

甲壳低聚糖功能性质

夏文水 吴焱楠

(食品学院)

摘要 对5种平均分子量(MW)分别为1500,3000,5000,8000,13000甲壳低聚糖的水溶性、保湿性、吸湿性以及抑菌作用进行了研究。结果表明:MW1500和3000的甲壳低聚糖具有优良的水溶性,其吸湿性和保湿性强于透明质酸、乳酸钠和甘油,并且也有显著的抑菌作用。甲壳低聚糖的分子量大小和游离氨基的存在是影响其功能性质的关键因素。

主题词 甲壳低聚糖;水溶性;保湿性;吸湿性;抑菌作用

中图分类号 Q 539.7

0 前言

甲壳低聚糖(Chitooligosaccharides)是甲壳素(Chitin)和壳聚糖(Chitosan)经水解生成的一类低聚物。近年来随着研究的深入,甲壳低聚糖展现出独特优越的生理活性和功能性质:提高巨噬细胞的吞噬功能,促进脾脏抗体生成,抑制肿瘤细胞的生长^[1~3];在人体肠道内能活化增殖双歧杆菌;降低血压、吸附胆固醇;在微酸环境具有较强抑菌抗菌作用;显著的保湿吸湿能力等^[4]。为此,甲壳低聚糖的研究引起人们极大的兴趣。甲壳素和壳聚糖的水解包括化学法和酶法。化学法降解甲壳素或壳聚糖较难控制,产物转化率低。据文献报道,除专一性水解酶甲壳素酶(Chitinase)和壳聚糖酶(Chitosanase)外,一些易从商业中得到的糖酶、蛋白酶、脂肪酶等对壳聚糖也有部分或全部非专一性水解作用。

作者找到一类非专一性水解酶,通过控制相关条件,可有效地降解壳聚糖,得到平均分子量(MW,以还原糖计算)为1500,3000,5000,8000,13000的低聚物。本研究测定了这5种甲壳低聚糖的水溶性、吸湿性、保湿性及抗菌抑菌活性,并探讨了甲壳低聚糖功能性质与分子量之间的关系。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖和甲壳素 连云港科惠海洋生物制品有限公司和启东甲壳素厂产品,理化指标

收稿日期:1996-06-07

自测,结果见表 1.

透明质酸 新日本化学工业会社产品
N-乙酰氨基葡萄糖 Sigma 产品
氨基葡萄糖盐酸盐 Sigma 产品
其余试剂均为化学纯以上试剂

表 1 甲壳素和壳聚糖理化指标

原料名称	粘度 (mpa.s ⁻¹)*	DD** (%)	灰分 (%)	分子量***
壳聚糖	41.86	64.34	1.06	220,000
甲壳素	—	<45	1.64	—

* Haake 粘度仪测定,1g 壳聚糖溶于 100ml 1%醋酸溶液,温度为 25℃,剪切速率为 150s⁻¹.
** 减量法滴定^[5]
*** 粘度法测量,溶剂为 1%醋酸溶液^[6]

1.2 实验方法

1.2.1 不同分子量甲壳低聚糖的制备^[7]

采用非专一性水解酶,在不同条件下,对壳聚糖进行水解。水解液经除去杂蛋白、脱盐等纯化精制后,样品冷冻干燥。

1.2.2 O-羧甲基壳聚糖制备^[8] 甲壳素(40~60 目)浸泡于质量分数 45% NaOH 溶液,料液比 1:3,室温下 4~7h 后,逐渐加入氯乙酸。反应 12h 后,用盐酸中和 pH8~9,加入体积分数 70%乙醇溶液析出沉淀物,沉淀物重新溶于去离子水,重复几次后,产品冷冻干燥。

1.2.3 多糖水溶性测定 称取 1g(W₃) 过 20 目筛的样品,加 100ml 去离子水,在 25℃搅拌,保温 30min,然后在室温下离心(3000r/min)15min,倾去上清液,沉淀物如上述处理,重复 2 次;最后将离心沉淀物加水 100ml,25℃保温 30min,并不断搅拌,用预先恒重(W₁) 古氏漏斗过滤,滤渣用乙醇充分洗涤,在 105℃条件下干燥 2~4h,称恒重(W₂),根据下式求得样品水溶性:

水溶性(%)=100[W₃-(W₂-W₁)]/W₃

1.2.4 保湿性和吸湿性测定^[9] 室温下,样品在干燥器中用 P₂O₅ 减压干燥 12h 以上。吸湿性试验直接用该干燥样品,而保湿性试验则在干燥样品中,加入其质量 10%的去离子水。用透明质酸、乳酸钠、甘油作对照试验。

1) 吸湿试验 室温下,精确称取 0.5g 样品加入直径 3cm 的称量瓶中,将称量瓶放置在干燥器中,干燥器内放有碳酸钙饱和溶液(相对湿度,RH81%)或硫酸铵饱和溶液(RH41%);放置时间为 12,24,36,48h,分别称量样品放置前质量(W₀)和放置后质量(W_n),根据下式计算吸湿率:

吸湿率(%)=100(W_n-W₀)/W₀

2) 保湿试验 室温下,精确称取 0.5g 样品及质量分数 10%的去离子水,加入直径 3cm 的称量瓶中;将称量瓶放置在预先装有硫酸铵饱和溶液(RH43%)或干硅胶的干燥器内;放置时间为 12,24,36,48h,分别称量样品放置后水分量 H_n和添加水分量 H₀,根据下式计算水分残存率:

水分残存率(%)=100 H_n/H₀

1.2.5 抗菌抑菌活性测定^[10] 用无菌吸管吸取培养 18h 的大肠杆菌菌液 0.2ml 于无菌平皿内,倒入已熔化并冷至 45℃左右的营养琼脂培养基,充分摇匀,水平放置待凝;已凝固的用记号笔在平皿底划成 4 等分;样品溶解于 0.5% 醋酸溶液灭菌备用,以醋酸溶液作空白样;用无菌镊子将小圆形滤纸片(直径 0.5cm)分别浸入各样品溶液中,取出并在试管内壁上除去多余溶液后,以无菌操作将纸片放入培养皿的小区中心,重复 4 次;将放好滤纸片的含菌平皿倒置,于 37℃培养 24h,取出测定抑菌圈大小,确定抗菌抑菌效果。

1.2.6 甲壳低聚糖分子量测定^[11] 精确称取 0.5g 铁氰化钾,溶解于 1L 0.5mol/L Na₂CO₃ 溶液,贮藏于棕色试剂瓶,作为显色剂。做还原糖分析时,在试管中加入 2ml 显色剂

和 1.5ml 样品溶液,振荡均匀后,用铝箔封闭试管口,在沸水浴中加热 15min,随后用冷水冷却。以去离子水作空白,在波长 420nm 处测量光密度值。以 N-乙酰氨基葡萄糖做标准曲线。根据下述公式计算分子量:

$$\text{分子量} = \frac{\text{被测样品总糖浓度 (g/L)} \times 221.1}{\text{被测样品还原糖当量浓度 (g/L)}}$$

2 结果与讨论

2.1 甲壳低聚糖水溶性

甲壳素为天然直链多聚糖,糖链上含有大量 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{NHCOCH}_3$, 在生物体内,对称同向或反向平行糖链之间以氢键相连,晶体结构完整,不溶于一般溶剂,只溶于强无机酸、氟化醇及含有 5% 氯化锂的 N,N'-二甲基乙酰胺。壳聚糖经脱乙酰化反应后,游离 NH_2 含量增加,晶体结构受到破坏,仅能溶于稀酸溶液,这一特性在很大程度上限制其广泛应用。壳聚糖经酶解后,分子链长度减短,分子量下降。这样,在水溶液中,各分子链之间运动更加无序,分子链上游离 NH_2 水合作用增强,有助于提高其水溶性。从图

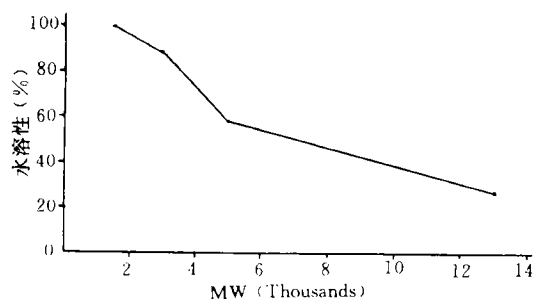


图1 分子量对低聚糖水溶性的影响

1 中可以看出:随着分子量下降,水溶性显著上升。低聚糖(MW 1500)水溶性高达 98.88%,而相对于壳聚糖其水溶性仅为 6.84%。说明甲壳低聚糖的分子大小是决定其水溶性高低的主要因素。

2.2 甲壳低聚糖吸湿性和保湿性

将 5 种不同平均分子量的甲壳低聚糖和对照物 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG), O-羧甲基壳聚糖(CMchitosan),透明质酸(HA),甘油和乳酸钠进行吸湿和保湿试验,比较它们之间吸湿和保湿能力。结果见图 2,图 3 和表 2。从图 2 和图 3 中可以看到,在相对湿度(RH)为

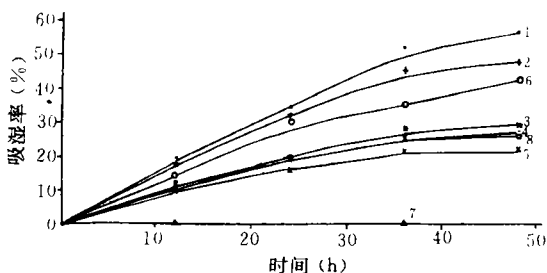


图2 分子量对低聚糖水溶性的影响

RH81% 12°C

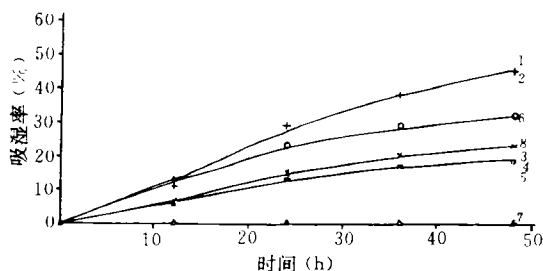


图3 低聚糖及对照物保湿进程曲线

RH43% 12°C

1. MW1500 2. MW3000 3. MW5000 4. MW8000 5. MW13000 6. HA 7. NAG 8. CMChitosan

81%和 43%时,甲壳低聚糖和对照物都随着时间的增加而吸湿性逐渐增加,达到一定吸湿率时,曲线趋向平缓,吸湿速率减小。甲壳低聚糖(MW1500 和 3000)显示了最大的吸湿速率,RH81%和 12h 后,吸湿率达到 19.52%和 18.08%,而对照物透明质酸和 O-羧甲基壳

聚糖则为 10.55% 和 9.64%。在 RH 高时,吸湿率比 RH 低时更大。但当 RH 从 81% 下降到 43% 时,低聚糖 (MW3000) 吸湿率仅减少了 2.89%, 而透明质酸却下降了 10.79%。从表 2 可看出 MW5000 的甲壳低聚糖,其吸湿和保湿能力与食品和化妆品中常用的保湿剂乳酸钠和甘油接近。当 MW 为 3000 时,吸湿和保湿能力则超过它们。这说明低聚糖 (MW1500 和 3000) 具有很强的吸湿和保湿能力,效果明显优于对照物。

表 2 低聚糖及对照物吸湿保湿试验结果

样品名称	吸湿率 %		水分残存率 %	
	RH81 %	RH43 %	RH43 %	干硅胶
甲壳低聚糖 (MW1500)	56.24	45.18	604.18	80.38
甲壳低聚糖 (MW3000)	48.27	45.38	602.32	81.9
甲壳低聚糖 (MW5000)	29.72	19.26	427.83	35.81
甲壳低聚糖 (MW8000)	26.28	18.91	242.86	30.74
甲壳低聚糖 (MW13000)	22.22	18.31	196.64	32.90
N-乙酰氨基葡萄糖	0	0	4.42	0
O-羧甲基壳聚糖	27.15	23.65	267.79	51.64
透明质酸	42.91	32.12	277.07	58.93
乳酸钠	45.24	37.03	470.49	17.23
甘油	42.53	38.03	420.93	22.31

注:试验结果为样品经过 48h 后,温度 12℃ 测得

图 4 和图 5 反映了甲壳低聚糖与对照物对水的保持能力。从图 4 中可看出,在 RH 为

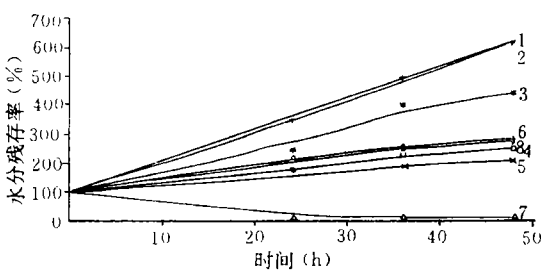


图 4 低聚糖及对照物保湿进程曲线
RH43% 12℃

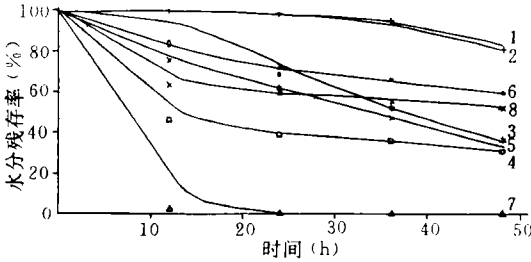


图 5 低聚糖及对照物保湿进程曲线
干硅胶 12℃

1. MW1500 2. MW3000 3. MW5000 4. MW8000 5. MW13000 6. HA 7. NAG 8. CMChitosan

43% 时,除了 NAG 外,所有受试物都随着时间的增加,水分不仅没有失去而且水分残存率逐渐增加,说明都具有保湿能力,而 NAG 则没有该功能。特别是 MW1500 和 3000 的甲壳低聚糖保湿能力最大,水分残存率基本上呈线性上升。在图 5 中,当用于硅胶干燥时,低聚糖和对照物的水分保持能力随着时间的增加而有所下降,各种受试物的水分损失速率不同,在 24h 后,NAG 的水分残存率几乎为零,而 MW1500 和 3000 低聚糖的水分残存率基本在 95% 以上,说明这两种甲壳低聚糖的保湿能力强于其他低聚糖和对照物。

图 6~8 反映了甲壳低聚糖的分子量大小对其吸湿和保湿能力的影响。从图中可以看出,随着分子量的增加,吸湿率和水分残存率不断减小;MW 为 1500 时具有最大值,即吸湿和保湿能力最大;当 MW 上升到 3000 时,吸湿和保湿能力基本不变,然而当 MW 达到 5000 时,则吸湿和保湿能力明显下降,各项指标仅为 MW3000 时的一半。另一方面,N-乙酰氨基葡萄糖既无吸湿性也无保湿性,这说明甲壳低聚糖的分子量大小对吸湿和保湿功能具有决定性作用。具有一定聚合度的甲壳低聚糖 (MW1500~3000) 吸湿和保湿能力大,可能与分子链易形成网状结构而滞留水分有关。甲壳低聚糖的吸湿和保湿能力还在于其分子链上有游离氨基,它与水分子相互作用,影响水的活度和流动阻力。同时,—NH₂ 和 —NHCOCH₃ 基团之间易形成氢键而使分子链产生网状结构。表 3 的实验结果有助于说明这一点。甲壳

低聚糖(MW1500)中加入 50% 水,于 80℃ 烘箱中经 Maillard 反应 0.5h 后,低聚糖从原来的白色粉末变为黄色块状物,测定该产物其游离氨基含量为 1.61%,比原来减少 1.26%,发现这种产物的水溶性、吸湿性和保湿性都大大小于低聚糖。

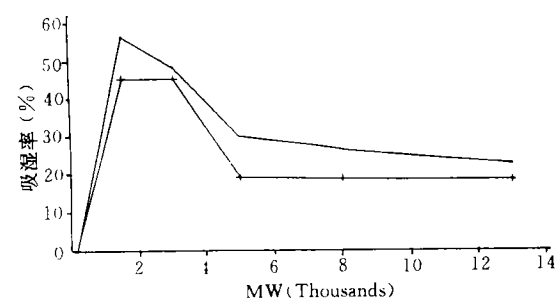


图 6 分子量对低聚物吸湿性的影响
12℃ 48h RH 81% RH 43%

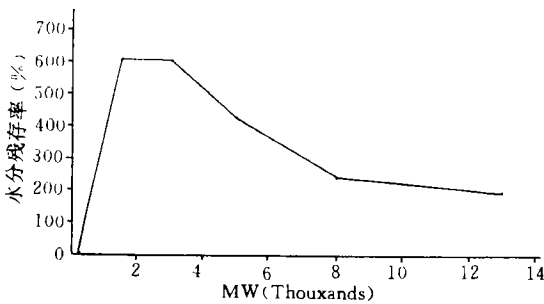


图 7 分子量对低聚糖保湿性的影响
RH 43% 12℃ 48h

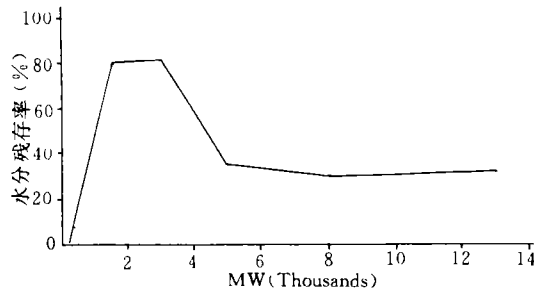


图 8 分子量对低聚糖保湿性的影响
干硅胶 12℃ 48h

表 3 甲壳低聚糖与其 Maillard 反应物
功能指标比较

项目名称	甲壳低聚糖	Maillard 反应物
外观	白色粉末,无味	黄褐色,附有气味
游离氨基含量	5.87 %	1.61 %
水溶性	98.88 %	23.65 %
吸湿性(RH81 %)	56.24 %	18.23 %
保湿性(干硅胶)	80.38 %	10.11 %

2.3 甲壳低聚糖的抗菌抑菌作用

5 种甲壳低聚糖,2 种单糖 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖盐酸盐以及壳聚糖,以体积分数 0.5%醋酸溶液为空白样,对象菌为大肠杆菌,检测它们抗菌抑菌活性的大小,试验结果见表 4。可以看出,MW1500 低聚糖抑菌效果最强。随着分子量上升,抑菌效果逐渐下降,但依然较显著,甚至包括壳聚糖。对于 2 种单糖,氨基葡萄糖盐酸盐抑菌作用显著,而 N-乙酰氨基葡萄糖则不显著。说明游离氨基存在是形成抑菌抗菌作用的基础。

表 4 甲壳低聚糖对大肠杆菌的抗菌抑菌作用

样品名称	浓度(ppm)	抑菌效果	样品名称	浓度(ppm)	抑菌效果
N-乙酰氨基葡萄糖	500	—	甲壳低聚糖(MW8000)	500	+
氨基葡萄糖盐酸盐	500	+	甲壳低聚糖(MW13000)	500	+
甲壳低聚糖(MW1500)	500	++++	壳聚糖	500	+
甲壳低聚糖(MW3000)	500	+++	空白	—	—
甲壳低聚糖(MW5000)	500	++			

注:— 表示不显著,+ 表示显著

3 结 论

MW1500 和 3000 的甲壳低聚糖有优良的水溶性,其吸湿和保湿能力高于透明质酸、乳酸钠和甘油,并且也有显著的抑菌作用,这是甲壳低聚糖独特而重要的功能性质。这类低聚糖将在食品、化妆品和医药中具有极其诱人的应用前景。甲壳低聚糖的分子量大小和游离氨基的存在是影响其功能性质的关键因素。甲壳低聚糖功能性质的研究,为指导甲壳低聚糖的生产及其推广应用提供了依据。

参 考 文 献

- 1 Muzzarelli R A A. Chitin, Oxford Pergamon Press, 1977
- 2 Suzuki K, Tokoro A, et al. Microbiol. Immunol. 1986, 30: 777~787
- 3 刘环淑. 食品工业(台湾). 1994, 26(1): 26~36
- 1 Domard A, Noel L. Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Applied Science, London and New York, 1992. 387~392
- 5 汪志君. 化学世界, 1986, 1: 22
- 6 Roberts G A F, Domszy J G. Int. J. Boil. Macromol., 1982, 4: 374
- 7 吴焱楠. 甲壳低聚糖制取及其应用研究. [硕士学位论文]. 1996
- 8 Muzzarelli R A A. Carbohydrate Polymers, 1988, 8
- 9 Shuichi M, Hanching C, et al. 油化学(日文), 1989, 38(6): 492~500
- 10 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学试验. 高等教育出版社, 1994
- 11 Imoto T, Yagishita K. Agr. Biol. Chem., 1977, 35(7): 1154~1156

Functional Properties of Chito-oligosaccharides

Xia wenshui Wu yannan

(School of Food Science & Technology)

Abstract Functional properties of five chitooligosaccharides with average molecular weight (MW) of 1500, 3000, 5000, 8000, 13000 respectively were investigated. It was showed that the water solubility of chitooligosaccharides (MW1500 and 3000) are satisfied, their moisture-absorption and moisture-release properties were superior to those of hyaluronic acid (HA), sodium lactate and glycerol. Meanwhile, their antimicrobial activity were effective. In addition, mechanism of functional properties of chitooligosaccharides were discussed.

Subject-words Chitooligosaccharide; Water solubility; Moisture-absorption and moisture-release property; Antimicrobial activity