

(青岛海洋大学 266003)

郑立 陈西广 刘晨光 刘万顺 刘成圣:

## 几丁聚糖降解技术的研究进展\*

### THE PROGRESS OF CHITOSAN RESEARCHES ON HYROLYZATION

几丁聚糖 (Chitosan) 是几丁质脱乙酰化产物, 分子量通常数十万, 可溶于少数弱酸。当几丁聚糖在一定条件下降解成小分子几丁低聚糖后, 其溶解性能大大改观, 分子量数千时能直接溶解于水, 并易于被吸收, 具有抗菌、抗肿瘤和提高植物防御能力的功效, 因而比几丁质和大分子几丁聚糖具有更广泛的用途, 在医用材料、药物制剂, 日用化妆品以及环境保护、农业、食品和纺织工业等众多领域, 逐步为人们所关注。本文就几丁聚糖的几种降解技术进行综述。

#### 1 酸降解法

由于糖苷键对酸不稳定, 几丁聚糖在酸性溶液中会发生水解。在一定条件下能被无机酸完全水解, 酸在水解过程中起到催化作用, 水解最终产物和水解速度通常随酸度及温度等水解条件的不同而改变。水解后的寡聚糖常常受到酸和热的作用发生进一步分解或产生别的副产物, 所以应当尽量选择较温和的条件和较低的酸浓度, 以获得特定产物。

##### 1.1 盐酸降解

几丁聚糖在稀盐酸作用下易于部分降解, Tani da 等 1989 年将几丁聚糖溶解于 0.2 mol/L 的盐酸中配置成 2% 的溶液, 在高压蒸锅中

反应, 然后用 NaOH 中和, 获得分子量为 1 000 ~ 5 000 的低聚糖。Kikka wa 1990 年用逐次加入盐酸法, 对几丁聚糖进行分步降解, 最后用丙酮沉淀以获得低聚糖。所得低聚糖的聚合度  $\leq 9$ , 并且在 4 ~ 9 之间的含量较高。Kage 等人<sup>[3]</sup> 则用浓盐酸和 28% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同作用, 制备了寡聚糖。具体方法如下: 将 10 g 几丁聚糖分散于 250 ml 水中, 逐滴加入 5 ml 浓盐酸, 80 °C 下反应 2 h, 然后缓慢加入 28% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 ml 和 2 ml 浓盐酸, 离心后在凝胶产物中加入 7.0 ml 浓盐酸, 80 °C 下反应 5 ~ 6 h, 用 28% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 漂白, 即可得到寡聚糖。

##### 1.2 乙酸钠水解

Tani da 等 1989 年将几丁聚糖溶解于乙酸, 配制成 2% 的均相溶液, 在一定压力下, 加热到 120 °C, 反应 60 min 后用 NaOH 中和, 可以得到分子量在 1 000 ~ 5 000 的水溶性低聚糖, 用于食品的保存。

Koorya ma 等 1994 年也用乙酸制备了水溶性的几丁聚糖, 方法是将 20 g 几丁聚糖 (旋转黏度为 12 CP) 分散于 180 ml 水中, 加入 13.7 g 35% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 4 g 乙酸, 于 50 °C 降解了 18 h。然后缓慢加入 NaOH, 调节 pH 值到 10。在 5 °C 静置 18 h, 离心去除水不溶物, 上清液经透析、浓缩、丙酮沉淀, 得到水

表 1 几丁聚糖的乙酸降解

水解时间 (h)	数均分子量	特性黏度 (ml/g)
40	630 050	780
64	450 775	549
136	241 575	389
164	180 250	272
200	156 620	198
250	96 585	156
380	47 820	75

注: 引自蒋挺大编著, 甲壳素。1995。

溶性几丁聚糖。

Roberts 和 Domszy 于 1982 年研究了几丁聚糖在 70 °C、10% 乙酸溶液中的水解, 实验结果见表 1, 从表中可以看到降解的最初时间, 几丁聚糖的分子量快速下降, 随着时间的延长下降速度逐渐减慢, 降解后的产品数均分子量都在几万左右, 并且降解所需时间较长, 处理过程困难, 不宜于大规模生产。

##### 1.3 磷酸降解

Hasegawa 和 Isogai 1993 年用 85% 的磷酸, 在室温下均相水解几丁聚糖, 反应一段时间后, 加入过量的甲醇, 在溶液中分级得到水溶性和水不溶性两种几丁低聚糖, 其聚合度分别为 16.8 和 7.3, 产率分别为 43% 和 12.5%。

\* 海洋“863”资助项目 81807-01 号。  
收稿日期: 1999-11-09;  
修回日期: 2000-01-14



#### 1.4 Horowitz 法降解

Horowitz 1957 年将几丁聚糖经乙酸和碱处理后用 0.1 mol/L 盐酸制成几丁聚糖盐酸盐,然后在 53 °C, 4 mol/L 的盐酸中反应 48 h,得到寡聚糖混合物,浓缩干燥后经阳离子树脂(Dowex 50H)色谱分离,用盐酸梯度洗脱,可得到聚合度为 1~5 的寡聚糖,此法可分离自由氨基葡萄糖,分离较有效,也可进行大规模色谱分离,制得寡聚糖。

#### 1.5 盐酸(或乙酸)-亚硝酸盐降解

Tomoya 和 Yoshichi 1987 年将几丁聚糖完全溶解于酸中,然后再加入亚硝酸盐,或者先将几丁聚糖分散于亚硝酸盐的水溶液中,然后缓慢加入酸,反应在室温下进行,产率可达到 90% 以上。

## 2 酶解法

几丁聚糖的酸性水解法,由于是非特异性的,所以分解步骤难以控制,特别是不易得到高聚合度的寡糖 (> 6),而酶解法却具有特异性,可选择性的切断几丁聚糖分子中  $\beta$ -1, 4 糖苷键,从而制得特定的寡聚糖,不发生其他副反应,反应条件温和,对环境污染少。

目前,几丁聚糖水解酶主要有几丁聚糖酶、溶菌酶和 N-乙酰葡萄糖胺酶。除了这些专一性的水解酶外,还发现包括糖酶、蛋白酶、脂肪酶等在内的 30 多种水解酶对几丁聚糖有部分或完全的非专一性水解有作用。

#### 2.1 几丁聚糖酶

几丁聚糖酶(Chitinase, EC3.2.1.99)主要分布于细菌、真菌及高等植物的叶子、种子、果汁中,其中在微生物中分布最多,有着广泛的生理功能,人们已经相继从许多微生物体内分离纯化了具有种属特异性的酶。

几丁聚糖酶仅能作用于几丁质脱乙酰化反应后的产物或几丁聚糖,并以内切作用方式将几丁聚糖分解为聚合度为 2~8 的低聚糖。

几丁聚糖酶作用的最适 pH 值为 4.0~6.8。Mizzarelli 等于 1993 年研究了儿丁聚糖酶对具有不同 N-乙酰度的几丁聚糖的水解作用,在均相反应中,随着 N-乙酰化度的提高,  $K_m$  增大,  $V_{max}$  降低。在非均相反应中,具有一定 N-乙酰度的几丁聚糖却易于被水解,但当脱乙酰度 < 36% 时,由于几丁聚糖不能溶解,从而难以被水解。故酶的来源和底物脱乙酰度的不同,其酶活力和水解产物是不同的(见表 2)。

#### 2.2 溶菌酶

表 2 几丁聚糖酶的来源及特性

酶来源	水解产物	文献
<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M	(GlcN) <sub>2</sub> —(GlcN) <sub>8</sub>	Ohtakara 等, 1987 年
<i>Bacillus</i> sp. PI-7s	(GlcN) <sub>2</sub> —(GlcN) <sub>6</sub>	Seino 等, 1991 年
<i>Beauveria bassiana</i> QM 7435	(GlcN) <sub>2</sub> —(GlcN) <sub>6</sub>	Monaghan 等, 1973 年
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037	(GlcN) <sub>2</sub> —(GlcN) <sub>6</sub>	Ohtakara 等, 1984 年
<i>Streptomyces</i> sp. No. 6	(GlcN) <sub>2</sub> —(GlcN) <sub>3</sub>	Lzume 等, 1987 年

溶菌酶(Lysozyme, EC3.2.1.17)存在于鸡蛋蛋白、人的眼泪及唾液,因为具有水解  $\beta$ -1, 4 糖苷键的能力,故几丁聚糖是其天然底物之一。几丁聚糖能够生物降解,也就是被生物体内所产生的溶菌酶水解消化的结果。日本四国工业技术研究所利用这一特性,将几丁聚糖添加淀粉制得生物降解塑料片材,使得丢弃后的材料能被土壤及海水中的微生物分解,从而对环境不会造成污染<sup>[2]</sup>。

Nordtveit 于 1994 年研究发现,溶菌酶和几丁聚糖反应体系遵循 Michaelis-Menten 动力学,随着 N-乙酰化度的增加,其反应初速度增加,但由于 N-乙酰化度的增加,几丁聚糖的水溶性下降,也会影响到

酶的活力。对于 N-乙酰化度极低 (AD < 1%) 的几丁聚糖,则可作为溶菌酶的竞争性抑制剂。Y. Ikada 等<sup>[4, 5]</sup>对几丁聚糖薄膜在溶菌酶作用下于 pH 7, 37 °C 的体外降解和其鼠背部皮下植入物的体内降解研究也表明,脱乙酰化度 68.8% 的几丁聚糖体内生物降解比脱乙酰度 73.3% 的快得多,可以认为几丁聚糖的生物降解性主要由其乙酰化度控制。

#### 2.3 非专一性水解酶

非专一性水解酶主要来源于微生物、动物和植物,这些酶多包括糖酶、蛋白酶、脂肪酶等。迄今为止,已经发现有 16 种聚糖酶对几丁聚糖有降解行为,较为显著的是果

胶酶和纤维素酶,以溶液黏度的下降表示水解效果,则黏度下降达 98%~99%。其次,黑曲菌(*Aspergillus niger*)产生的脂肪酶 AIE,木瓜蛋白酶(Papain),无花果蛋白酶(Ficin),菠萝蛋白酶(Bromelain)等巯基蛋白酶以及酸性胃蛋白酶(Pepsin)的水解作用也相当显著。各类水解酶在水解过程初期,溶液黏度快速下降,说明酶主要以内切方式作用,反应不遵循 Michaelis-Menten 动力学,提高底物浓度或提高酶浓度均可提高反应速度。最终产物寡聚糖分子量在 10 kD 左右,水解最适 pH 值为 3~5。

## 3 氧化降解

氧化降解在最近几年研究较



多,特别是日本,每年都有许多这方面的研究成果。这些方法中有的已经用于工业化生产,有的还处于研究阶段。诸多氧化降解法中,过氧化氢法开发得最为广泛。

Hirano 等 1986 年将几丁聚糖分散于含有 0.8%~10%的过氧化氢水溶液中,在 40~100℃条件下反应至几丁聚糖完全溶解,获得小分子低聚糖。在反应体系中,过氧化氢的浓度和反应时温度的控制对产物的性质有直接影响。陈盛、林日曦等<sup>[1]</sup>将几丁聚糖溶解于 10 倍体积 5%乙酸水溶液成为均一胶体,再加入与几丁聚糖等量的过氧化氢溶液,50℃反应 24 h 呈黄色无黏性液体,此几丁聚糖的平均聚合度在 10 左右。除过氧化氢法外,其他还有  $\alpha_2$  法、 $\alpha_0$  法、羟基氧化法<sup>[2]</sup>等。

Tsuchida<sup>[6]</sup>研究发现  $\text{HBrO}$ 、 $\text{HBrO}_2$ 、 $\text{HBrO}_3$  或其盐均能降解几丁聚糖。将几丁聚糖在液相介质中用  $\text{NaBrO}_2$  室温下处理 0.5 h,可以得到 94%的无色水溶性几丁低聚糖。降解的程度可通过改变 pH 值或反应时间来控制。

#### 4 超声波降解

超声波可以打开几丁聚糖酸溶液中的  $\beta$ -1,4 糖苷键,直接并加速几丁聚糖降解。王伟等 1989 年用超声波研究几丁聚糖在 60℃、乙酸溶液中的水解情况发现:随水解时间的延长,开始时降解速度很快,在 0.5 h 内,黏度下降了 32%,以后逐渐减慢,到 15 h,黏度下降了 80%,并且水解过程中乙酰化度并没有发生改变。

Kage<sup>[7]</sup>用 28 kHz 45 W 的超声波在 60℃下对 0.24%的几丁聚糖盐酸溶液辐射 30 h,即得寡聚糖。还有研究<sup>[8]</sup>发现超声波作用下的几丁聚糖酸性溶液,在较低温度和稀溶液中降解得快,并且随作用时间的延长,降解程度增加。

#### 5 展望

几丁低聚糖和几丁寡糖溶解性能好,分子量小,易于吸收,其用途已涉及人类社会的诸多领域。大量研究表明低分子壳聚糖具有降低胆固醇、降低甘油三酯的功能,是一种理想的保健食品。在医学方面,低分子壳聚糖具有提高机体免疫能力、抗癌和抑菌功能。寡糖是

人体内双歧杆菌的糖源,人体摄取寡糖有利于提高有益菌群的生长,进而达到调节肠内 pH,抑制大肠有害菌生长,提高抗病力,促进肠道蠕动,减轻便秘,促进维生素  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_2$ 、 $\text{B}_6$ 、 $\text{B}_{12}$ 、叶酸的合成。但工业化生产的几丁聚糖的降解技术还有待于进一步研究,早日探索出最佳降解技术路线,对于开发低分子几丁聚糖和寡糖有着重要的意义。

#### 参考文献

- 1 陈盛、林日曦等.应用化学,1998,15(4):65~67
- 2 四国工业技术研究所.工业技术,1996,37:34
- 3 Kage T., Yamaguchi T.. JP09 31 104. 1997
- 4 Kenji Tomihata, Yoshito Ikada. *Biomaterials*, 1997,18:567
- 5 Tanioka S., Matsui Y. et al.. *Bioscience, Biotechnology, Biochem.*, 1996,60:2 001~2 004
- 6 Tsuchida S., Ikada K.. JP08208708. 1996
- 7 Kage T., Yamaguchi T.. JP0931105. 1997
- 8 Chen Rong Huei, Chang Jan Rong. *Carbohydr. Res.*, 1997,299:287~294