

微波-过氧化氢协同降黏辅助酶法 制备壳寡糖

李 恒, 朱玉霞, 苏建荣, 陆震鸣, 龚劲松, 许正宏, 史劲松*

(江南大学药学院, 江苏无锡214122)

摘要:利用微波-过氧化氢协同处理壳聚糖,通过降低壳聚糖的黏度辅助促进其酶解制备壳寡糖。通过单因素实验与正交实验,确定了影响壳聚糖微波-过氧化氢降黏效果的因素主次顺序是微波时间、 H_2O_2 的用量、微波功率。优化后的降黏条件是: H_2O_2 添加量为0.1 mL,微波功率为120 W,微波时间为0.5 min,所得壳聚糖黏度比原料黏度降低了96.9%,且并未发生结构的改变。对其酶解的结果表明,经微波-过氧化氢协同降黏再酶解的壳寡糖得率为80.1%,比未经降黏处理的提高了11.8%,产物壳寡糖数均相对分子质量为2 027,平均聚合度为10,明显低于未经降黏处理而直接酶解所得的壳寡糖。

关键词:壳聚糖;微波;过氧化氢;酶解;壳寡糖

中图分类号:Q814.9

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)10-0094-05

Enzymatic preparation of chitosan oligosaccharides assisted by synergistic viscosity reduction with microwave and hydrogen peroxide

LI Heng, ZHU Yu-xia, SU Jian-rong, LU Zhen-ming, GONG Jin-song,

XU Zheng-hong, SHI Jin-song*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Enzymatic preparation of chitosan oligosaccharides (COS) is assisted by synergistic viscosity reduction with microwave and hydrogen peroxide. By single factors experiment and orthogonal experiment, the main factors affecting viscosity reduction are determined with the following order: microwave time, H_2O_2 amount and microwave power. The optimized conditions for viscosity reduction are: 0.1 mL of H_2O_2 , 120 W of microwave power and microwave treating time 0.5 min. The viscosity of treated chitosan is decreased by 96.9% compared with the original chitosan without any changes in structure. Through enzymatic hydrolysis, the COS yield for chitosan treated by microwave and hydrogen peroxide can reach 80.1%, which is 11.8% higher than the untreated control. The number average molecular weight of COS prepared via enzymatic hydrolysis assisted by microwave and hydrogen peroxide is 2027, corresponding to the average degree of polymerization of 10. It is obviously significantly lower than the control group of direct enzymatic hydrolysis without viscosity reduction.

Key words: chitosan; hydrolysis; microwave; peroxide; chitosan oligosaccharide

壳寡糖 (Chitosan oligosaccharide, COS) 是氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的聚合度约为2~15的水溶性低聚糖,由甲壳素或壳聚糖降解而成^[1]。与壳聚糖相比,壳寡糖在食品、医药、农业、日化等领域有着更广泛的应用前景^[2]。壳寡糖具有提高巨噬细胞吞噬能力^[3],抑制肿瘤细胞生长^[4],促进双歧杆菌增殖^[5],降低胆固醇^[6],抗氧化和抑菌^[7-8]等多种独特的生理功效。此外,壳寡糖具有良好的吸湿性和保湿性,可用作果蔬保鲜剂以及日化产品中的保湿剂等^[9]。

目前,壳寡糖的制备方法主要有化学法、物理法和酶解法^[10]。化学法主要采用酸水解壳聚糖或过氧化氢(H_2O_2)氧化降解壳聚糖的方法得到^[11],降

解快速,生产能力大,是最早用于工业化生产的制备方法。然而,化学法制备壳寡糖的产率低且相对分子质量分布宽泛,单糖质量分数高,相对剧烈的反应条件可能造成产品化学结构的破坏,其产品安全性饱受质疑^[12-14]。物理法主要有超声波法、微波法、 γ 射线法、光解法等。物理法的优势在于该法操作较为简单,污染小,但普遍存在降解初期速率快而后期缓慢的问题,更小寡糖分子的获得需要耗费较高能量和更长时间,设备投资较大。如果和其他降解方式联合使用可能会取得更好的效果^[15]。酶解法的条件温和,相对分子质量分布相对容易控制,对环境的污染较小,且不会引起结构的变化,是一种公认的比较理想的绿色制备方法^[10]。由于壳聚糖溶解

收稿日期:2014-05-18

基金项目:十二五国家科技支撑计划项目(2012BAD33B06);江苏省自然科学基金(BK20121117)

作者简介:李恒(1983-),女,工学博士,讲师,从事生物化工研究,eternal83@163.com;史劲松(1971-),男,工学博士,教授,主要从事酶工程和生物活性物质研究开发,通讯联系人,shijs@163.com。

性差、溶液黏度高等特点,导致了酶法生产壳寡糖能耗水平和生产成本的增加。因此,降低酶解反应中底物壳聚糖的黏度,提高其底物溶解性成为壳寡糖酶法制备要解决的关键难题之一。

笔者采用微波-过氧化氢协同处理壳聚糖以降低底物黏度,通过微波时间、微波功率、 H_2O_2 添加量等因素的考察和优化,获得微波-过氧化氢降黏联合酶法制备水溶性壳寡糖的最适条件,为进一步放大工艺和规模化制备壳寡糖提供参考和借鉴。

1 实验部分

1.1 主要材料与实验仪器

试剂材料:壳聚糖:医药级,国药集团化学试剂有限公司生产;壳聚糖酶:浙江金壳生物化学有限公司生产;氨基葡萄糖:医药级,SIGMA公司生产;盐酸氨基葡萄糖:中国药品生物制品检定所生产;高效硅胶板:Merck公司生产;茚三酮、乙酸、乙酸乙酯、甲醇、氨水、乙酰丙酮、对二甲氨基苯甲醛、盐酸、无水乙醇、无水碳酸钠等均为国产分析纯;乙腈,色谱纯。

主要设备:DZF-6050型真空干燥箱,上海博迅实业有限公司生产;UV-2100分光光度计,UNICO公司生产;GL-208型高速冷冻离心机,日立集团生产;Thermo Orion818型pH测试仪,美国奥力龙公司生产;1835乌氏黏度计,上海良品玻璃仪器厂生产;DV-C黏度计,美国Brookfield公司生产;P7021TP-6格兰仕家用微波炉,Galanz公司生产;红外光谱仪,德国Bruker公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖脱乙酰度的测定

采用双突跃电位滴定法测定壳聚糖的脱乙酰度^[16]。脱乙酰度计算式如下:

$$\text{脱乙酰度} = [(V_1 - V_2) \times C \times 10^{-3} \times 16] / (m \times 0.0994)$$

式中: V_1 为pH产生第1次突跃的NaOH溶液的体积,mL; V_2 为pH产生第2次突跃的NaOH溶液的体积,mL; C 为NaOH溶液的浓度,mol/L; m 为壳聚糖的质量g;16为氨基的相对分子质量;0.0994为理论氨基含量。

1.2.2 壳聚糖黏均相对分子质量的测定

采用黏度法测定壳聚糖的黏均相对分子质量。根据Mark-Houwink公式计算壳聚糖的黏均相对分子质量^[17]:

$$|\eta| = 1.81 \times 10^{-3} \times M_n^{0.93}$$

式中: η 为黏度; M_n 为黏均相对分子质量。

1.2.3 影响微波降黏效果的单因素实验

取3g壳聚糖,加入一定量的 H_2O_2 、去离子水,在微波炉中于特定微波功率下处理一定时间,取出冷却后溶解于100mL的2%乙酸溶液,用旋转黏度计测黏度。

实验设定 H_2O_2 添加量为0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4mL;微波功率为120、280、460、590、700W(即低火、中低火、中火、中高火、高火);微波时间为0.5、1、2、3、4、5min。每个水平重复3次,结果取平均值。

1.2.4 正交试验优化微波-过氧化氢降黏条件

取3g壳聚糖,选择 H_2O_2 添加量(A)、微波作用时间(B)、微波功率(C)3个因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交实验。重复3次,结果取平均值,通过极差分析实验结果确定最佳的微波降黏条件,并测定所得壳聚糖的黏均相对分子质量。

1.2.5 壳聚糖红外光谱分析

采用溴化钾压片法对经微波-过氧化氢降黏处理得到的壳聚糖与原料壳聚糖分别在4000~400 cm^{-1} 范围内进行红外吸收光谱扫描。

1.2.6 壳聚糖的酶解

取0.95mL壳聚糖溶液和0.05mL壳聚糖酶液混合,45℃下酶解10min,然后加入1mL DNS试剂终止反应,沸水浴加热5min显色后迅速用流动的冷水冷却,加去离子水定容到10mL,8000r/min离心10min,取上清液于520nm下测定吸光值^[18]。对照氨基葡萄糖标准曲线计算还原糖的释放量。在上述条件下,1个单位酶活(U)定义为每分钟释放1 μmol 还原糖所需的酶量。

1.2.7 壳寡糖样品分析

壳寡糖数均相对分子质量的测定:利用乙酰丙酮法测定壳寡糖数均相对分子质量^[19]。精密称取一定量干燥至恒重的壳寡糖样品 W g,用去离子水溶解并定容至1L,精密量取3mL溶液置于试管中,加去离子水至5mL,再分别加入乙酰丙酮溶液1mL,摇匀,置沸水中水浴5min取出,迅速用流动冷水冷却,然后加入对二甲氨基苯甲醛溶液1mL,用无水乙醇定容至10mL摇匀,60℃水浴中保温1h,冷却后以0管为空白对照比色,在525nm波长处测定吸光值,通过与盐酸氨基葡萄糖标准曲线比计算壳寡糖样品的浓度 X 。

壳寡糖数均相对分子质量的计算式为:

$$Mn = (W \times 215.6) / (X \times 10^{-6} \times 1000)$$

式中: X 为壳寡糖样品的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;1000为

稀释倍数; W 为样品质量, g; 215.6 为盐酸氨基葡萄糖相对分子质量。

壳寡糖得率: 酶解液 100℃ 煮沸灭酶后, 用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 10, 4 000 r/m 离心 10 min 后取上清液抽滤, 冷冻干燥得壳寡糖样品, 称重并计算壳寡糖得率。

小分子壳寡糖的薄层层析分析: 展开剂为 $V(\text{乙酸乙酯}): V(\text{乙醇}): V(\text{水}): V(\text{氨水}) = 5: 9: 1: 0.3$, 显色剂为 0.2% 的茚三酮/乙醇溶液^[20]。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖微波降黏单因素实验

2.1.1 H₂O₂ 用量的优化

H₂O₂ 用量对壳聚糖降黏的影响如图 1 所示。随着 H₂O₂ 用量的增加, 壳聚糖的表观黏度逐渐减小。这是由于 H₂O₂ 与壳聚糖的 -NH₂ 作用, 从而连续不断地产生氧化作用极强的羟基自由基 OH·, 对 β-1,4-糖苷键进行氧化断裂, 进而实现大分子壳聚糖的降解^[21]。当 H₂O₂ 用量 < 0.2 mL 时, 壳聚糖黏度急剧下降; 当 H₂O₂ 用量 > 0.2 mL 时, 壳聚糖黏度下降趋势缓慢。

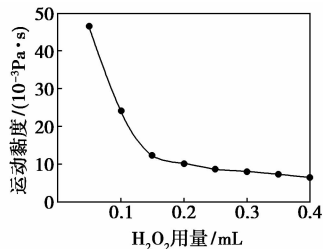


图 1 H₂O₂ 用量对壳聚糖降黏的影响

2.1.2 微波功率

微波处理可以在短时间内促进壳聚糖的降黏^[22-23]。微波功率是影响壳聚糖降解的一个重要因素, 如图 2 所示。由图 2 可知, 当微波功率 < 460 W 时, 随着微波功率的增大, 壳聚糖的表观黏度迅速降低; 当微波功率 > 460 W, 其黏度下降幅度不大。

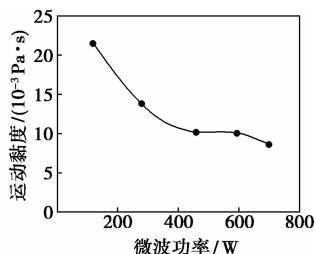


图 2 微波功率对壳聚糖降黏的影响

2.1.3 微波时间

微波时间对壳聚糖降黏的影响如图 3 所示。在微波功率为 460 W 时, 微波时间 1 min 以内, 随着微波时间的增加, 壳聚糖的表观黏度显著下降; 微波时间超过 2 min 时, 壳聚糖的表观黏度几乎不再下降, 因此, 选择微波时间 1.5 min 作为后期优化的时间范围。

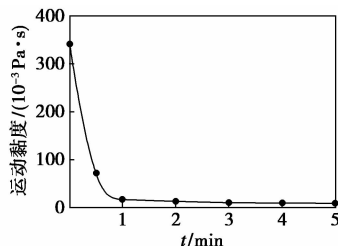


图 3 微波时间对壳聚糖降黏的影响

2.2 正交实验优化微波降黏条件

基于单因素实验结果, 选定 H₂O₂ 添加量、微波功率以及微波时间为优化因素, 设计三因素三水平正交实验进行壳聚糖降黏条件的进一步优化, 正交实验表如表 1 所示, 实验结果如表 2 所示。

表 1 壳聚糖微波-过氧化氢降黏正交水平表

水平	A	B	C
	H ₂ O ₂ 添加量/mL	微波功率/W	微波时间/min
1	0.10	120	0.5
2	0.15	280	1.0
3	0.20	460	1.5

表 2 L₉(3³) 正交试验结果

试验编号	因素			表观黏度/(Pa·s)
	H ₂ O ₂ 添加量 A/mL	微波功率 B/W	微波时间 C/min	
1	1	1	1	112.5
2	2	1	2	61.5
3	3	1	3	30.3
4	1	2	2	60.0
5	2	2	3	33.0
6	3	2	1	49.2
7	1	3	3	32.5
8	2	3	1	55.0
9	3	3	2	24.0
K1	205.0	204.3	216.7	
K2	149.5	142.2	145.5	
K3	103.5	111.5	95.8	

续表

试验编号	因素			表观黏度/ (Pa·s)
	H ₂ O ₂ 添加量 A/mL	微波功率 B/W	微波时间 C/min	
k1	68.3	68.1	72.2	
k2	49.8	47.4	48.5	
k3	34.5	37.2	31.9	
最优水平	A1	B1	C1	
R	33.8	30.9	40.3	
影响顺序	C>A>B			
优化组合	0.1	120	0.5	

由表1可以看出,对壳聚糖微波降黏影响最大的因素是微波时间,其次为H₂O₂的用量,最后是微波功率。优化组合为:H₂O₂添加量为0.1 mL,微波功率为120 W,微波时间为0.5 min,所得壳聚糖黏度为24.0 Pa·s,比原料黏度降低了96.9%。

测定经最优组合制备得到的样品的黏均相对分子质量,结果如表3所示。与壳聚糖原料相比,微波-过氧化氢协同降黏处理后的壳聚糖相对分子质量由1 247 266 Da降至535 679 Da,并且可以快速溶于乙酸溶液。

表3 壳聚糖降黏后的黏均相对分子质量

编号	1	2
作用方式	微波辐射	—
H ₂ O ₂ 添加量/mL	0.2	—
作用时间/min	1.5	—
黏均相对分子质量/Da	535679	1247266

2.3 微波处理后的壳聚糖的FT-IR分析

壳聚糖经过微波辐射和过氧化氢催化作用后,采用红外光谱进行扫描检测,结果如图4所示。3 434 cm⁻¹的宽峰是O—H伸缩振动的吸收峰与N—H伸缩振动吸收峰重叠而成的多重吸收峰,2 925、2 876 cm⁻¹和1 421 cm⁻¹处的吸收峰均归属于C—H振动,1 155 cm⁻¹归属于C—O—C不对称弯曲振动,1 079 cm⁻¹归属于C—O振动,1 650 cm⁻¹和1 321 cm⁻¹分别是酰胺I带和III带的吸收峰,1 595 cm⁻¹附近是N—H面内弯曲振动吸收峰。1 650 cm⁻¹和1 590 cm⁻¹处的吸收峰是α-壳聚糖的特征峰。895 cm⁻¹为吡喃环的振动峰。经微波-过氧化氢协同降黏的壳聚糖与原料壳聚糖的红外吸收光谱特征峰基本一致,从而推断,降黏处理后

的壳聚糖结构并未发生变化^[24-25]。

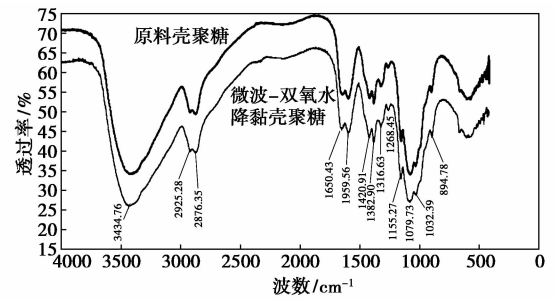


图4 微波-过氧化氢协同降黏后的壳聚糖与原料壳聚糖的红外光谱

2.4 微波处理后酶解产物的分析

2.4.1 壳寡糖基本性质

分别将壳聚糖原料与经微波-过氧化氢协同降黏处理后的壳聚糖酶解,计算壳寡糖得率,结果如表4所示。经微波-过氧化氢协同降黏处理的壳聚糖,其酶解所得的壳寡糖得率为80.1%,比未经处理的对照组的壳寡糖得率提高了11.8%。此外,通过公式计算,经过微波-过氧化氢协同降黏的壳聚糖酶解后获得的壳寡糖数均相对分子质量为2 027,即平均聚合度为10;而直接通过酶解得到的壳寡糖数均相对分子质量为3 153,平均聚合度为16。因此,采用先微波-过氧化氢降黏后再酶解的工艺促进了壳聚糖的降解,且所得酶解产物更符合壳寡糖的标准。

表4 壳寡糖样品的基本性质

样品	数均相对分子质量/Da	壳寡糖得率/%
微波处理	2027	80.1
对照	3153	68.3

2.4.2 小分子壳寡糖的薄层色谱

从小分子壳寡糖样品的薄层层析结果可以看出,不管是否经过微波-过氧化氢处理,壳聚糖酶解后的产物主要包括壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖,这说明,微波-过氧化氢处理对壳聚糖酶解没有明显影响。经微波-过氧化氢处理的壳聚糖酶解后,斑点显色明显,说明其产物壳寡糖溶液的浓度高于未经微波-过氧化氢处理的样品。

3 结论与展望

利用微波-过氧化氢协同处理壳聚糖,通过降低壳聚糖的黏度辅助促进其酶解制备壳寡糖。经过单因素实验与正交实验,确定了影响壳聚糖微波-

过氧化氢降黏效果的因素顺序是:微波时间、 H_2O_2 的用量、微波功率;优化后的降黏条件是: H_2O_2 添加量为 0.1 mL,微波功率为 120 W,微波时间为 0.5 min,所得壳聚糖黏度比原料黏度降低了 96.9%。微波-过氧化氢的协同处理没有对壳聚糖的结构造成破坏,同时对酶解过程也没有明显影响。酶解结果表明,先经微波-过氧化氢协同降黏再酶解的壳寡糖得率为 80.1%,比未经处理的提高了 11.8%,产物壳寡糖数均相对分子质量为 2 027,平均聚合度为 10,明显低于未经降黏处理而直接酶解所得的壳寡糖。采用微波-过氧化氢协同降黏的工艺处理壳聚糖,可以在短时间内高效率地获得大量壳寡糖,这为壳寡糖的大规模制备提供理论依据。

参考文献

[1] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京:化学工业出版社,2001.

[2] Kim S K, Park P J, Yang H P, et al. Subacute toxicity of chitosan ligoglycosaccharide in Sprague-Dawley rats[J]. *Arzneimittel Forschung*, 2001, 51(9):769-773.

[3] 许青松,白雪芳,杜显光. 壳寡糖及其衍生物抗肿瘤作用的研究进展[J]. *食品与药品*, 2008, 10(5):60-62.

[4] Karagozlu M Z, Kim J A, Karadeniz F, et al. Anti-proliferative effect of aminoderivatized chitooligosaccharides on AGS human gastric cancer cells[J]. *Process Biochem*, 2010, 45(9):1523-1528.

[5] Lee H W, Park Y S, Jung J S, et al. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp[J]. *Anaerobe*, 2002, 8(2):319-324.

[6] 高仕瑛,任林,刘碧源. 甲壳低聚糖的微生物生态学效应[J]. *中国微生物学杂志*, 2002, 14(3):132-134.

[7] Kim K W, Thomas R L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights[J]. *Food Chem*, 2007, 101(1):308-313.

[8] Fernandes J C, Eaton P, Gomes A M, et al. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation[J]. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(8):854-860.

[9] 夏文水,魏新林. 甲壳低聚糖制备研究进展[J]. *应用化学*,

2004, 21(1):332-337.

[10] 马镛,吴元华,赵秀香. 壳寡糖的制备、分离分析方法及在农业上的应用[J]. *现代农药*, 2007, 6(2):1-5.

[11] 邵健,姚成. 低聚氨基葡萄糖的吸湿、保湿和抑菌性质[J]. *中国海洋药物*, 2000, 19(4):25-27.

[12] 蔡圣宝,邢荣娥,刘松,等. 两种方法制备壳寡糖平均分子量与氨基含量分析[J]. *海洋科学*, 2009, 33(5):70-73.

[13] Wang S L, Lin H T, Liang T W, et al. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials[J]. *Bioresource Technol*, 2008, 99(10):4386-4393.

[14] Prashanth K V H, Tharanathan R N. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential: An overview[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2007, 18(3):117-131.

[15] 严钦,沈月新,王馥. 壳寡糖制备研究进展[J]. *上海水产大学学报*, 2002, 11(4):383-387.

[16] 贾之慎,李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. *化学世界*, 2001(5):240-253.

[17] 刘松,邢荣娥,于华华,等. 微波辐射对不同介质均相壳聚糖的降解研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(10):30-34.

[18] 曾嘉,郑连英. 通过酶促反应制备壳寡糖[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 27(10):1-4.

[19] 韩宝芹,位晓娟,房子,等. 乙酰丙酮法测定甲壳胺寡糖数均分子量[J]. *中国海洋药物*, 2004, 23(6):12-17.

[20] 孟显丽,陈国华,孙明昆,等. 薄层色谱法分析壳寡糖[J]. *青岛海洋大学学报:自然科学版*, 2002, 32(4):641-644.

[21] Tian F, Liu Y, Hu K, et al. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide[J]. *Carbohydr Polym*, 2004, 57(1):31-37.

[22] Li K C, Xing R, Liu S, et al. Microwave-assisted degradation of chitosan for a possible use in inhibiting crop pathogenic fungi[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(5):767-773.

[23] 丁盈红,李若琦,伍锐贤,等. 微波辐射快速制备水溶性壳聚糖[J]. *中国生化药物杂志*, 2002, 23(3):132-133.

[24] Huang J, Zhao D K, Hu S, et al. Biochemical activities of low molecular weight chitosans derived from squid pens[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(3):2231-2236.

[25] Sun T, Zhou D X, Xie J L, et al. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity[J]. *Eur Food Res Technol*, 2007, 225(3/4):451-456. ■

国办印发排污权有偿使用和交易试点工作指导意见

国务院办公厅近日印发《关于进一步推进排污权有偿使用和交易试点工作的指导意见》,提出到 2015 年底前试点地区全面完成现有排污单位排污权核定,到 2017 年底基本建立排污权有偿使用和交易制度,为全面推行排污权有偿使用和交易制度奠定基础。

《意见》指出,排污权是指排污单位经核定、允许其排放污染物的种类和数量。建立排污权有偿使用制度,要严格落实污染物总量控制制度,试点的污染物应为国家作为约束性指标进行总量控制的污染物,试点地区也可选择对本地区环境质量有

突出影响的其他污染物开展试点。排污权出让收入统筹用于污染防治,任何单位和个人不得截留、挤占和挪用。试点地区财政、审计部门要加强对排污权出让收入使用情况的监督。

《意见》提出,要激活交易市场,试点地区要积极支持和指导排污单位通过淘汰落后和过剩产能、清洁生产、污染治理、技术改造升级等减少污染物排放,形成“富余排污权”参加市场交易;建立排污权储备制度,回购排污单位“富余排污权”,适时投放市场,重点支持战略性新兴产业、重大科技示范等项目建设。(张力)