



Verkenkend onderzoek naar selectieve gravimetrische bepalingen van plantaardige vezels en chitine

Bachelorproef Lotte Devocht
en Ben Kerkaert

Promotor: Mik Van Der Borght

KU Leuven



Interreg 
EUROPESE UNIE
Vlaanderen-Nederland
Europees Fonds voor Regionale Ontwikkeling

entomo **SPEED**

Verkennd onderzoek naar selectieve gravimetrische bepalingen van plantaardige vezels en chitine

Lotte Devocht en Ben Kerkaert

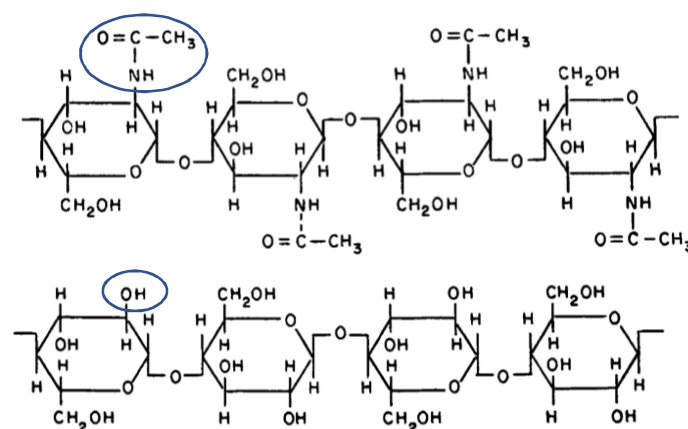
Abstract

Tijdens dit project werd nagegaan of het mogelijk is om via een gravimetrische analyse een onderscheid te maken tussen chitine en plantaardige vezels. In het onderzoek werden chitine- en vezelbepalingen uitgevoerd op de prepoppen van *Hermetia illucens* en op tarwezemelen, met de veronderstelling dat de prepoppen geen plantaardige vezels bevatten, terwijl de zemelen geen chitine bevat. De chitinebepaling is gebaseerd op een methode beschreven door Liu *et al.* (2012). In deze methode wordt het substraat achtereenvolgens in zuur (HCl) en basisch (NaOH) milieu opgelost. De ruwe vezelbepaling is gebaseerd op de commissierichtlijn 92/89/EEG. In deze methode wordt het substraat achtereenvolgens in een zuur (HCl) en een basisch (KOH) milieu behandeld. Zowel de chitinebepaling op de zemelen als de ruwe vezelbepaling op de prepoppen leverden hoeveelheden op die significant groter waren dan nul. Het is dus niet mogelijk om met behulp van de ruwe vezelbepaling en de chitinebepaling een uitspraak te doen over de hoeveelheid ruwe vezels en de hoeveelheid chitine in een substraat dat beiden bevat. De gebruikte bepalingen zijn dus onvoldoende selectief. Een mogelijke oplossing hiervoor is het gebruik van selectieve enzymen in de gravimetrische methode. Een bijkomend eerder praktisch probleem is de omslachtige filtratie van de chitine. Hier zou als alternatief kunnen worden overgeschakeld naar een glasfilter met een filtratiebed van decaliet. Dit verkennend onderzoek maakt duidelijk dat verder onderzoek nodig is om een praktische en selectieve gravimetrische bepaling van chitine te bekomen.

Trefwoorden: *Hermetia illucens*; chitinebepaling; ruwe vezelbepaling; tarwezemelen; gravimetrie

Inleiding

Chitine, of poly-(N-acetyl-1,4- β -D-glucopyranosamine), komt voor in het exoskelet van geleedpotigen, zoals schaaldieren of insecten, en in de celwand van schimmels (Tianhong *et al.*, 2011). Chitine kent drie verschillende kristalstructuren, namelijk de α -, β - en γ -structuur. α -chitine is de meest voorkomend en stabiele vorm omdat de moleculen gealigneerd zijn op een antiparallelle manier. Dit is gunstig voor de vorming van sterke inter- en intramoleculaire waterstofbruggen. α -chitine is hierdoor slecht oplosbaar in de meeste organische solventen. β - en γ -chitine zijn beter oplosbaar, maar komen minder in de natuur voor (Kurita, 2001).



Figuur 1: Chitine (boven) heeft een NCOCH_3 -groep op de C2-positie in plaats van een OH -groep bij cellulose (onder) (Stelmock *et al.*, 1985).

Uit *Figuur 1* blijkt dat de structuur van chitine sterk lijkt op deze van cellulose ($C_6H_{10}O_5$)_n, het voornaamste bestandsdeel van plantaardige vezels (Klemm *et al.*, 2005). Het enige verschil is dat Chitine een NCOCH₃-groep heeft op de C2-positie in plaats van een OH-groep bij cellulose. Omwille van deze sterke gelijkheid worden methodes voor de bepaling van plantaardige vezels vaak toegepast voor het bepalen van het chitinegehalte. Weiser *et al.* (1997) en Akaki en Duke (1999) zijn van mening dat de methodes voor plantaardige vezels ook geschikt zijn voor een chitinebepaling. Toch is het niet zeker dat deze methoden resulteren in juiste chitinewaarden voor insecten (Cools *et al.*, 2014). De Acid-Detergent Fibre (ADF) bepaling van Van Soest (1973) bepaalt de vezelfractie die onoplosbaar is in zuur, namelijk het gehalte aan cellulose en lignine (Cools *et al.*, 2014). Watkins *et al.* (1982) bepaalden het chitinegehalte in koningskrab en garnalen via een demineralisatie met mierenzuur en een eiwitextractie met NaOH. De chitine- en ADF-waarden kwamen sterk overeen. De kleine verschillen tussen deze waarden zouden te wijten zijn aan de aanwezigheid van silica, en het mogelijks oplossen van een deel van het chitine tijdens het demineralisatieproces (Watkins *et al.*, 1982). Finke (2007) paste een ADF-bepaling toe op meerdere insecten. Daarnaast voerde Finke (2007) ook een stikstof- en aminozuuranalyse uit op de ADF-fractie. Die ADF-fractie bevatte naast chitine ook 9 tot 32% aminozuren. Deze aminozuren bleken specifieke eiwitten uit het cuticulum van de insecten te zijn. De ADF bepaling gebruiken als maat voor chitine bij insecten leidde dus tot een overschatting van het chitinegehalte.

De data over chitinegehaltenes en methodes voor de bepaling van chitine in insecten zijn beperkt. De meeste studies zoals die van Liu *et al.* (2012) passen succesvolle methodes voor chitinebepaling in schaaldieren toe om het chitinegehalte te bepalen in insecten. Black en Schwartz (1950) en Setoguchi *et al.* (2012) ontwikkelden methodes om chitine in schaaldieren te bepalen, maar geen enkele methode voor een bepaling in schaaldieren is universeel aanvaard. Het succes van de klassieke vezelmethodes voor de bepaling van chitine in schaaldieren betekent niet dat ze ook succesvol zullen zijn voor de chitinebepaling in insecten. Het exoskelet van insecten en schaaldieren verschilt immers structureel. Het cuticulum van een insect is niet enkel opgebouwd uit chitine, eiwitten en mineralen, maar ook uit vetten en andere componenten. De opbouw is complexer dan bij schaaldieren (Finke, 2007).

Tot nu toe is er nog geen selectieve methode ontwikkeld voor de bepaling van het chitinegehalte in insecten. Het doel van dit project is dan ook om de eerste stappen te zetten in het maken van een onderscheid met een gravimetrische bepaling tussen plantaardige vezels en chitine wanneer beide componenten aanwezig zijn in een mengsel. Hiervoor werden op de prepopen van *Hermetia illucens* en op tarwezemelen zowel een gravimetrische chitine- als een ruwe vezelbepaling uitgevoerd. Prepopen ledigen hun maag-darmstelsel vooraleer ze het substraat verlaten. Hierdoor bevatten ze geen plantaardige vezels meer (Sheppard *et al.*, 1994). Er wordt tegelijkertijd verondersteld dat zemelen geen chitine bevatten. Er werd voor deze monsters gekozen omdat er geen chitinestandaarden voor handen zijn en omdat de kostprijs van vezelstandaarden hoog is.

Materiaal en methoden

Voorbehandeling, bepaling vocht- en vetgehalte

De prepopen van *Hermetia illucens* werden gekweekt op supermarktafval en geogost nadat ze uit het substraat waren gemigreerd. Vervolgens werden ze afgespoeld, ingevroren bij -20 °C en gevriesdroogd. Van beide monsters werd het vochtgehalte bepaald door ze gedurende 17u in een geventileerde oven te plaatsen bij 105 °C. Het vetgehalte werd bepaald met de Soxhletmethode, waarbij petroleumether gebruikt werd als solvent.

Vervolgens werd een chitine -en vezelbepaling uitgevoerd op de gevriesdroogde en ontvette zemelen en prepopen. Elke bepaling werd drie keer uitgevoerd.

Chitine- en ruwe vezelbepaling

Voor de ruwe vezelbepaling werd van de ontvette en fijngemalen monsters 1g op 0,0001g nauwkeurig in een rondbodemkolf van 250 ml afgewogen. Hierbij werd er 1g filtreerhulpmiddel (decaliet) en 150 ml 0,13 M H₂SO₄ (Analytisch reagens, Fisher Scientific) toegevoegd. Dit geheel werd gekookt onder reflux voor 30 minuten, waarna het mengsel werd gefilterd met een glasfilterkroes met poriën van 40 - 90µm. Het residu werd onder vacuüm driemaal, met telkens 30 ml kokend water, gewassen. Na elke wasstap werd het residu droog gezogen. Het residu werd vervolgens kwantitatief terug overgebracht in de eerder gebruikte rondbodemkolf. Hierbij werd er 150 ml 0,23 M KOH (zuiverheid > 85 %, Fisher Scientific) toegevoegd. Dit geheel werd weer gekookt onder reflux gedurende 30 minuten, waarna terug een filtratie plaats vond op dezelfde manier als met het zwavelzuur. Na de laatste wasstap werd het residu droog gezogen. Het residu werd dan nog driemaal gewassen met 25 ml aceton (technische kwaliteit, VWR Chemicals). Ook hier werd het residu droog gezogen na elke wasstap. De filterkroes werd na het wassen gedroogd in de droogstoof bij 130 °C tot een constant gewicht werd bereikt. Vervolgens werd de filterkroes in de moffeloven geplaatst. De inhoud werd verast voor 30 minuten bij 500 °C. Het massaverschil tussen het gedroogde filtraat en het veraste filtraat leverde de massa aan vezels op.

De chitinebepaling werd als volgt uitgevoerd. Met behulp van een analytische balans werd 1g gevriesdroogde, ontvette en fijngemalen poeder afgewogen in een rondbodemkolf tot op 0,0001g. Hierna werd aan de kolf 10,0 ml gedemineraliseerd water en 810 µL 40 % NaOH (99% zuiver, VWR Chemicals) toegevoegd. In de volgende stap werd de oplossing gedurende 4 u op 55 °C verwarmd met een refluxopstelling. Vervolgens werd de oplossing overgebracht in een falcontube en werd deze gecentrifugeerd gedurende 45 minuten bij 3500 g. Na het centrifugeren werd de bovenstaande vloeistof gedecanteerd en verwijderd. Het bezinksel werd toegevoegd aan 50 ml 1,0 M HCl (Analytisch reagens, VWR Chemicals) in een rondbodemkolf van 100 ml. Hierna volgde een nieuwe verwarmingsstap gedurende 30 minuten op 100 °C onder constant roeren. De bekomen oplossing werd over een Büchnerfilter gefiltreerd en gespoeld met demiwater tot neutrale pH. Voor de filtratie over de Büchnerfilter werd gebruik gemaakt van een katoenen doek. Deze doek werd op voorhand gedroogd op 50 °C en gewogen. De massa die achterbleef op de filter werd opnieuw in dezelfde rondbodemkolf gebracht. Hierbij werd 50,0 ml 1,0 M NaOH toegevoegd en verwarmd voor 17 u op 80 °C onder constant roeren. Na 17 uur werd de massa opnieuw gefilterd over een Büchnerfilter met doek en gespoeld met demiwater tot neutrale pH. De massa op de doek werd vervolgens opnieuw overgebracht in de rondbodemkolf en gedurende 5u roerend verwarmd in 50 ml 1,0 M NaOH. Tot slot werd de bekomen massa opnieuw gefilterd over een Büchnerfilter met doek. De massa werd dan op de doek gedroogd op 50 °C gedurende 2,5 uur. Het massaverschil tussen de massa van de gedroogde doek met staal en de massa van de gedroogde doek gaf de massa van de geëxtraheerde chitine uit het staal.

Om de werkelijke massafractie aan chitine en vezels te bekomen moet het droge stofgehalte en het vetgehalte van het staal ook in rekening worden gebracht:

$$\beta_{\text{chitine/vezel}} = \frac{m_{\text{chitine/vezel}} \times \left(1 - \frac{\beta_{\text{vet}}}{100}\right)}{m_{\text{monster}} \times \frac{\beta_{\text{droge stof}}}{100}} \quad \text{Formule 1}$$

met:

$\beta_{\text{chitine/vezel}}$ = massafractie chitine/vezel

$\beta_{\text{droge stof}}$ = massafractie (%) droge stof in gevriesdroogd en ontvet monster

β_{vet} = massafractie (%) vet in gevriesdroogd monster (op basis van droge stof)

m_{monster} = massa (g) afgewogen gevriesdroogd en ontvet monster

$m_{\text{chitine/vezel}}$ = massa (g) gedroogd chitine/ruwe vezel

De cumulatieve standaarddeviatie werd bepaald door gebruik te maken van de GUM-methode (Guide to the Expression of Uncertainty). De experimenten leveren te weinig resultaten om te onderzoeken of er een normale verdeling geldt. Daarom wordt er gebruik gemaakt van een niet-parametrische test, namelijk een One-sample Wilcoxon signed rank test. Deze test wordt uitgevoerd met het programma SPSS Statistics 25.0.

Resultaten en bespreking

De resultaten van de ontvetting en de bepaling van het droge stofgehalte van stalen die gebruikt zijn, werden op voorhand aangereikt en staan weergegeven in *Tabel 1*.

Tabel 1: Gemiddeld vetgehalte (%) ± de standaarddeviatie (n = 3) van de prepoppen en zemelen samen met het gemiddeld droge stofgehalte (%) ± de standaarddeviatie (n=3) van de ontvette prepoppen en zemelen.

Staal	Droge stofgehalte ontvette monsters	Vetgehalte
Prepoppen	93,72 ± 0,04	41,24 ± 0,01
Zemelen	93,27 ± 0,04	3,78 ± 0,02

Tabel 2 toont de resultaten van de chitine- en de ruwe vezelbepaling. In deze tabel werd er reeds rekening gehouden met de vetgehaltes en de droge stofgehaltes die werden aangereikt.

Tabel 2: Bekomen massafracties(in g vezels/chitine per g droge stof) aan ruwe vezels en chitine na de ruwe vezelbepaling en chitinebepaling op prepoppen en zemelen.

	Chitinebepaling		Ruwe vezelbepaling	
	Prepoppen	Zemelen	Prepoppen	Zemelen
Staal 1	0,069	0,049	0,111	0,111
Staal 2	0,074	0,051	0,102	0,100
Staal 3	0,059	0,051	0,089	0,106
Gemiddelde	0,067	0,051	0,101	0,106
Standaarddeviatie	0,012	0,006	0,018	0,008

Bij de chitinebepaling uit de prepoppen en bij de ruwe vezelbepaling op de zemelen worden waarden bekomen die overeenkomen met eerder bekomen resultaten door de onderzoeksgroep. Bij het filteren was het filtraat bij beide bepalingen wel niet volledig zuiver. Dit doet vermoeden dat er verkeerde filters zijn gebruikt. Het filtreren is het essentiële onderdeel van de beide bepalingen. De filters bleken over te grote poriëngroottes te beschikken. Op deze manier konden partikels ruwe vezels of chitine die klein genoeg waren toch door de filters. De glasfilter kan vervangen worden door een glasfilter met kleinere poriën.

Filterpapier van het type Black ribbon (454,VWR) zal een beter resultaat geven dan de doek, maar het filteren gaat hiermee veel te traag. Vandaar dat er gebruik werd gemaakt van een katoenen doek, maar een doek is niet vervaardigd voor een analytisch labo. Bijgevolg is het ook niet geschikt om te selecteren op deeltjesgrootte. Een filterbed van decaliet op een glasfilter zou hier in de plaats kunnen gebruikt worden. Voor de zemelen had er ook een standaard kunnen gebruikt worden, maar deze is zeer duur. Voor chitine bestaat er geen standaard als substraat, met behulp van een standaard zou de selectiviteit van de methodes nauwkeuriger bepaald kunnen worden.

Het gebruik van de One-sample Wilcoxon signed rank test gaf als resultaat dat zowel de massafracties chitine uit zemelen, als de massafracties zemelen uit prepopen significant groter zijn dan nul (respectievelijk $p = 0,109$ en $p = 0,109$). Noch de ruwe vezelbepaling noch de chitinebepaling die hierboven staan beschreven slagen erin om een onderscheid te maken tussen de beide. In beide methodes wordt geprobeerd om met behulp van een verschil in temperatuur, duur en concentratie aan base en zuur een onderscheid te maken. Cellulose en chitine blijken structureel te sterk op elkaar te gelijken om op deze manier een onderscheid te kunnen maken.

Een beter alternatief zou het gebruik van een enzymatisch-gravimetrische methode kunnen zijn, omdat enzymen selectief tewerk gaan. Chitinasen zouden dan chitine kunnen afbreken, waardoor het oplosbaar wordt. Er zijn verschillende soorten chitinasen, ze behoren tot verschillende families van de glycosylhydrolasen (GH). De twee grootste families zijn GH18 en GH19 (Zhang *et al.*, 2011). De afbraak van chitine resulteert in de vorming van chito-oligosacchariden die op hun beurt kunnen worden omgezet naar N-acetylglucosamine-monomeren door inzet van N-acetylglucosaminidases (Hartl *et al.*, 2012). Cellulose afbraak gebeurt meestal met ten minste drie enzymen: endo- β -cellulase, exo- β -cellulase en β -glucosidase. Die enzymen werken samen bij het afbreken van cellulose tot β -glucose (Horn *et al.*, 2012).

Een moeilijkheid bij deze piste is dat het enige verschil tussen cellulose en chitine de functionele groep is op koolstof twee (zie *Figuur 1*). Enzymen moeten zeer specifiek zijn voor chitine en voor cellulose. De enzymen die nu gebruikt worden voor de afbraak van cellulose zouden ook kunnen inwerken op chitine (Xia *et al.*, 2008). Er is nog meer onderzoek nodig naar welke enzymen specifiek cellulose afbreken en welke specifiek chitine afbreken. Het is ook belangrijk om te weten bij welke temperatuur en pH deze enzymen optimaal werken. Zonder deze informatie zijn de enzymen niet bruikbaar.

Besluit

Zowel de chitinebepaling op de zemelen als de ruwe vezelbepaling op de prepopen leverden hoeveelheden op die significant groter waren dan nul. Dit komt omdat dit een verkennend onderzoek is, waarbij de gebruikte methodes nog niet op punt staan. De gebruikte methodes zijn niet voldoende selectief om een onderscheid te kunnen maken tussen plantaardige en dierlijke vezels. Er zijn twee problemen met de methodes. Het eerste, eerder praktische, probleem is het gebruik van een filter met te grote poriën bij de chitinebepaling. Voor deze bepaling wordt er best overgeschakeld naar een glasfilter met kleinere poriën waarbij gebruik kan gemaakt worden van een filterbed van decaliet als filtreerhulp. Het tweede probleem is het feit dat cellulose en chitine sterk gelijkende chemische structuur hebben. Het blijkt niet mogelijk te zijn om door gebruik van zuren en basen een onderscheid te maken tussen beiden. Een mogelijke oplossing is het gebruik van een meer selectieve enzymatisch-gravimetrische methode, al is het zeker nodig om meer onderzoek te doen naar enzymen die uitsluitend inwerken op cellulose of op chitine.

Referenties

Akaki & Duke (1999). Apparent chitin digestibilities in the Eastern Screech Owl (*Otus asio*) and the American Kestrel. *Journal of Experimental Zoology*, 283(4-5), 387-393.

Black & Schwartz (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst*, 75, 185-189.

Cools; De Cuyper; Pauwels & Janssens (2014). Animal fiber: a key nutrient to carnivores, but how to determine this dietary fraction analytically?. *Proceedings of the tenth symposia of the comparative nutrition society, Flat Rock, NC*, 69-71.

- Finke (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo biology*, 26, 105-115.
- Hartl, Zach & Seidl-Seiboth (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 533-543.
- Horn, Vaaje-Kolstad & Westereng (2012). Novel enzymes for degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*, 5, 45
- Klemm; Heublein; Fink & Bohn (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie*, 44(22), 3358-3393.
- Kurita (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26 (9), 1921-1971.
- Liu; Sun; Yu; Zhang; Bi; Zhu; Qu; Jiang & Yang (2012). Extraction and Characterization of Chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17(4), 4604-4611.
- Setoguchi; Kato; Yamamoto & Kadokawa (2012). Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid. *International journal of biological Macromolecules*, 50(3), 861-864.
- Sheppard; Newton; Thompson & Savage (1994). A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource Technology*, 50(3), 275-279
- Stelmock; Husby & Brundage (1985). Application of Van Soest acid detergent fiber method for analysis of shellfish chitin. *Journal of Dairy Science*, 68, 1502-1506
- Tianhong; Masamitsu ; Ying-Ying & Hamblin (2011). Chitosan preparations for wounds & burns: antimicrobial & healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 9, 857-79.
- Van Soest (1973). Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 56, 781-784.
- Watkins, Adair & Oldfield (1982). Evaluation of shrimp and king crab processing by products as feed supplements for mink. *Journal of Animal Science*, 55, 578-589.
- Weiser; Porth; Mertens & Karasov (1997). Digestion of chitin by northern bobwhites and American robins. *The Condor*, 99, 554-556.
- Xia,, Liu & Liu (2008). Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. *Bioresource Technology*, 99 (15), 6751-6762.
- Zhang, Liu, Tian & Hu (2011). Comparative characterization of chitinases from silkworm and bollworm. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61, 267-275.

Entomospeed

Het project wil de grootschalige insectenkweek bij zwarte soldatenvliegen en meelwormen versnellen. Meer info op www.insectinfo.be en www.insectinfo.nl

Partnerschap

Grensoverschrijdende samenwerking tussen Vlaanderen en Nederland



Met financiële steun van



Gefinancierd binnen het Interreg V-programma Vlaanderen-Nederland, het grensoverschrijdend samenwerkingsprogramma met financiële steun van het Europees Fonds voor Regionale Ontwikkeling. Meer info: www.grensregio.eu