

纤维素酶 - 过氧化氢降解法制备低聚壳聚糖的研究

林 强 马 可 立

(北京联合大学生物化学工程学院 北京 100023)

提要 利用纤维素酶-H₂O₂降解法制备低分子量壳聚糖,分别研究了pH值、温度、酶浓度、H₂O₂加入量及反应时间等因素对产品的收率及平均分子量的影响。结果表明最佳反应条件为:pH为5.6、酶/糖为0.1、反应温度为54℃、反应时间为6h。在反应结束前0.5h加入一定量H₂O₂进行氧化降解可以得到平均分子量为1500的低聚壳聚糖。而且由于H₂O₂的作用产物的颜色较浅。

关键词 壳聚糖,纤维素酶,低聚壳聚糖,氧化降解

中图分类号 TQ929^{+.2} **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)06-0007-04

壳聚糖(chitosan)是甲壳素N-脱乙酰基的产物,一般而言,N-乙酰基脱去55%以上可称之为壳聚糖。低聚水溶性壳聚糖有降低血脂、降低胆固醇、增强身体免疫力和抵抗疾病的能力;亦可利用水溶性壳聚糖良好的保湿功能,用作化妆品的添加剂^[1];或是从中提取抗肿瘤制剂。同时,低聚水溶性壳聚糖还可应用于工业、农业等用途^[2-3]。因此,壳聚糖的降解一直是人们重点研究的课题。由于过氧化氢降解的方法对降解过程和降解产物的分子量分布不易控制,1-4糖占多数^[4],加之需要加入大量的反应试剂,对环境造成污染,因此我们选择了生物降解法做进一步的研究。因为壳聚糖和纤维素在糖苷键的连接上有相似之处,所以本文用纤维素酶在微酸的条件下^[5]对壳聚糖进行生化降解,并应用双氧水在反应结束阶段进一步对壳聚糖氧化降解,制备了平均分子量1500左右的低聚壳聚糖。

1 材料与方 法

1.1 实验药品及仪器

壳聚糖:济南海得贝海洋生物工程有限公司,脱乙酰度90%以上,粘均分子量 5×10^5 。纤维素酶:天津利华酶制剂厂,酶活性20000U/mg。721分光光度计:北京分析仪器厂。FD-1型冷冻干燥机:北京博医康技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 底物制备

将称好的壳聚糖用36%醋酸溶液溶解,pH值用碳酸氢钠调节到所需值。

1.2.2 粘度测定

稀溶液法测定相对粘度(利用乌式粘度计)。

1.2.3 平均分子量测定^[6]

首先采用粘度法测定低聚壳聚糖的粘均分子量,依据下式计算特征粘度 $[\eta] = 1/C[(2\eta_{sp}/\ln\eta_r)]^{0.5}$,利用Mark-Houwink经验式 $[\eta] = KM^\alpha$ 计算出粘均分子量。本次实验所使用的壳聚糖的脱乙酰度为90%,其相应的K值和 α 值如下: $K = 6.589 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$, $\alpha = 0.88$ 。其中 $[\eta]$ 为特征粘度,C为壳聚糖稀溶液的浓度, η_{sp} 为增比粘度, η_r 为相对粘度,K是常数,与体系性质关系不大而单依赖于温度的数值, α 是一个与相对分子质量有关的数值。根据上述公式可以计算出壳聚糖的粘均分子量。

当溶液粘度较低时(粘度低于1000mPa·s),用粘度法测出的分子量存在较大的误差,所以在此采取端基紫外法,根据下述公式计算平均分子量: $M = \text{被测样品总糖浓度(g/L)} \times 221.1 / \text{被测样品还原糖浓度(g/L)}$ 。

1.2.4 低聚壳聚糖水溶液的分离与干燥

(1) 低聚壳聚糖水溶液的分离

由于壳聚糖降解后,低聚壳聚糖水溶液中含有各种反应物及不同分子量的低聚壳聚糖,而4~7糖具

第一作者:林强,出生于1964年,博士,副教授,从事天然产物分离及应用研究,E-mail: Linqiang@buu.com.cn

收稿日期:2002-01-31;修回日期:2002-03-20

有良好的生物活性,可广泛用于医药、保健品、化妆品等领域。因此,分离出4~7糖的较纯壳聚糖无疑是非常重要的。在此,作者提供以下方法进行分离。首先,将低聚壳聚糖水溶液通过滤纸进行过滤,清除大的沉淀物。然后再用G4的砂芯漏斗抽真空过滤,将分子量较大的壳聚糖过滤掉。最后用透过分子量为5000的膜分离器进行分离,得到平均分子量在5000以下的壳聚糖水溶液。

(2) 低聚壳聚糖的干燥

得到平均分子量为5000以下的壳聚糖水溶液后,如何干燥得到纯的壳聚糖是一个很重要的问题。这里采用冷冻干燥的方法。因为壳聚糖是生物制品,又是糖类,因此不能以蒸发的方式进行干燥,因为使用以上方法会破坏其生物活性、改变其结构,使其变色。因此,首先采用减压蒸馏法用旋转蒸发器蒸出2/3的水。然后,用2倍的乙醇对其进行醇洗,倒入分液漏斗放置过夜后分离,将沉淀物置于表面皿中进行冻干得到干品。

2 结果与讨论

2.1 温度对纤维素酶降解壳聚糖的影响

当壳聚糖乙酸盐溶液与纤维素酶作用时,在pH值为5.6时,由图1可见,温度为54℃,粘均相对分子量为反应降解后的最低点,这说明反应温度为54℃时是此反应的最佳反应温度。实验室所使用的粉末状纤维素酶在较低温度(30℃)和较高温度(70℃)时都不如在54℃时活性高,因而没有起到最佳的催化效果,影响了其对壳聚糖的降解作用。故认为在上述条件下纤维素酶降解壳聚糖的较佳温度为54℃。

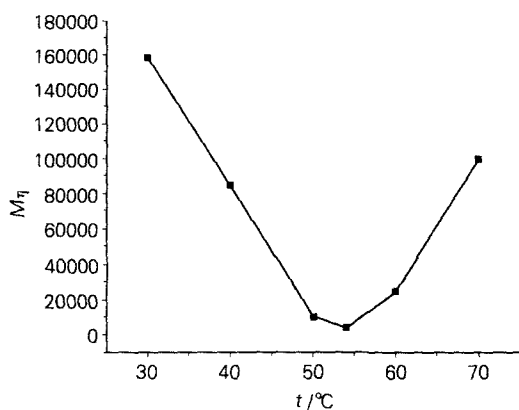


图1 温度与粘均相对分子量的关系

Fig. 1 Relation between temperature and viscosity-average molar weight

2.2 pH值对纤维素酶降解壳聚糖的影响

在确定了反应温度后,将进一步确定反应的pH值。pH值不能太低,否则降解过程将以酸降解为主导,丧失了酶降解的目的和意义。由图2可见最佳反应pH值为5.6,也就是平均分子量最低。随着pH值的增加壳聚糖的平均分子量有明显上升。

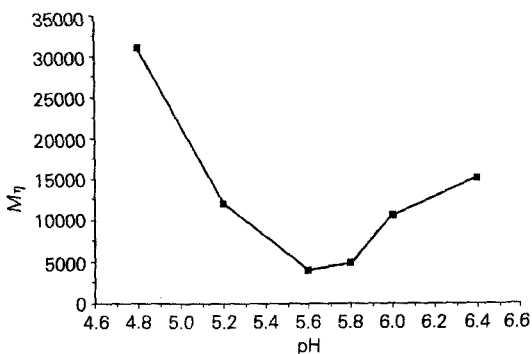


图2 pH与粘均相对分子量的关系

Fig. 2 Relation between pH and viscosity-average molar weight

2.3 酶量对纤维素酶降解壳聚糖的影响

由图3及可见,随着酶量的增加壳聚糖的平均分子量不断降低,当酶/糖到0.1后,随酶量的增加壳聚糖的平均分子量变化平缓,这说明酶的加入量达到一定浓度时,溶液已饱和,再加入酶并不能增加酶的活性。不仅如此,加入太多的酶还会使反应溶液的颜色变深,沉淀增加,不利于反应的进行及最后产物的分离与提纯。因此10g壳聚糖加入1g纤维素酶是比较好的比例,当然这与最初酶的活性有关,如果选择

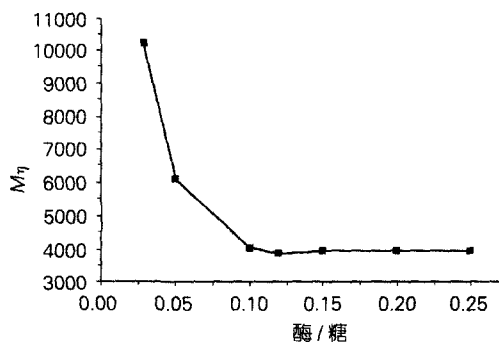


图3 酶加入量与平均分子量的关系

Fig. 3 Relation between amount of cellulase viscosity-average molar weight

的纤维素酶活性较低,可适当增加酶的用量。

2.4 反应时间对纤维素酶降解壳聚糖的影响

反应时间的多少直接影响着反应的效率和生产效率,因此这是一项重要的参数指标。根据实验结果,由图4可以看出,随着反应时间的延长,壳聚糖的平均分子量不断下降,当反应6h左右时,平均分子量降低到最低,尔后粘度下降缓慢甚至不下降了,反应达到平衡。

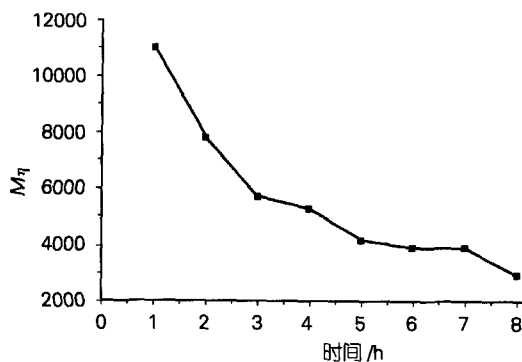


图4 反应时间与平均分子量的关系

Fig. 4 Relation between reaction time and viscosity-average molar weight

由此可见,反应6h为最佳时间。实验表明反应时间过长壳聚糖的颜色加深。

2.5 双氧水加入时间对纤维素酶降解壳聚糖的影响

在用纤维素酶降解壳聚糖的实验中,之所以采用纤维素酶降解法,主要是考虑到纤维素酶比较好找,且价格便宜,反应进行比较温和,所用其他试剂较少。但反应后的提纯干燥却出现新的问题:(1)降解不够完全,主要是酶活性不够,降解后的分子量大约在4000左右,未达到医用和日用的要求。(2)壳聚糖降解后,由于纤维素酶的存在,使降解后的溶液为棕色,干燥后为棕黑色,无法与其它成分配伍加入到保健品及化妆品中。(3)不能利用膜分离器对不同分子量的壳聚糖进行分离,因为用膜分离则会堵塞分离膜。(4)用活性炭和离子交换树脂并不能将溶液完全脱色,总是保持在淡黄色溶液的水平上,干燥后成为黄色固体粉末。

基于以上几点,如何使降解的壳聚糖的平均分子量在1500左右和脱色成为急待解决的问题。通过实验发现,H₂O₂既可以降解壳聚糖,又有脱色的作用。通过对加入量和加入时间的控制,从而达到对分子量

的控制和脱色的目的。由于已被纤维素酶降解到分子量4000左右,H₂O₂将在此基础上对壳聚糖做进一步降解。在pH值为5.6的微酸性条件下,当壳聚糖的平均分子量在4000左右时加入H₂O₂后,这时的壳聚糖具有了水溶性,成为均相反应,起始反应速度较快。但因为是刚加入H₂O₂,所以壳聚糖的大部分氨基与H⁺作用依然是以R-NH⁺₃的缺电子体系的状态存在,H₂O₂在此溶液中分解:



使自由基进攻糖苷键,从而达到降解的目的。根据以往的实验结果,考虑0.5h左右反应即可完成。由图5可见,反应0.5h平均分子量即可达到1500左右,如果继续延长平均分子量还会下降,因此反应结束前0.5h加入H₂O₂为最佳时间。

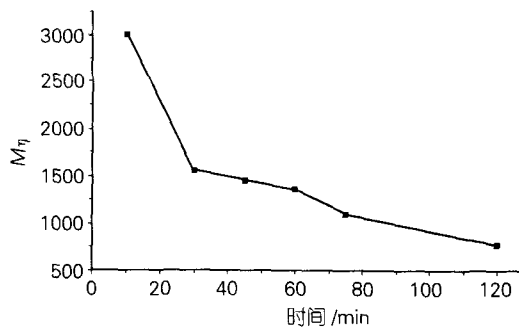


图5 双氧水加入时间与粘均分子量的关系

Fig. 5 Relation between adding time of hydrogen peroxide and viscosity-average molar weight

2.6 双氧水加入量对纤维素酶降解壳聚糖的影响

图6结果表明,在10g壳聚糖加入1g酶的前提下,距反应结束前0.5h加入10mL的双氧水可以使壳聚糖的平均分子量迅速下降,产物的平均分子量可达到1500左右,成为完全溶于水的低聚物。更为重要的是,采用不同的加入双氧水的时间,可得到不同分子量的产物。即加入纤维素酶后加入少量双氧水不但能使产物溶液颜色由深红褐色变为浅黄色直至无色,从而达到脱色的目的,还可以达到控制壳聚糖降解程度的目的。另外由图6可知,双氧水的用量不同,所得到的壳聚糖平均分子量也不同,但基本上都在600~2500之间。这样,可以利用加入不同用量的双氧水来得到所需分子量级的壳聚糖。

根据前述干燥分离方法对产物进行干燥分离,得

到微细的略带淡黄色的固体粉末，经分析产率在 85% 左右。

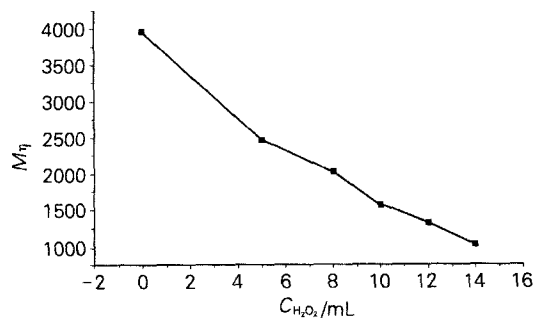


图 6 双氧水加入量与平均分子量的关系

Fig. 6 Relation between adding amount of hydrogen peroxide and viscosity-average molar weight

3 结论

在 54 ℃, pH 为 5.6, 酶糖比为 0.1, 反应时间为 6 h 的条件下, 纤维素酶降解的壳聚糖平均分子量达到 4 000 左右。若在距反应结束前 0.5 h 加入一定量的双氧水, 既可以使反应后的溶液颜色变浅, 又可以使壳

聚糖得到进一步的降解, 还可以得到不同分子量范围的壳聚糖, 使最终水解产物的平均分子量在 600 ~ 2 500 之间。这使得实验具有了进一步的应用意义。与其他几种酶降解壳聚糖相比, 纤维素酶-双氧水降解法具有很重要的使用意义。首先是成本较低, 其次是得率较高, 而且分子量易于控制在一定范围内。加之反应条件较温和, 加入的试剂量较少, 这些都为工业化生产提供了可能。

参考文献

- 1 Suzuki K, Okawa Y, Suzuki S. Candidacidal effect of peritoneal exudate cell in mice administered with chitin or chitosan : the role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect . *Microbiol Immunol*, 1987, 31: 375
- 2 Domard A, Noel L. *Advances in Chitin and chitosan*, London and New York: Elsevier Applied Science, 1992. 387-392
- 3 夏文水. 甲壳低聚糖功能性质. *无锡轻工大学学报*, 1996, 4: 297-302
- 4 蒋挺大. 壳聚糖. 北京: 化学工业出版社, 2001. 3
- 5 汤又文. 低聚壳聚糖的制备和应用. *江苏石油化工学院学报*, 1996, 8(2): 23-25
- 6 王伟, 薄淑琴, 秦汉. 壳聚糖稀溶液的研究, *化学通报*, 1989, 9: 44

STUDY ON PREPARATION OF LOW-MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN BY CELLULAS-H₂O₂ DEGRADATION

LIN Qiang MA Ke-Li

(Bio-Chemical Engineering College of Beijing Union University Beijing, Beijing, 100023)

Received: Jan., 31, 2002

Key Words: Chitosan, Cellulas, Low-molecular weight chitosan, Oxidative degradation

Abstract

In this paper the preparation of low-molecular weight chitosan by cellulas-H₂O₂ degradation was studied. The effects of pH, temperature, cellulas/chitosan, reaction time, and added amount of H₂O₂ on the yield and average molecular weight of product were developed. The results showed that the lowest average molecular weight of chitosan required only by hydrolysis reaction of cellulas is 4 000. The optimal reaction condition is that pH 5.6, cellulas/chitosan 0.1, temperature 54 ℃ and reaction time 6 h. If more lower molecular weight chitosans were prepared, a proper amount of H₂O₂ should be added at 0.5 h before the reaction finished. The low molecular weight and light color chitosan, which average molecular weight is 1 500, were obtained.

(本文编辑:张培新)