两种方法制备壳寡糖平均分子质量与氨基含量分析

蔡圣宝[1,2]，邢荣娥[1]，刘　松[1]，李荣锋[1,2]，李鹏程[1]

(1. 中国科学院 海洋研究所，山东 青岛 266071；2. 中国科学院 研究生院，北京 100039)

摘要：采用氧化降解和酶降解两种方法制备壳寡糖。并对降解产物的氨基质量分数变化，平均分子质量进行了分析和测定。结果表明，氧化降解法降解速率快，降解产物的平均分子质量都低于 2 ku，但降解产物的氨基质量分数均有部分损失；酶法降解产物的氨基含量基本没有损失，但酶法降解的时间较长，得到的产物平均分子质量较高。分别采用木瓜蛋白酶和纤维素酶对壳聚糖进行降解，经过 24 h 降解，平均分子质量从 630 ku 分别降至 43 ku 和 25 ku 左右，表明纤维素酶的水解能力强于木瓜蛋白酶。

关键词：壳寡糖；氧化降解；氨基质量分数；酶降解；平均分子质量

中图分类号：O636.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-3096(2009)05-0070-04

壳聚糖是甲壳质的脱乙酰产物，其脱乙酰度通常 50%～100%，是唯一一种天然碱性氨基多糖，化学名为 β-(1→4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖，主链骨架是由 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖以 β-1，4 糖苷键缩合而成的。壳聚糖主要是从甲壳动物体内获得的，天然无毒，由于其具有独特的物理化学结构，且可生物降解。因此其在化妆品[1]、食品工业[2]、医药[3]、农业[4]以及生物工程等等领域都有广泛的应用[5,6]，但因为壳聚糖分子质量一般都很大，水溶性差，使其应用受到很大的制约。壳寡糖是壳聚糖经降解生成的一类低聚物，近年来，随着研究的深入，通过一系列实验发现，其水溶性好，易被人体吸收，具有抑菌、抗肿瘤、抗氧化性[7,8]、调血脂、调节免疫及活化肠道双歧杆菌等多种生理功能，应用领域大大拓宽[9]。李曙光等[10]研究了壳寡糖的植物防病抗病活性，结果显示，壳寡糖的诱抗活性与壳寡糖的分子质量以及脱乙酰度密切相关，低分子质量及高脱乙酰度的壳寡糖诱抗活性高。夏文水等[11]通过对大肠埃希菌的抗菌抑菌活性研究，证明壳寡糖的抑菌作用是随着壳寡糖分子质量的降低而逐渐增强的，其中分子质量为 1 500 左右的壳寡糖抗菌效果最好，并且通过比较试验还证明了游离的氨基存在是壳寡糖抗菌抑菌作用的基础。目前，壳寡糖的制备大致分三种方法：化学降解法、物理降解法和酶降解法[12]。虽然对各种方法制备的壳寡糖的分子质量特性有报道，但是未见有关各种方法对壳寡糖氨基含量的影响报道。作者研究了过氧化氢氧化降解和酶降解方法制备壳寡糖的氨基质量分数变化，及平均分子质量变化和氨基质量分数变化之间的关系。以期能找出获得较低分子质量和较高氨基质量分数的壳寡糖制备方法及条件。

1　实验部分

1.1　主要实验仪器和药品

壳聚糖，青岛百成海洋生物资源有限公司，脱乙酰度 87.0%，氨基含量 8.65%，$M=6.36\times10^5$；pH 计，上海雷磁仪器厂；LABOROTA4000 型旋转蒸发仪，德国海道夫公司；FD-5N 型冷冻干燥机，日本东京理化公司；DK-98-I 型电子恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司；木瓜蛋白酶（酶活＞3 500 U/mg，上海生工生物工程技术服务有限公司）；纤维素酶（酶活 107 U/mg，上海生工生物工程技术服务有限公司）；其他试剂为分析纯。

1.2　降解反应

1.2.1　氧化降解

将 10 g 壳聚糖溶于 300 mL2% 乙酸溶液中，搅拌条件下缓慢加入 21.1 mL30% H_2O_2，在 70℃ 水浴条件下分别降解 1，2，3，4，5，6 h。降解结束后用 NaOH 溶液调 pH 到中性。浓缩后，冷冻干燥得壳寡糖产物。

1.2.2　酶降解

分别采用木瓜蛋白酶、纤维素酶对壳聚糖进行

收稿日期：2008-12-26；修回日期：2009-03-08

基金项目：国家 863 重点项目（2007AA091601）；山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目（2007BS07002）；中国科学院“东北之春”人才项目（082512101L）

作者简介：蔡圣宝（1983-），男，安徽巢湖人，硕士研究生，主要从事海洋生物活性物质研究与应用，电话：0532-82898707，E-mail：caishi1020@163.com；李鹏程，通信作者，E-mail：pcli@ms.qdio.ac.cn

降解。木瓜蛋白酶降解[13]：用 200 mLpH4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解 5 g 壳聚糖，然后加入 500 mg 用 50 mLpH4.0 乙酸缓冲液溶解的木瓜蛋白酶，pH 调至 4.5，40℃水浴反应 24 h，pH 调至 7.0 后冷冻干燥得降解产物。纤维素酶降解[14]：90 mLpH4.0 乙酸缓冲液溶解 1 g 壳聚糖，然后加入 10 mLpH4.0 缓冲液溶解的 100 mg 纤维素酶，调节 pH 至 4.5 后于 40℃ 水浴中反应 24 h，调节 pH 至 7.0 后冷冻干燥得降解产物。

1.3 氨基含量与分子质量测定

氨基含量测定方法参照文献[15]的方法测定。

分子质量测定：水溶性的壳寡糖分子质量测定采用端基氨基分析法测定[16]；不溶性的壳聚糖分子质量测定采用粘度系数法测定[17]。

2 结果

2.1 降解的样品颜色与溶解性

由表 1 可知，氧化降解壳聚糖随着降解时间的延长，样品颜色逐渐加深，从白色逐渐变成黄色，而从 1 h 到 6 h，降解样品的水溶性好，能迅速溶于水中。酶法降解的样品虽然颜色没有什么变化，但因为其降解的产物平均分子质量仍然较高，所以在水中的溶解性较差，只有较少部分溶解于水中。

表 1 不同制备方法的壳寡糖颜色与溶解性

Tab. 1 The color and solubility of oligochitosan by different preparation methods

方法	时间(h)	颜色	水溶性
氧化降解	1	白色	好
	2	白色	好
	3	微黄	好
	4	淡黄色	好
	5	黄色	好
	6	黄色	好
木瓜蛋白酶降解	24	白色	较差
纤维素酶降解	24	白色	较差

2.2 氧化降解所得样品平均分子质量与氨基质量分数变化

由图 1 可知，随着降解时间的延长，分子质量与氨基质量分数都逐渐降低，在反应开始的 1 h，分子质量迅速降低，从 636 ku 下降到 1 700 u 左右，氨基质量分数从 8.65%下降到 8.51%，随着反应时间的延长，平均分子质量下降速率变缓，从 1 h 到 6 h，分子质量从 1 700 u 左右下降到 1 300 u 左右。氨基质量分数从 8.51%下降到 8.01%。

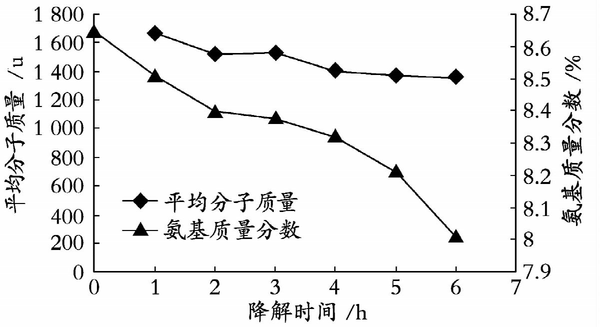

图 1 过氧化氢氧化降解的壳寡糖分子质量与氨基质量分数变化

Fig. 1 The molecular weight and amido content of oligochitosan depolymerized by H_2O_2 with water-heated

2.3 不同酶降解所得样品平均分子质量与氨基质量分数变化

由图 2 可知，用木瓜蛋白酶降解 24 h 后，平均分子质量由 636 ku 下降至 43 ku 左右，纤维素酶降解 24 h 后，分子质量下降至 25 ku 多。图 3 是两种酶降解产物的氨基质量分数与原料相比，由图 3 可知，壳聚糖经过 24 h 酶降解后，其氨基质量分数基本没有变化，说明用酶降解的样品氨基基本没有损失。

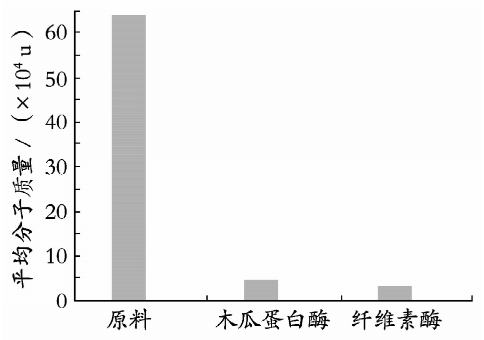

图 2 酶降解 24 h 壳聚糖平均分子质量

Fig. 2 The molecular weight of chitosan depolymerized by enzymes (24 h)

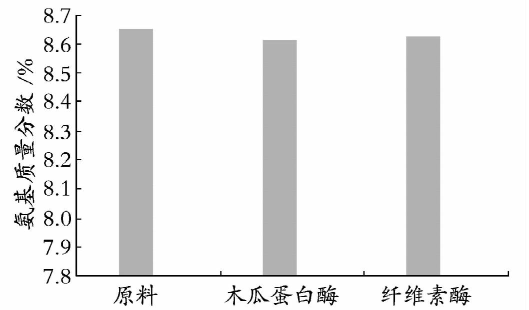

图 3 酶降解 24 h 壳聚糖氨基质量分数

Fig. 3 The amido content of chitosan depolymerized by two enzymes (24 h)

3 讨论

化学方法降解壳聚糖主要是过氧化氢降解和酸降解,但用酸降解通常选用盐酸,这使得反应条件过高,不但反应过程不容易控制,而且反应结束的后续处理也很麻烦[18]。由于过氧化氢降解后,样品容易处理。本文采用终浓度为2.1% H_2O_2,与壳聚糖单体摩尔比为3∶1,壳聚糖用2%乙酸溶解,在70℃均相降解条件下反应1~6 h,结果表明,反应开始1 h,壳寡糖的平均分子质量就迅速下降到1 700 u多,之后随着反应时间的延长,平均分子质量变化不大。样品的氨基质量分数在开始反应的2 h时,下降较快,之后下降速度变慢,但在5 h后又有加快的趋势,并伴随着产物颜色逐渐加深,从白色变为黄色。颜色的变深是因为壳寡糖上的氨基与醛基反应生成的副产物随反应的进行逐渐增多的原因[19],并且糖链越短,氨基与醛基反应的可能性就越大。这可能也是随反应的进行壳寡糖氨基质量分数有所下降的原因。另外,可能是氧化降解条件较为剧烈,致使分子链上的部分氨基脱落,从而使氨基质量分数降低。

酶降解壳聚糖时,在反应最初的90 min内,溶液的粘度下降较快,之后溶液的粘度下降较缓慢。经过24 h的反应,木瓜蛋白酶降解的样品平均分质量从636 ku下降到43 ku左右,纤维素酶降解24 h后,分子质量下降至25 ku多,说明纤维素酶的降解速度要比木瓜蛋白酶降解速度快,这可能是由于壳聚糖的分子结构与纤维素分子结构相似的原因造成的。但是,因为酶降解的产物的平均分子质量仍然比较大,所以在水中的溶解性还是比较差,只有部分低分子质量产物溶于水。通过将两种酶降解产物的氨基质量分数与原料相比,发现经过24 h反应并没有变化,说明用酶降解对分子中氨基质量分数基本没有破坏,降解比较温和。

4 结论

通过过氧化氢氧化法和酶法对壳聚糖进行降解,结果表明,用过氧化氢氧化降解壳聚糖,其产物的平均分子质量可以在较短的时间内降至2 ku以下,但化学法制备的壳寡糖氨基质量分数都有一定的损失,为了制备较低分子质量与氨基质量分数较高的壳寡糖,降解反应不要超过5 h。而采用木瓜蛋白酶和纤维素酶降解壳聚糖,通过24 h反应以后分子质量都有较大的下降,平均分子质量分别为43 ku和25 ku左右,由于反应较为温和,温度不高,所以酶法降解的产物氨基质量分数和原料相比并没有多大的变化,但因其平均分子质量仍较大,所以其产物的水溶性较差。过氧化氢氧化降解适合较快制备低分子质量,氨基质量分数要求不高的壳寡糖,而木瓜蛋白酶与纤维素酶降解适合制备分子质量较低的,含较高氨基质量分数的低聚壳聚糖。

参考文献:

[1] 郭振楚,邓建成. 壳聚糖及其衍生物与金属配位的研究进展[J]. 化学研究与应用, 2001, **13**(1): 21-26.

[2] 何强芳, 李明国, 巫海珍, 等. 5-氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备及其释药性能[J]. 应用化学, 2004, **21**(2): 192-196.

[3] Yong Zheng, Ying Yi, Yipeng Qi, *et al*. Preparation of chitosan-copper complexes and their antitumor activity[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2006, **16**(15): 4 127-4 129.

[4] Izume M. Coating of seeds with chitosan oligosaccharides[P]. Jpn Kokai Tokkyo, JP 63297305.

[5] 尹学琼, 林强, 张歧, 等. 低聚壳聚糖及其金属配合物的抗 O_2 活性研究[J]. 应用化学, 2002, **19**(4): 325-328.

[6] Kafedjiiski K, Krauland A H, Hoffer M H, *et al*. Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan[J]. **Biomaterial**, 2005, **26**(7): 819-826.

[7] 刘松, 邢荣娥, 于华华, 等. 壳聚糖/羧甲基壳聚糖金属配合物对氧自由基的清除作用研究[J]. 功能高分子学报, 2004, **17**(4): 643-648.

[8] 邢荣娥, 刘松, 于华华, 等. 不同分子量壳聚糖和壳聚糖硫酸酯的抗氧化活性[J]. 应用化学, 2005, **22**(9): 598-561.

[9] 胡志鹏. 壳寡糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, **24**(4): 210-212.

[10] 李曙光,白雪芳,杜昱光. 壳寡糖的分离分析及其诱抗活性研究[A]. 辽宁甲壳质研究开发与应用研讨会论文集[C]. 沈阳: 辽宁省老教授协会甲壳质研究会, 2002, 277-280.

[11] 夏文水,吴焱楠. 甲壳低聚糖功能性质[J]. 无锡轻工大学学报,1996, **15**(4): 2 911-2 916.

[12] 邢荣娥, 刘松, 李鹏程. 甲壳寡糖的研究与应用[J]. 海洋科学, 2002, **26**(5): 25-27.

[13] Hong lin, Haiying Wang, Changhu Xue, *et al*. Preparation of chitosan oligomers by immobilized Papain[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31: 588-592.

[14] Yaku, Fumiko, Tanaka, *et al*. Process for preparing chitosan oligosaccharides[J]. **United States Patent**, 1 970, 2: 150~154.

[15] 顾百胜, 王氢, 刘欣, 等. 壳聚糖氨基质量分数测定方法的改进[J]. 华东理工大学学报, 2003, **29**(3): 317-319.

[16] 邬建敏. 光度法测定甲壳低聚糖的平均相对分子质量[J]. 化学世界，2001，**42**(6)：293-295.
[17] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京：化学工业出版社，2003. 279-280.
[18] 张虎，杜昱光，虞星炬. 几丁聚糖和壳寡糖的制备和功能[J]. 中国生化药物杂志，1999，**20**(2)：99-101.
[19] Riccardo A A, Maria T, Corrado M, *et al*. Chitosans depolymerized with the aid of Papain and stabilized as glycosylamines [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2002, 50：69-78.

The analysis of the molecular weight and amido content of oligochitosan prepared by two methods

CAI Sheng-bao[1,2], XING Rong-e[1], LIU Song[1], LI Rong-feng[1,2], LI Peng-cheng[1]

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Acodemy of Science, Qingdao 266071, China; 2. Graduate school of the Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Received: Dec., 26, 2008
Key words: oligochitosan; oxidation depolymerization; amido content; enzyme depolymerization; average molecular

Abstract: This paper uses two methods to prepare oligochitosan, namely oxidation depolymerization and enzyme depolymerization. Then we analyse the molecular weights and amido contents of oligochitosan prepared by these two methods. The result is that the rate of depolymerization with H_2O_2 is quicker than that of enzyme depolymerization and the molecular is low than 2000. But there is some losses of the amido content of oligochitosan which was prepared by oxidation depolymerization. There is almost no loss of the amido content of the oligochitosan prepared by enzyme. However the enzyme depolymerization needs very long time and the enzyme is prone to lose activity. The molecular weight of oligochitosan prepared by enzyme was little high. Two enzymes are employed in this paper. Papain and cellulose all have hydrolytic activity to chitosan. But these activities are not very high. The molecular weights of the products of these two enzymes are about 43 000 and 25 000, respectively. And the hydrolytic activity of cellulose is higher than that of Papain.

（本文编辑：康亦兼）