分去除效果优于其他菌种。凝结芽孢杆菌的产酸能力和抗逆性强于干酪乳杆菌, 并且可以产生芽孢, 因而本试验最终选择凝结芽孢杆菌作为最优试验发酵菌种。



注: 不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

图 1 不同菌种对灰分去除率的影响

Fig. 1 The effect of different strains on ash removal rate

由图 2 知, 当凝结芽孢杆菌接种量为 11% 时, 灰分平均去除率最高, 为了节约发酵时间, 缩短发酵周期, 本试验将接种量 11% 定为后续试验接种量。

摇床转速通过改变凝结芽孢杆菌和底物的接触面积以及溶氧量影响发酵速率。由图 3 可知, 转速达到 100 r/min 时, 灰分去除率最高。

发酵温度直接影响发酵速率。由图 4 可知, 在

47°C 条件下发酵灰分的平均去除率更高, 且更加节能和易于控制, 因此本试验选择 47°C 作为最优发酵温度。

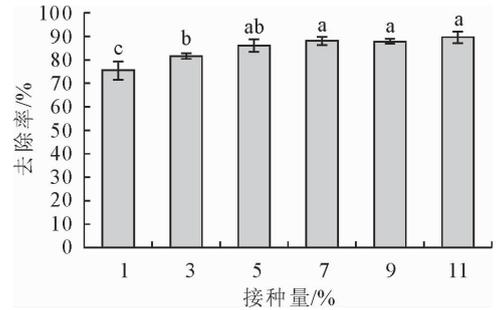


图 2 不同接种量对灰分去除效果的影响

Fig. 2 The effect of different inoculation amounts on ash removal rate

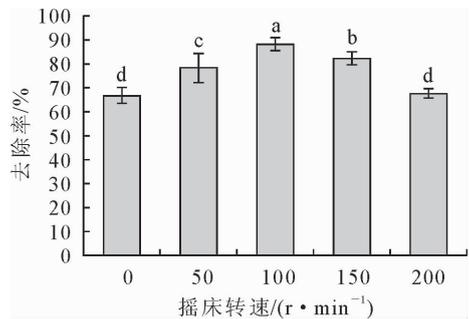


图 3 不同摇床转速对灰分去除效果的影响

Fig. 3 The effect of different shaker speeds on ash removal rate

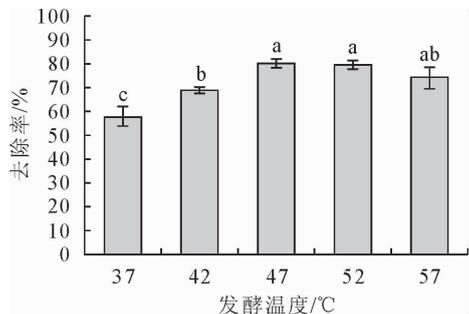


图 4 不同发酵温度对灰分去除效果的影响

Fig. 4 The effect of different fermentation temperatures on ash removal rate

图 5 表明不同种类碳源的灰分去除率差异较大, 当以葡萄糖为碳源时去除效果最好。

由图 6 可知, 在不影响去除率的情况下, 在不浪费的前提下本试验选择 8% 作为葡萄糖最佳浓度。

由图 7 可知, 发酵 5 d 后去除效果最好, 本试验认为在实际生产中的发酵时长可以选择 5 d。

为验证单因素筛选的发酵条件, 选取了接种量、发酵温度、发酵时间 3 个重要发酵条件作为供试对象, 设计正交试验。由表 2 可知, $K_{A3} > K_{A2} > K_{A1}$, A_3 即接种量 11% 为最佳接种量; $K_{B2} > K_{B1} > K_{B3}$, 本试验选定 B_2 , 即 52°C 为最佳发酵温度; $K_{C3} > K_{C2}$

$>K_{Cl}$, 发酵时间 5 d 为最佳发酵时长。

上述正交试验结果表明, 接种量 11%、发酵温度 52℃、发酵时间 5 d 为最佳发酵条件, 这与单因素筛选结果一致。

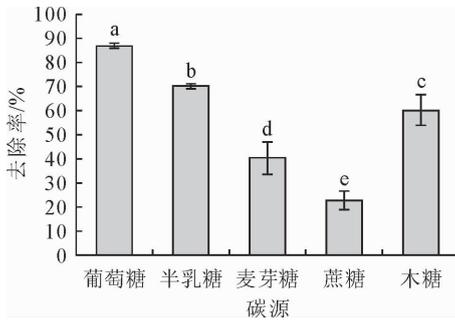


图 5 不同碳源对灰分去除效果的影响

Fig. 5 The effect of different carbon sources on ash removal rate

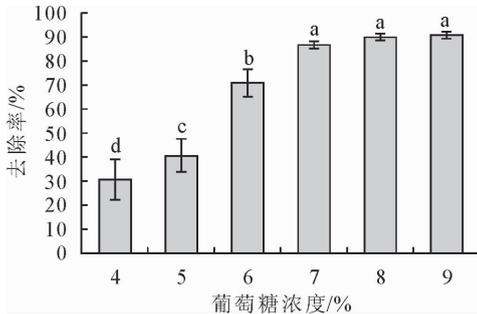


图 6 不同葡萄糖浓度对灰分去除效果的影响

Fig. 6 The effect of different glucose concentrations on ash removal rate

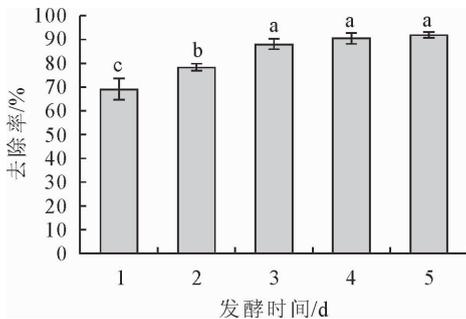


图 7 不同发酵时间对灰分去除效果的影响

Fig. 7 The effect of different fermentation time on ash removal rate

2.4 酶解条件的筛选

由图 8 可知, 比较酶解之后的蛋白质去除率发现, 中性蛋白酶和蛋白酶 K 的去除效果最好。在 95% 置信区间内, 进行单因素方差分析, 得到 $P = 0.001 < 0.05$, 结果表明两者在去除蛋白质的去除率上有显著差异。为了保证酶解效果, 本试验选择蛋白酶 K 作为去除蛋白质的最佳蛋白酶。

由图 9 可知, 当底物浓度一定时, 蛋白质的去除率和酶添加量呈正比, 酶添加量越大, 蛋白质去除效果越好; 但当酶的添加量达到一定量以后, 蛋白质与

酶结合点位饱和, 继续增加酶添加量并不能加大蛋白质去除率。因此本试验选择 800 U/g 作为最优添加量。

表 2 正交试验极值分析

Table 2 Orthogonal test extreme analysis

试验序号	水平组合	试验条件				去除率/%
		接种量 A/%	发酵温度 B/℃	发酵时间 C/d	空	
1	A ₁ B ₁ C ₁	7	47	3	1	82.81
2	A ₁ B ₂ C ₂	9	53	4	2	84.59
3	A ₁ B ₃ C ₃	11	57	5	3	88.73
4	A ₂ B ₁ C ₂	7	47	3	3	89.80
5	A ₂ B ₂ C ₃	9	53	4	1	85.51
6	A ₂ B ₃ C ₁	11	57	5	2	83.31
7	A ₃ B ₁ C ₃	7	47	3	2	87.35
8	A ₃ B ₂ C ₁	9	53	4	3	90.38
9	A ₃ B ₃ C ₂	11	57	5	1	86.69
K ₁		256.13	259.96	255.01	255.01	
K ₂		263.12	260.47	255.25	255.25	
K ₃		264.04	258.73	268.91	268.91	
\bar{K}_1		85.38	86.65	85.00	85.00	
\bar{K}_2		87.71	86.82	85.08	85.08	
\bar{K}_3		88.01	86.24	89.64	89.64	
极差 R		2.64	0.17	4.63	4.63	
主次顺序				C>A>B		
最优水平		A ₃	B ₂	C ₃		
最优组合		A ₃ B ₃ C ₃				

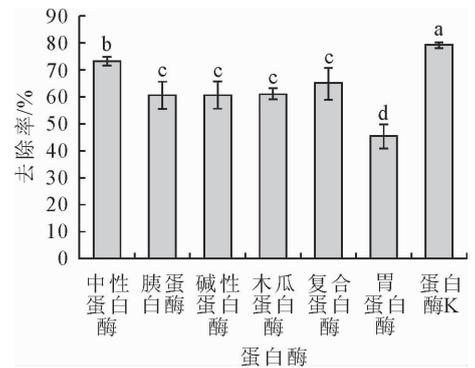


图 8 不同蛋白酶对蛋白质去除效果的影响

Fig. 8 The effect of different proteases on protein removal rate

由图 10 可得出, 当 pH 值为 8.0 时, 蛋白质的平均去除率出现最高值, 去除率更加稳定, 因此本试验选择 pH 值为 8.0 作为酶解最佳初始 pH 值。

由图 11 可知, 在 55℃ 时蛋白质的去除率达到最大值。故本试验选用 55℃ 为最适温度。

由图 12 可知, 酶解 9 h 后蛋白质的去除率趋于稳定, 这是因为在酶解最后阶段, 可酶解的蛋白质大多包裹在甲壳素大分子内部, 不能再分解, 蛋白酶的活性也随着时间延长而降低。因此, 即使酶解时间继续增加, 蛋白质的去除率也不再变化。考虑到酶解速度和时间成本, 选择 9 h 作为本试验酶解的最佳时长。

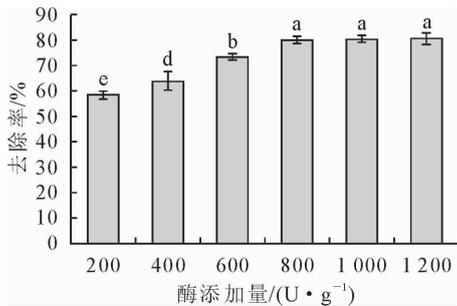


图 9 不同酶添加量对蛋白质去除效果的影响

Fig. 9 The effect of different added amounts on protein removal rate

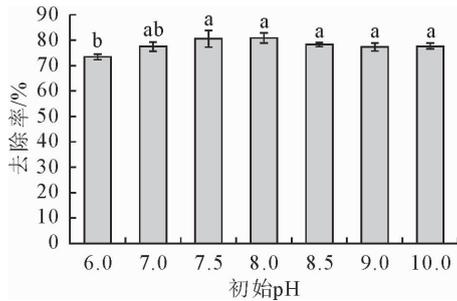


图 10 不同初始 pH 对蛋白质去除效果的影响

Fig. 10 The effect of different initially pH on protein removal rate

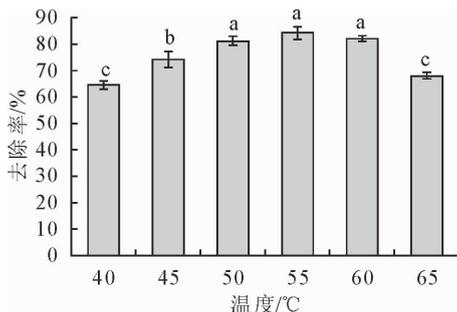


图 11 不同酶解温度对蛋白质去除效果的影响

Fig. 11 The effect of different enzymatic temperatures on protein removal rate

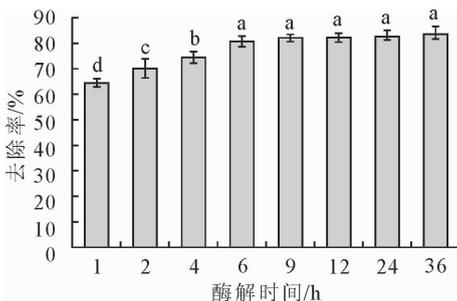


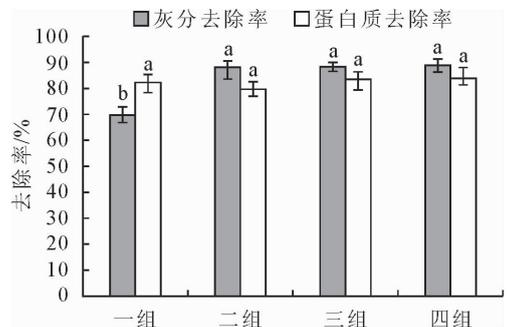
图 12 不同酶解时间对蛋白质去除效果的影响

Fig. 12 The effect of different enzymatic time on protein removal rate

2.5 菌酶联合发酵探究

由图 13 对比此 4 组试验后发现,在培养基灭菌的条件下,按照不同顺序进行酶解和发酵,发现同时添加蛋白酶和菌进行酶解和发酵制取甲壳素,蛋白

质和灰分的去除率都能够保持在较高水平;第 4 组结果表明,培养基灭菌与否对去除率影响甚微,因此实际进行生产过程中可以考虑不灭菌进行发酵和酶解,这样既能简化工艺流程,但去除率也都能维持在较高水平。



注:前 3 组试验,培养基灭菌后进行发酵和酶解,第 1 组为先酶解后发酵,第 2 组为先发酵后酶解,第 3 组为同时加入凝结芽孢杆菌和蛋白酶 K 进行联合发酵,第 4 组为不灭菌,其他条件同试验组 3。

图 13 菌酶联合发酵酶解

Fig. 13 Bacterium-protease combined method

2.6 红外光谱分析结果

通过对比红外光谱曲线,分析三者的主要成分以及相对含量的高低。将标准甲壳素和 2 种方法提取的甲壳素进行光谱分析,制图后比较三者差异。由图 14 可知,标准甲壳素在 3443.03 cm^{-1} 处有一个 O-H 伸缩振动峰,在 3106.62 cm^{-1} 处有 1 个 N-H 伸缩振动峰,在 2933.28 cm^{-1} 处有 1 个 C-H₂ 伸缩振动峰,在 2891.04 cm^{-1} 处有 1 个 C-H 伸缩振动峰,在 1630.6 cm^{-1} 处有 1 条酰胺 I 谱带,在 1415.68 cm^{-1} 和 1383.16 cm^{-1} 处分别有 1 个 CH₃ 弯曲振动和 CH₃ 对称变形振动峰,在 1316.94 cm^{-1} 和 1260.85 cm^{-1} 分别有酰胺 III 谱带,在 1156.18 cm^{-1} 、 1077.89 cm^{-1} 及 1027.92 cm^{-1} 出现 3 个 C-O 伸缩振动峰,在 953.3 cm^{-1} 处有 1 个 C-H₃ 摇摆振动峰,在 895.19 cm^{-1} 处有 1 个糖环伸缩振动峰,在 751.67 cm^{-1} 处有 1 个 N-H(面外)伸缩振动峰。菌酶联合法提取的甲壳素、酸碱法提取的甲壳素与标准甲壳素的光谱图波形和波位基本一致。差异之处在于三者的透光率,这是由于在压片过程中添加的样品量有所差异,而且本试验制得的甲壳素没有进行很好的脱色,导致透光率比标准样低。与甲壳素标准物相比,菌酶联合法提取的甲壳素在 1156.18 cm^{-1} 和 1027.92 cm^{-1} 附近并没有出现 C-O 伸缩振动峰,在 1415.68 cm^{-1} 附近没有出现 1 个 CH₃ 弯曲振动和 CH₃ 对称变形振动峰;对酸碱法提取的甲壳素与标准甲壳素进行对比之后可以发现,在 2891.04 cm^{-1} 附近没有出现 C-H 伸缩振动峰,在 1415.68 cm^{-1} 处没有出现 CH₃ 弯曲振

动和 CH_3 对称变形振动峰,在 $1\,316.94\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,260.85\text{ cm}^{-1}$ 处没有出现酰胺 III 谱带,在 751.67 cm^{-1} 附近没有出现 N-H(面外)伸缩振动峰。另外,“酸碱法”提取的甲壳素出现了新的峰,在 $1\,553\text{ cm}^{-1}$ 处出现了 1 个酰胺 II 谱带,在 $1\,116.82\text{ cm}^{-1}$ 处出现了 1 个 C-O 伸缩振动峰。

结果表明,利用菌酶联合法和传统酸碱法提取的甲壳素均能基本保持标准甲壳素的分子特性,但酸碱法提取的甲壳素因出现了 2 个新的峰,在分子结构上与标准甲壳素存在一些差异。因而,通过菌酶联合法制取的甲壳素相比于传统酸碱法提取的甲壳素品质更高,分子结构更完整,更具优势和应用前景。

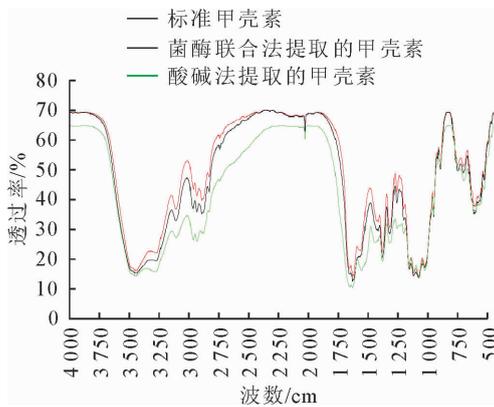


图 14 3 种甲壳素红外光谱图

Fig. 14 Infrared spectrum of the three chitin products

3 结论与讨论

3.1 结论

通过单因素试验得到微生物去除灰分的最佳发酵条件:松墨天牛粉末浓度为 8%,葡萄糖浓度为 8%,凝结芽孢杆菌的接种量为 11%,摇床转速设为 100 r/min ,发酵温度为 47°C ,发酵时间 5 d,最终灰分的平均去除率可以达到 91.72%;正交试验中,当控制葡萄糖浓度 8%,摇床转速为 100 r/min 时,接种量 11%、发酵温度 52°C 、发酵 5 d 时,具有最大的灰分去除率,此时灰分平均去除率可以达到 $(90.38 \pm 0.30)\%$ 。通过极值分析后,正交试验证明了单因素筛选条件为最佳条件。

通过单因素试验确定了蛋白酶去除蛋白质的最佳酶解条件:松墨天牛粉末浓度为 8%,加入蛋白酶 K 的量为 800 U/g ,调节悬浊液的 pH 为 8.0,酶解温度为 55°C ,酶解时间为 9 h,最终蛋白质平均去除率可以达到 $(82.71 \pm 0.82)\%$ 。

利用凝结芽孢杆菌和蛋白酶 K 联合提取松墨天牛甲壳素的系列试验发现,培养基在不灭菌情况

下,按照优化后的条件进行发酵和酶解,最终产物中蛋白质的平均去除率可以达到 $(83.94 \pm 0.58)\%$,灰分去除率可以达到 $(88.77 \pm 1.82)\%$ 。最终甲壳素得率为 32.51%,产物中甲壳素纯度为 72.78%,蛋白质含量为 25.74%,灰分含量为 1.42%。

3.2 讨论

当前甲壳素在食品工业领域^[31-32]、生物医学领域^[33-34]、化妆品行业^[35]、农业领域^[36]、纺织行业^[37]等发展迅速,需求量大。供求关系失衡导致甲壳素价格居高不下,这要求在甲壳素的生产中积极探索新的原材料以降低成本,寻求新方法提高甲壳素产品质量。

目前提取甲壳素多以虾、蟹壳为原料,虽然应用较广但存在以下缺点:1) 虾、蟹壳中灰分含量高,尤其是钙含量,如蟹壳中钙的含量达到 30% 以上,去除难度相对较大,因此从虾、蟹壳提取的甲壳素产品中钙的含量也很高;2) 虾、蟹壳含有多种重金属离子,加大了灰分的脱除难度,而灰分含量是甲壳素的主要质量指标之一,因此从虾、蟹中提取高纯度甲壳素产品难度大,工艺水平要求高;3) 研究表明虾、蟹壳中甲壳素含量一般在 10%~25%^[38-39],相比于昆虫并不高;4) 虾、蟹壳来源相对局限。相对于虾蟹,昆虫种类繁多、种群数量巨大、分布广泛,并且昆虫不受地域和季节性的影响,来源较为丰富。昆虫灰分含量低,甲壳素含量更高,更适合作为提取甲壳素的原材料。现阶段,从昆虫提取甲壳素多局限与研究领域,距离实际生产还有一定距离,如何将试验室成果转化生产力,有待于学者与公司的进一步合作。

本试验将浙江省杭州市富阳区诱捕到的松墨天牛作为原料提取甲壳素,一方面为松墨天牛的清除与再利用提供思路,有效预防松材线虫的二次扩散;另一方面以松墨天牛为原料可降低甲壳素的提取成本,变废为宝。

值得注意的是,由于生物体中甲壳素与蛋白质关系紧密,两者有化学键连接^[40],这加大了提取甲壳素过程中彻底除去蛋白质的难度。此外由于部分人群对昆虫中的特异性蛋白质过敏,甲壳素中残留的蛋白质使其在食用和医疗保健领域受到极大的限制。如何能提取到蛋白质残留量更低甲壳素,使其在这些领域的应用显得尤为重要,这也是“菌酶联合法”提取甲壳素亟需解决的问题之一。

本试验涉及的 2 种提取方法中,相比于菌酶联合法制取甲壳素,酸碱法处理周期更短,提取工艺更简单。但是,酸碱法在提取甲壳素的过程中仍具有不可避免的缺点:1) 需要消耗大量的强酸和强碱;2)

需要不同的处理温度,耗能更高;3)对反应容器要求更加严格,提取有一定的危险性;4)酸碱法所涉及到的强酸和强碱对环境污染严重;5)如若甲壳素产品中残留强酸和强碱,将严重危害人体健康;6)需要重点提到的是,酸碱在去除原料中灰分和蛋白质的同时也会使分子结构发生构象变化,改变甲壳素的分子特性。关于这一点,红外光谱分析中已经证明本试验利用酸碱法提取到的甲壳素分子结构已经发生变化。

目前作为行业研究热点的发酵法,发酵条件更加温和,易于控制;发酵过程对甲壳素的分子结构影响较小,最大限度保持甲壳素分子特性;发酵过程中的废液易于处理,对环境的污染小。但纵观前人研究,此种方法的局限之处在于:1)多使用一种微生物或者几种微生物进行发酵,并没有将现在已经商品化的蛋白酶纳入其中;2)单一微生物发酵时灰分或蛋白质残留高,难以达到工业化生产水准;3)多种微生物发酵时工艺复杂,耗时长。

除此之外,发酵过程所产生的有机钙等副产品会夹杂在甲壳素产品中,不易彻底除去。这些副产品也在某种程度上降低了生产出的甲壳素品质,这一点在用虾蟹壳制取甲壳素时尤为明显,以昆虫作为原料则可以大大避免这个问题,这是因为2种原料中的灰分含量所决定的。

由红外光谱分析结果可知,2种方法提取的甲壳素基本符合标准甲壳素的分子结构,但酸碱法提取的甲壳素出现新的波峰,也就是出现新的基团,这很可能是在酸碱去除灰分和蛋白质的过程中将分子的部分结构改变导致的。而菌酶联合法提取的甲壳素解没有这个问题,这说明,在保持甲壳素分子的结构和特性方面,菌酶联合法要优于酸碱法。相比于发酵法,菌酶联合法反应速率更高,提取工艺更加简单,更符合实际生成应用。本试验中菌酶联合法提取的甲壳素灰分和蛋白质去除率稍低于酸碱法制得的甲壳素,这主要是由于分离技术的受限。试验中松墨天牛粉末的粒级选择在20~100目,较大的粒级降低了菌酶与松墨天牛的接触面积,使得发酵和酶解的效率在一定程度上有所降低,这也限制发酵后期进一步去除大分子包裹下的部分灰分和蛋白质,使得最终通过菌酶联合法制得的甲壳素在灰分和蛋白质去除率上比酸碱法制得的甲壳素灰分和蛋白质稍低。下一步如果能找到更好的从液体培养基中分离甲壳素的方法,采用粒级更小的松墨天牛粉末未来进行提取,一定会大大提高灰分和蛋白质的去除率,使得最终提取的甲壳素产品纯度更高。

本试验中所采用的凝结芽孢杆菌抗逆性强,产

酸性强,繁殖速度快,去除效果好。蛋白酶K的酶解速率高,去除效果也比较好。但目前市面上商业化的蛋白酶K的价格居高不下,单位质量酶活性也相对较低,大规模生产甲壳素需要耗费的蛋白酶量大,经济成本较高。如果能够找到更好的商业生产途径,将大大降低利用菌酶联合法制取甲壳素的经济成本。本试验菌酶联合法蛋白质去除率没有酸碱法高很大程度上受限于底物粒级,下一步可改进分离技术以期提取到纯度更高的甲壳素。

参考文献:

- [1] 边长贤. 纤维素/甲壳素共混膜的制备及应用[D]. 南昌:江西师范大学,2012.
- [2] 孙绪兵,杜京城,由耀辉. 纳米甲壳素的制备、改性及应用研究进展[J]. 高分子通报,2016(8):71-80.
- [3] 陈耀华. 人类第6生命要素——甲壳质(几丁质、几丁聚糖)种子(续三)[J]. 锦州医学院学报,2000,21(1):65-68.
- [4] 刘婉. 甲壳素纤维及其应用[J]. 纺织科技进展,2015(03):4-7.
- [5] 侯佰立. 壳聚糖改良工艺的研究[D]. 广州:广东海洋大学,2011.
- [6] 刘高强,刘卫星,魏美才,等. 虫类甲壳素/壳聚糖的研究及其开发前景[J]. 西北林学院学报,2005,20(4):143-146.
LIU G Q, LIU W X, WEI M C, et al. Development situation and perspectives on chitin and chitosan from insects [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(4): 143-146. (in Chinese)
- [7] 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.
LIU G Q, LIU W X, WEI M C, et al. A preliminary study on the extraction of chitin from pupa of *Dendrolimus punctatus* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(2): 138-141. (in Chinese)
- [8] 蒋晓宇,刘高强,魏美才. 松毛虫作为新食品工业原料的研究进展[J]. 食品科技,2009,34(3):111-114.
JIANG X Y, LIU G Q, WEI M C. Research advances in pine caterpillar(*Dendrolimus* spp.) as a new resource of food industry [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(3): 111-114. (in Chinese)
- [9] 朱巽,旷建军,林仲桂. 南岳松墨天牛生物学特性研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(5):113-115.
ZHU X, KUANG J J, LIN Z G. Bionomics of *Monochamus alternatus* occurring in Nanyue Mountains [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(5): 113-115. (in Chinese)
- [10] 郝德君,张永慧,戴华国,等. 松墨天牛对寄主树木的产卵选择[J]. 昆虫学报,2005,48(3):460-464.
HAO D J, ZHANG Y H, DAI H G, et al. Oviposition preference of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) to host plants [J]. Acta Entomologica, 2005, 48(3): 460-464. (in Chinese)
- [11] 宋红敏,徐汝梅. 松墨天牛的全球潜在分布区分析[J]. 昆虫知识,2006,43(4):535-539.
SONG H M, XU R M. Global potential geographical distribu-

- tion of *Monochamus alternatus* [J]. Entomological Knowledge, 2006, 43(4): 535-539. (in Chinese)
- [12] 朱诚棋, 王博, 沈婧, 等. 松墨天牛综合防治进展[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(2): 19-24.
ZHU C Q, WANG B, SHEN J, *et al.* Research progress on integrated controlling techniques against *Monochamus alternatus* [J]. China Plant Protection Guide, 2017, 37(2): 19-24. (in Chinese)
- [13] 展茂魁. 马尾松蛀干害虫种群动态与松材线虫病的关系及松褐天牛天敌研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [14] 杨建霞, 郝德君, 周曙东, 等. 寄主植物对松墨天牛的营养效应及对体内酯酶与羧酸酯酶活性的影响[J]. 林业科学, 2009, 45(1): 97-101.
YANG J X, HAO D J, ZHOU S D, *et al.* Effects of plant hosts on the nutrient indices and activity of the esterase and carboxylesterase of *Monochamus alternatus* [J]. Forestry Science and Technology, 2009, 45(1): 97-101. (in Chinese)
- [15] 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.
LI Y Y, ZHANG S S, REN G D. The progress of chitin extracted from crustaceans, insects and fungi [J]. Food Research and Development, 2015, 36(7): 122-126. (in Chinese)
- [16] 李晓丹, 赖鹤崑, 林婉琪, 等. 潮汕地区虾蟹壳提取甲壳素的工艺优化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(3): 668-670.
- [17] 胡瑞. 酶解法制备特定重均分子量及窄分布壳寡糖的工艺研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.
- [18] 严丽平. 微波法制备壳聚糖的试验研究[D]. 上海: 东华大学, 2004.
- [19] 张其清, 张瑗, 王临钊, 等. 一种壳聚糖的提取和制备方法[P]. 2017-06-13.
- [20] 段元斐, 何忠诚, 庄桂东, 等. 甲壳素提取新工艺的研究[J]. 食品工业, 2007(3): 7-8.
- [21] 杜敬河. 甲壳素酶产生菌的筛选及酶法制备甲壳低聚糖的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [22] ARBIA W, ARBIA L, ADOUR L, *et al.* Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review [J]. Food Technology and Biotechnology, 2013 (51): 12.
- [23] CIRA L A, HUERTA S, HALL G M, *et al.* Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery [J]. Process Biochemistry, 2002(37): 359-366.
- [24] FLORES-ALBINO B, ARIAS L, GÓMEZ J, *et al.* Chitin and L (+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012(35): 1193-1200.
- [25] GHORBEL-BELLAAJ O, HAJJI S, YOUNES I, *et al.* Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013(61): 243-250.
- [26] GHORBEL-BELLAAJ O, HMIDET N, JELLOULI K, *et al.* Shrimp waste fermentation with *seudomonas aeruginosa* A2: optimization of chitin extraction conditions through plackett-burman and response surface methodology approaches [J]. International Journal of Biological Acromolecules, 2011 (48): 596-602.
- [27] 莫姣娇, 孙强. 昆虫蛋白质含量的测定方法[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(11): 40-41.
- [28] 涂荣秀, 马珺, 陈志兵, 等. 饲用昆虫常规营养成分指标的测定 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(6): 49-50.
- [29] 王少梅, 陈少莲, 崔奕波. 用氯仿-甲醇抽提法测定鱼体脂肪含量的研究 [J]. 水生生物学报, 1993(2): 193-19
WANG S M, CHEN S L, CUI Y B. On the procedures of chloroform-methanol extraction for the determination of lipid content of fish samples [J]. Journal of Hydrobiology, 1993 (2): 193-196. (in Chinese)
- [30] 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.
- [31] 刘高强, 王晓玲. 昆虫壳聚糖在食品工业中的开发应用[J]. 食品科技, 2004(3): 92-94.
- [32] 雷朝亮, 钟昌珍, 宗良炳, 等. 蝇蛆几丁糖保健功能的评价[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(2): 22-26.
- [33] 何玲, 于波, 王慧丽, 等. 甲壳素/壳聚糖生物抗菌敷料在皮肤组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38): 7149-7152.
- [34] 倪天庆, 胡思源. 甲壳素及其衍生物壳聚糖的药理作用和临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 313-316.
- [35] 梁玉佳. 南极磷虾壳中甲壳素的制取与应用[D]. 大连: 大连工业大学, 2013.
- [36] 蒋小姝, 莫海涛, 苏海佳, 等. 甲壳素及壳聚糖在农业领域方面的应用[J]. 中国农学通报, 2013, 29(6): 170-174.
JIANG X T, MO H T, SU H J, *et al.* The application of chitin and chitosan in agriculture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(6): 170-174. (in Chinese)
- [37] 黄立新, 谢林明, 崔毅华. 蛹壳聚糖对真丝织物的抗菌防皱整理[J]. 丝绸, 2003(4): 36-37.
HUANG L X, XIE L M, CUI Y H. Anti-bacterial and crease-resist finishing of silk fabrics with chrysalis chitosan [J]. Silk, 2003(4): 36-37. (in Chinese)
- [38] 赵黎明, 夏文水. 虾蟹壳生产甲壳素废碱液的成分分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 75-77.
ZHAO L M, XIA W S. Component analysis of alkali wastewater from chitin processing [J]. Food Industry Science and Technology, 2009, 30(8): 75-77. (in Chinese)
- [39] 杨慧智. 利用虾蟹壳制甲壳素大有可为[J]. 中国水产, 1984 (7): 26-27.
- [40] 陈宇, 马小军, 谢红国, 等. 去除甲壳素/壳聚糖中蛋白质的研究进展[J]. 现代化工, 2012(Supp. 2): 59-62.
CHEN Y, MA X J, XIE H G, *et al.* Progress in removal protein from chitin/chitosan [J]. Modern Chemical Industry, 2012 (Supp. 2): 59-62. (in Chinese)