

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230090

基于数据挖掘的蟹壳壳聚糖提取工艺

高鑫¹, 曾明², 杨宗政¹, 曹井国¹

(1. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

摘要: 以蟹壳为原料, 结合数据挖掘技术, 利用箱式图、斯皮尔曼相关性和冗余分析等方法进行统计, 选择确定甲壳素脱乙酰过程中的反应条件。在此基础上, 为了证明此次基于数据挖掘的壳聚糖提取条件设计的合理性, 设计了不同反应条件对壳聚糖脱乙酰度影响的响应面实验。结果表明: 最优提取工艺条件为氢氧化钠质量浓度 0.5 kg/L、反应温度 110 °C、反应时间 6 h, 该条件下脱乙酰度达到 89.53%, 壳聚糖性能达到商品壳聚糖的要求。实验数据符合数据挖掘的统计结果, 可以为研究人员提供参考。

关键词: 蟹壳; 壳聚糖; 提取; 数据挖掘; 响应面分析

中图分类号: TQ11; TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2023)05-0030-06

Extraction Technology of Crab Chitosan Based on Data Mining

GAO Xin¹, ZENG Ming², YANG Zongzheng¹, CAO Jingguo¹

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Using crab shells as raw materials, combined with data mining technology, statistical methods such as box plots, Spearman correlation, and redundancy analysis were used to select and determine the reaction conditions during the deacetylation process of chitin. On this basis, in order to demonstrate the rationality of the design of chitosan extraction conditions based on data mining, a response surface experiment was designed to investigate the effect of reaction conditions on the degree of deacetylation of chitosan. The results showed that the optimal extraction process conditions were sodium hydroxide mass concentration of 0.5 kg/L, reaction temperature of 110 °C, and reaction time of 6 h. Under these conditions, deacetylation degree reached 89.53%, and the properties of chitosan performance met the requirements of commercial chitosan. The experimental data conformed to the statistical results of data mining, which can provide reference for researchers.

Key words: crab shells; chitosan; extraction; data mining; response surface analysis

壳聚糖(chitosan)是一种无毒无味、白色或灰白色、半透明、广泛存在于自然界中的天然高分子聚合物^[1]。它主要存在于甲壳类动物、昆虫和真菌中,通过甲壳素脱乙酰基而得到,当脱乙酰度达到 50% 以上时,壳聚糖溶解性能大幅提高^[2-3]。作为一种碱性多糖,壳聚糖的氨基可以连接不同的活性基团,具有不同的生物活性,如抗菌性、吸湿性和生物相容性等,被广泛应用于制药、生物医学、美容和食品包装领域^[4]。

化学法、生化法及微生物法都可以从虾蟹壳中提取壳聚糖。生化法和微生物法比化学法更绿色,但仍有一些障碍需要克服,如发酵过程中部分菌株会改变、破坏 α -甲壳素的晶体结构,降低壳聚糖脱乙酰度,因此不能广泛应用于工业生产。化学法成本较低且适合大规模生产,虾蟹废物可以快速实现可持续利用并应用于商业生产^[5-6]。近年来,大数据分析被用于解决各种工业问题,然而通过数据挖掘分析壳聚糖的化学提取过程还没有被进一步研究^[7]。

收稿日期: 2023-04-12; 修回日期: 2023-06-06

作者简介: 高鑫(1997—), 山西吕梁人, 硕士研究生; 通信作者: 曹井国, 副教授, cjjg@tust.edu.cn

本文总结近年来使用化学法提取壳聚糖的研究文献,采用斯皮尔曼相关性分析和冗余分析法分析脱乙酰过程中氢氧化钠质量浓度、反应温度、反应时间与脱乙酰度的相关性。运用 Box-Behnken 中心设计实验得出甲壳素脱乙酰基的最佳反应条件。最后,对实验提取的蟹壳壳聚糖进行表征分析,为研究人员开发和优化壳聚糖回收方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

蟹壳废料由天津中盛生物工程有限公司提供,蟹壳废料用清水清洗干净,40℃烘干,粉碎后备用。商品壳聚糖(脱乙酰度为80%~95%)购自国药集团化学试剂有限公司。提取所用试剂均为分析纯试剂。

1.2 数据挖掘与处理

从文献库中检索与壳聚糖化学提取相关的研究图片,使用 Origin 软件对图片中的数据^[8-16]进行提取和处理。利用斯皮尔曼相关性热图和冗余分析相关矩阵,评价脱乙酰度与几个反应条件之间的相关性。在热图中,若脱乙酰度与某一影响因素相关性的 P 值小于 0.05,则表示显著相关,如果 P 值小于 0.01,则表示极显著相关。冗余分析的相关性取决于两个因素之间的角度,锐角表示正相关,钝角表示负相关,直角表示不相关^[17-19]。

1.3 甲壳素和壳聚糖的提取

取若干蟹壳粉用质量分数为4%的盐酸浸泡,置于30℃的摇床中持续振荡24h,超纯水反复冲洗沉淀至滤液为中性,在50℃下烘干。将沉淀用质量浓度为0.04 kg/L 的氢氧化钠溶液浸泡,100℃反应6h,用超纯水洗净沉淀,在50℃下烘干沉淀,获得蟹壳甲壳素粗品。通过数据挖掘结果确定脱乙酰过程影响因素的范围,运用响应面设计实验得出蟹壳甲壳素脱乙酰的最佳反应条件,将甲壳素粗品进行脱乙酰化反应,提取壳聚糖。

1.4 验证实验

按照响应面优化条件进行壳聚糖提取实验验证,测定壳聚糖脱乙酰度和提取率,实验重复3次。

1.5 脱乙酰度测定

参照行业标准 FZ/T 50037—2017《壳聚糖纤维脱乙酰度试验方法》测定壳聚糖脱乙酰度,脱乙酰度计算公式见式(1)。

$$D = \frac{(c_1 V_1 - c_2 V_2) \times 16 \times 10^{-3}}{m \times 0.0994} \times 100\% \quad (1)$$

式中: D 为脱乙酰度; c_1 为盐酸标准滴定溶液的物质浓度, mol/L; V_1 为加入盐酸标准滴定溶液的体积, mL; c_2 为氢氧化钠标准滴定溶液的物质浓度, mol/L; V_2 为滴定所消耗的氢氧化钠标准滴定溶液的体积, mL; 16 为自由氨基的摩尔质量的数值; m 为壳聚糖质量, g; 0.0994 为理论氨基含量。

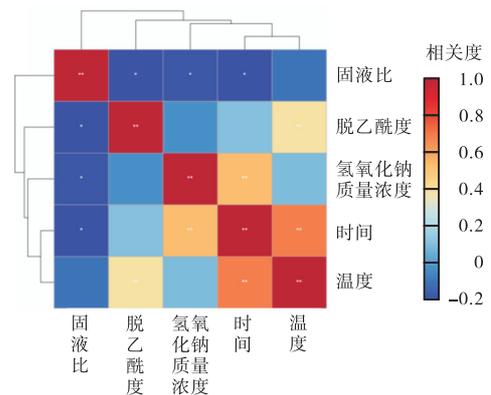
1.6 壳聚糖表征

使用傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR)、扫描电子显微镜 (SEM) 和 X 射线衍射 (XRD) 技术对最优条件下制得的壳聚糖进行表征,通过 XRD 图谱比较壳聚糖的结晶度。FTIR 的扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , XRD 的扫描范围为 5°~60°。

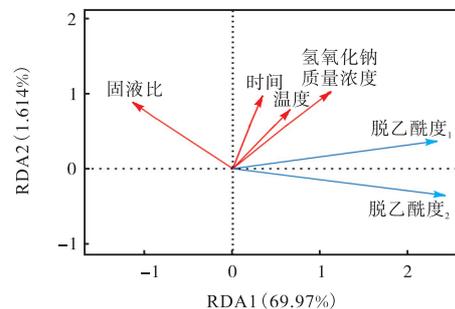
2 结果与讨论

2.1 脱乙酰度与其他因素的相关性分析

反应条件对脱乙酰度影响的斯皮尔曼相关性分析和冗余分析法分析结果如图1所示。



(a) 斯皮尔曼相关性热图



(b) 冗余分析相关性图

图1 反应条件对脱乙酰度影响的斯皮尔曼相关性分析和冗余分析法分析结果

Fig. 1 Spearman correlation analysis and redundancy analysis results of the effect of reaction conditions on deacetylation degree

从图1中可以看出:固液比和脱乙酰度之间存在

一定的负相关性,表明随着固液比的增大,脱乙酰度逐渐下降;氢氧化钠质量浓度、反应温度和反应时间与脱乙酰度呈正相关。

2.2 壳聚糖脱乙酰条件优化

基于数据挖掘结果,设计实验:氢氧化钠质量浓度为 0.1~0.5 kg/L,反应温度为 80~120 °C,反应时间为 2~6 h,实验因素与水平见表 1。姜金壮^[20]设置固液质量比为 1:100,考虑到实际实验效果以及实验环境,本实验确定固液质量比为 1:50, Box-Behnken 实验设计与数据分析结果见表 2。

表 1 响应面设计因素与水平

Tab. 1 Response surface design factors and levels

水平	氢氧化钠质量浓度 (X_1)/(kg·L ⁻¹)	温度(X_2)/°C	时间(X_3)/h
-1	0.1	80	2
0	0.3	100	4
1	0.5	120	6

表 2 Box-Behnken 实验设计与数据分析结果

Tab. 2 Box-Behnken experimental design and data analysis results

实验号	X_1 /(kg·L ⁻¹)	X_2 /°C	X_3 /h	壳聚糖脱乙酰度/%	
				实验值	预测值
1	0.1	80	4	25.50	24.18
2	0.3	80	6	60.76	60.31
3	0.3	80	2	48.57	48.78
4	0.5	80	4	69.61	71.16
5	0.3	100	4	55.77	56.52
6	0.3	100	4	56.41	56.52
7	0.5	100	6	90.78	89.67
8	0.1	100	6	35.01	36.52
9	0.3	100	4	58.83	56.52
10	0.3	100	4	54.43	56.52
11	0.3	100	4	57.15	56.52
12	0.5	100	2	79.12	77.36
13	0.1	100	2	27.48	28.59
14	0.3	120	6	70.26	10.05
15	0.3	120	2	60.64	61.09
16	0.1	120	4	32.91	31.35
17	0.5	120	4	84.73	86.04

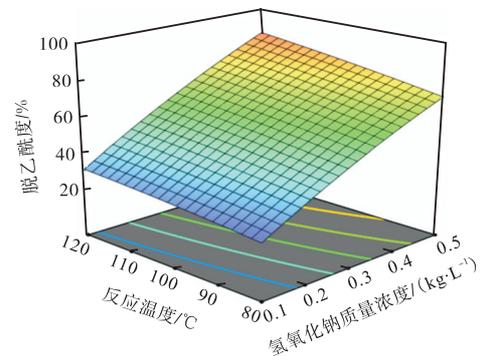
利用 Desgin-Expert 13 响应面软件进行二次多元回归拟合,得出蟹壳壳聚糖脱乙酰度对 3 个单因素的二次回归模型,见式(2)。

$$D = 56.52 + 25.42X_1 + 5.51X_2 + 5.13X_3 + 1.93 X_1X_2 - 0.642 5X_1X_3 - 2.65X_1^2 - 0.685 3X_2^2 - 4.22X_3^2 \quad (2)$$

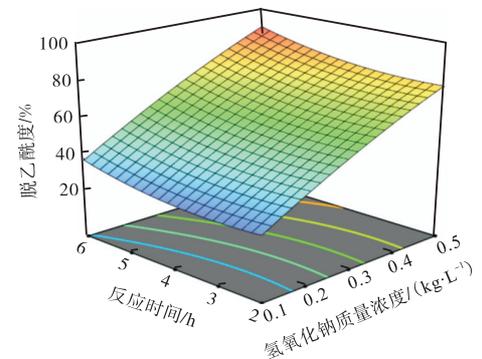
壳聚糖脱乙酰度的统计学分析结果表明,各因素之间存在显著的相关性。由回归模型的方差分析结果可知, $P < 0.000 1$,表明模型高度显著,回归方程结

果与实验结果较吻合,实验误差小; $P_{\text{大拟}} = 0.233 1 > 0.05$,说明模型失拟度不显著。模型的调整决定系数 R_{Adj}^2 为 98.89%,方程拟合程度良好,实验误差较小,可以用此模型对壳聚糖脱乙酰度进行分析和预测。

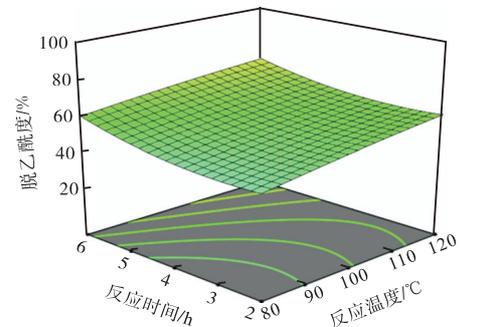
反应条件对脱乙酰度影响的响应面图如图 2 所示。从图 2(a)中可以看出:反应时间为 4 h 时,氢氧化钠质量浓度和反应温度的交互作用明显,对壳聚糖脱乙酰度有正向的影响;随着氢氧化钠质量浓度和反应温度的增大,脱乙酰度逐渐增大,当氢氧化钠质量浓度为 0.5 kg/L 时,脱乙酰度达到最高,表明此时为脱乙酰反应的最佳质量浓度。



(a) 反应温度和氢氧化钠质量浓度对脱乙酰度的影响



(b) 反应时间和氢氧化钠质量浓度对脱乙酰度的影响



(c) 反应温度和反应时间对脱乙酰度的影响

图 2 反应条件对脱乙酰度影响的响应面图

Fig. 2 Response surface graph of the effect of reaction conditions on deacetylation degree

图 2(b)表明:当反应温度为 100 °C 时,脱乙酰度随着氢氧化钠质量浓度与反应时间的增加而增加。图 2(c)表明:反应时间与反应温度对脱乙酰过程无显著影响,延长反应时间,脱乙酰度增加不明显。根据响应面优化结果得出,壳聚糖脱乙酰最优提取工艺条件为:氢氧化钠质量浓度 0.5 kg/L、反应温度 110 °C、反应时间 6 h。在此工艺条件下,壳聚糖脱乙酰度可以达到 93.18%。

2.3 验证实验

验证实验结果见表 3。从表 3 中可以得出,壳聚糖脱乙酰度最高为 93.43%,提取率最大为 19.66%。

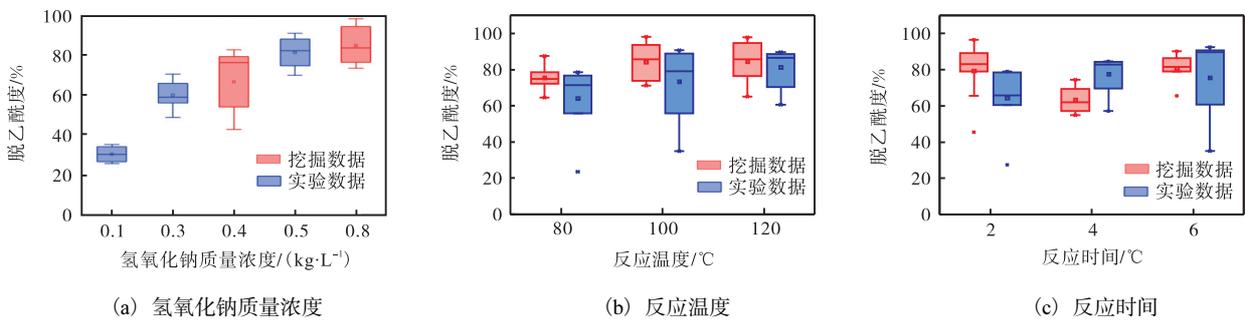


图 3 基于数据挖掘和实验数据的反应条件对脱乙酰度的影响

Fig. 3 Effect of reaction conditions on deacetylation degree based on data mining and experimental data

由图 3 可知,随着氢氧化钠质量浓度、反应温度的升高,壳聚糖的脱乙酰度不断增大,与数据挖掘结果基本一致。在常规工艺中,脱乙酰基反应在 0.4 ~ 0.8 kg/L 的氢氧化钠溶液中进行,所得脱乙酰度为 70% ~ 85%^[8-16,21]。在本实验中,当氢氧化钠质量浓度为 0.1 kg/L 时,脱乙酰度小于 40%,而氢氧化钠质量浓度达到 0.5 kg/L 时,脱乙酰度最大值可达 90.78%。甲壳素在脱除乙酰基时,高分子链结构阻碍 OH⁻ 与羰基的结合,随着碱液浓度的增加,溶液中 OH⁻ 浓度增大,OH⁻ 与羰基得到充分接触。当反应温度升高时,体系内的分子运动加快,分子间碰撞概率增大,壳聚糖脱乙酰度大幅增加,在温度为 100 °C 时,脱乙酰度达到最大。从图 3(c) 实验数据可知,反应时间对脱乙酰度的影响为正相关,部分实验数据低于挖掘数据,原因是挖掘数据中存在部分物理辅助提取方法(如微波加热等)的实验结果,在相同时间下,这些结果表现出较高的脱乙酰度^[12]。

2.5 傅里叶变换红外光谱分析

红外光谱可以反映壳聚糖的化学结构,包括其共同的特征峰和特殊的振动^[22],理论上壳聚糖在 1650、1620 和 1550 cm⁻¹ 处有特征峰。上述响应面最优条件下提取的蟹壳壳聚糖与商品壳聚糖的红外光谱

与响应面分析结果一致,表明工艺稳定可靠。

表 3 验证实验结果

Tab. 3 Validation test results

实验号	蟹壳质量/g	脱乙酰度/%	提取率/%
1	4.999 7	92.12	19.52
2	4.963 4	93.43	19.66
3	5.239 3	83.03	18.63
平均值	5.067 5	89.53	19.27

2.4 基于数据挖掘的对比分析

基于数据挖掘和实验数据的反应条件对脱乙酰度的影响如图 3 所示。

对比图如图 4 所示。在 3300 ~ 3400 cm⁻¹ 和 2871 ~ 2920 cm⁻¹ 处的特征峰,分别对应壳聚糖的—OH 和—CH 的拉伸振动;位于 1650 cm⁻¹ 和 1557 cm⁻¹ 处的特征峰,分别对应酰胺 I 的伸缩振动和酰胺 II 的弯曲振动;本文样品的特征峰与商用壳聚糖基本一致。另外,通过红外光谱中 1620 ~ 1660 cm⁻¹ 的振动模式,可以区分 α -壳聚糖和 β -壳聚糖。

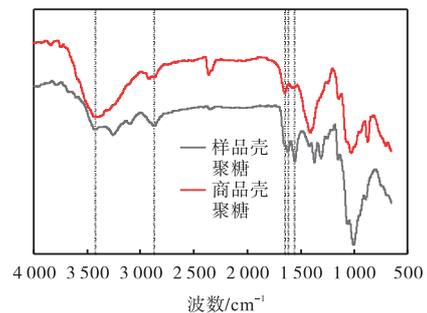


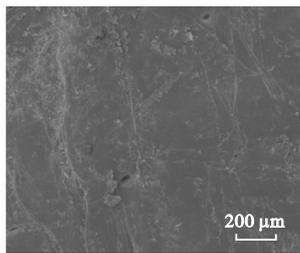
图 4 壳聚糖红外光谱图对比

Fig. 4 Comparison of chitosan infrared spectra

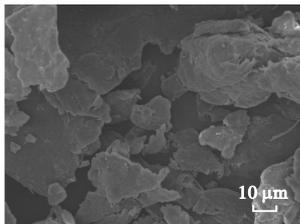
α -壳聚糖在 1660 cm⁻¹ 和 1627 cm⁻¹ 处可观察到 2 个特征峰,而 β -壳聚糖在 1656 cm⁻¹ 处只有 1 个特征峰存在^[23-24]。样品壳聚糖在 1650 cm⁻¹ 和 1622 cm⁻¹ 附近有 2 个特征峰,属于 α -壳聚糖。

2.6 扫描电子显微镜分析

利用扫描电子显微镜对样品进行观察,不同倍数的蟹壳壳聚糖的扫描电子显微镜图如图 5 所示。在低倍数下,壳聚糖表面光滑、平整,部分区域可以看见孔隙;随着倍数的增大,可以观察到表面薄片的无规则排列,有很明显的层状结构。这是由于壳聚糖脱乙酰化反应后发生解聚,原本聚集的块状薄片被打散为更多的单层薄片结构,这与 Kucukgulmez 等^[25]从贝壳中提取壳聚糖的结果一致。



(a) 低倍数



(b) 高倍数

图 5 壳聚糖的扫描电子显微镜图

Fig. 5 Scanning electron microscopy of chitosan

2.7 X 射线衍射分析

一般来说,虾和蟹外骨骼中甲壳素和壳聚糖在 2θ 为 $9^\circ \sim 10^\circ$ 和 $20^\circ \sim 21^\circ$ 处有 2 个衍射峰,当壳聚糖分子间和分子内氢键较强时,表现为更高的结晶度和更紧密的结构^[9-10]。通过 X 射线衍射,对商品壳聚糖和蟹壳壳聚糖进行分析,结果如图 6 所示。

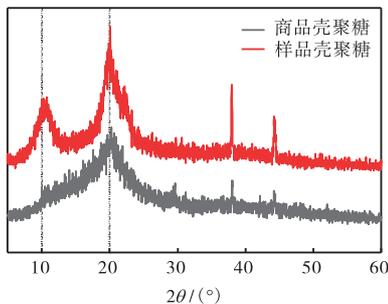


图 6 壳聚糖 XRD 图谱对比

Fig. 6 Comparison of XRD diffraction patterns of chitosan

两种壳聚糖均在 20° 处存在尖锐的峰,呈现出非

晶体结构。不同于商品壳聚糖的是,蟹壳壳聚糖在 10° 处出现新的衍射峰,峰强度低于 20° 时的峰强度,可能是因为在结合水^[9],符合虾蟹壳聚糖的衍射峰变化^[26]。

3 结 论

(1) 利用数据挖掘技术、箱式图、斯皮尔曼相关性分析和冗余分析法对甲壳素脱乙酰基过程进行统计分析,得出脱乙酰度与其他因素的相关性:氢氧化钠质量浓度、反应时间、反应温度与壳聚糖脱乙酰度呈正相关。

(2) 本次实验主要以蟹壳为原料提取壳聚糖,响应面实验结果表明脱乙酰过程最优工艺条件为:氢氧化钠质量浓度 0.5 kg/L 、反应时间 6 h 、反应温度 110°C 。该条件下脱乙酰度达到 89.53% 。与数据挖掘结果相比,壳聚糖的脱乙酰度得以优化,实现了蟹壳资源的有效利用。

(3) 表征结果证明本文所得蟹壳壳聚糖结构属于 α -壳聚糖,呈片状结构,结晶度较低。

参考文献:

- [1] 何志刚,王冬武,李金龙,等. 克氏原螯虾废弃物综合处理及在饲料中的应用[J]. 江西饲料,2017(3):1-6.
- [2] PAKIZEH M, MORADI A, GHASSEMI T. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells[J]. European polymer journal, 2021, 159: 110709.
- [3] SYNOWIECKI J, AL-KHATEEB N A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2003, 43(2): 145-171.
- [4] 袁媛,荣雅利,杨丰,等. 甲壳素/壳聚糖的分离提取方法及在食品工业中的应用研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 252-258.
- [5] HUANG C Y, KUO C H, WU C H, et al. Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity[J]. Food chemistry, 2018, 254: 217-223.
- [6] MOHAN K, GANESAN A R, EZHILARASI P N, et al. Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: a review[J]. Carbohydrate polymers, 2022, 287: 119349.

- [7] 刘颖. 浅谈大数据背景下数据挖掘技术应用的改进[J]. 科技与创新, 2022(18): 176-178.
- [8] IBRAM A, IONESCU A M, CADAR E. Comparison of extraction methods of chitin and chitosan from different sources[J]. European journal of natural sciences and medicine, 2019, 2(2): 23-36.
- [9] ABDON E S, NAGY K S A, ELSABEE M Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources[J]. Bioresource technology, 2008, 99(5): 1359-1367.
- [10] ALISHAHI A, MIRVAGHEFI A, TEHRANI M R, et al. Enhancement and characterization of chitosan extraction from the wastes of shrimp packaging plants[J]. Journal of polymers and the environment, 2011, 19: 776-783.
- [11] KNIDRI H E L, DAHMANI J, ADDAOU A, et al. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 139: 1092-1102.
- [12] NOURI M, KHODAIYAN F, RAZAVI S H, et al. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology[J]. Food hydrocolloids, 2016, 59: 50-58.
- [13] PUVVADA Y S, VANKAYALAPATI S, SUKHAVASI S. Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry[J]. International current pharmaceutical journal, 2012, 1(9): 258-263.
- [14] MAREI N H, EL-SAMIE E A, SALAH T, et al. Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt[J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 82: 871-877.
- [15] SARBON N M, SANDANAMSAMY S, KAMARUZAMAN S F S, et al. Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties[J]. Journal of food science and technology, 2015, 52: 4266-4275.
- [16] KUMARI S, ANNAMAREDDY S H K, ABANTI S, et al. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 104: 1697-1705.
- [17] HOSNEY A, ULLAH S, BARČAUSKAITĖ K. A review of the chemical extraction of chitosan from shrimp wastes and prediction of factors affecting chitosan yield by using an artificial neural network[J]. Marine drugs, 2022, 20(11): 675.
- [18] XU X X, LIU S, ZENG M, et al. Deciphering response effect and underlying mechanism of anammox-based nitrogen removal process under exposures to different antibiotics via big data analysis[J]. Bioresource technology, 2022, 347: 126674.
- [19] XU X X, DU T T, GUO D, et al. Deciphering and predicting anammox-based nitrogen removal process under oxytetracycline stress via kinetic modeling and machine learning based on big data analysis[J]. Science of the total environment, 2021, 796: 148980.
- [20] 姜金壮. 虾壳几丁质制备高脱乙酰度壳聚糖及其微球[D]. 保定: 河北大学, 2021.
- [21] RASWEEFALI M K, SABU S, SUNOOJ K V, et al. Consequences of chemical deacetylation on physicochemical, structural and functional characteristics of chitosan extracted from deep-sea mud shrimp[J]. Carbohydrate polymer technologies and applications, 2021, 2: 100032.
- [22] JANG M K, KONG B G, JEONG Y I, et al. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources[J]. Journal of polymer science part A: polymer chemistry, 2004, 42(14): 3423-3432.
- [23] CÁRDENAS G, CABRERA G, TABOADA E, et al. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ^{13}C cross polarization/mass angle spinning NMR[J]. Journal of applied polymer science, 2004, 93(4): 1876-1885.
- [24] FOCHER B, NAGGI A, TORRI G, et al. Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions: evidence from CP-MAS ^{13}C -NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy[J]. Carbohydrate polymers, 1992, 17(2): 97-102.
- [25] KUCUKGULMEZ A, CELIK M, YANAR Y, et al. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells[J]. Food chemistry, 2011, 126(3): 1144-1148.
- [26] ZHANG W, JIANG Q X, SHEN J D, et al. The role of organic acid structures in changes of physicochemical and antioxidant properties of crosslinked chitosan films[J]. Food packaging and shelf life, 2022, 31: 100792.