

Chitosan Degradation Using Oxidizing Agent and the Aqueous Fractionation of Products

邱慈惠、顏裕鴻；陳齊聖

E-mail: 9300050@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Low molecular weight polysaccharides and oligosaccharides were prepared from the degradation of chitosan by sodium chloride. Chitosan from shrimp shell of 89% degree of deacetylation was dissolved in acetic acid solution (both 5% w/v), and was hydrolyzed 15, 30, 45, 60 and 75 hours at 40 °C by NaClO. The results indicated that the molecular weight of polysaccharide solution decreased rapidly in a short time (< 30 hours) when reacted with NaClO. Chitosan of partially hydrolysis by 0.05% and 0.15% NaClO, molecular weight (MW) of chitosan is from 8.0×10^5 to 1.7×10^5 and 7.97×10^4 . No significant further degradation was observed when the concentrations of NaClO was tripled. The product of random hydrolysis is a mixture of chitosan molecules with a distribution of various molecular weights. In order to narrow the MW distribution, the chitosan mixture was fractionated based on molecular weights by water/acetic acid/organic solvent extractions. Take 0.01% of acetic acid and gradual increase to 0.2%, slowly add to the chitosan sample, treat the sample with sparse acid aqueous solution of the different concentration, respectively collect the dissolves and undissolves chitosan, and analysis the molecular weight, depending on the molecular weight size to separation and purification. The research effect knows, when the molecular weight of chitosan is lower (1.1×10^5 and 4.8×10^4), it will dissolve in low concentration (< 0.05%) acidic property solution first; Contrarily, when molecular weight is higher (1.9×10^5 and 1.4×10^5), then needing with the high concentration (> 0.17%) acidic property solution dissolution. However, because of the high molecular weight of chitosan is poor separation in result, so matches with the usage of the organic solvent, under the tiny acidic property solution and gathering the chitosan with interference of the situation of gel, for the convenience of carry on different molecular weight for the separation of the chitosan, then raising it ' s the emersion that molecular weight distribute.

Keywords : chitosan ; molecular weight ; acetic acid ; viscosity ; oxidant degradation ; aqueous fractionation

Table of Contents

授權書.....	iii	中文摘要.....
.....v 英文摘要.....vii 誌謝.....
.....ix 目錄.....x 表目錄.....
.....xiii 圖目錄.....xiv 第一章 緒論.....
.....1 第二章 文獻回顧.....4 2.1 幾丁質與幾丁聚醣.....
.....4 2.1.1 由來與分佈.....4 2.1.2 分子結構.....
.....5 2.1.3 理化特性.....7 2.1.3.1 溶解度.....
.....7 2.1.3.2 黏度.....9 2.1.3.3 去乙酰度.....
.....9 2.1.3.4 分子量.....10 2.1.4 製備方法.....
.....11 2.1.4.1 幾丁質之製備.....11 2.1.4.2 幾丁聚醣之製備.....
.....11 2.1.4.3 幾丁聚醣之純化.....12 2.1.5 理化性質之測定法.....12
.....12 2.1.5.1 去乙酰度之測定.....12 2.1.5.2 分子量之測定.....18
.....20 2.1.6 各領域之應用.....20 2.1.6.1 環保領域.....20
.....21 2.1.6.2 醫藥領域.....21 2.1.6.3 食品領域.....21
.....21 2.1.6.4 農業領域.....21 2.1.6.5 生物技術領域.....22
.....22 2.2 幾丁聚醣之分子降解.....22 2.2.1 降解方法.....22
.....22 2.2.1.1 物理法.....22 2.2.1.2 化學法.....23
.....23 2.2.1.3 酵素法.....24 2.2.2 氧化劑.....25
.....25 2.2.2.1 次氯酸鈉.....26 2.2.2.2 過氧化氫.....26
.....26 2.2.2.3 臭氧.....27 第三章 製備不同分子量之幾丁聚醣 摘要.....38
.....38 3.1 前言.....39 3.2 材料與設備.....40
.....40 3.3 方法.....41 3.4 結果與討論.....45
.....45 3.5 結論.....62 第四章 幾丁聚醣降解產物之分離 摘要.....

.....63	4.1前言64	4.2材料與設備
.....65	4.3方法66	4.4結果與討論
.....68	4.5結論87	第五章 總結論與未來展望
.....88	參考文獻89	表目錄
.....29	表2.1幾丁質的來源及其含量30	表2.2幾丁質的分類
.....31	表3.1幾丁聚醣及其衍生物在食品工業的應用31	表3.1幾丁聚醣分子量之降解方式及降解時間之關係表 (原始分子量為 8.0×10^5 , 5%AcOH, 2.5% CS solution, 100mL)
.....73	表4.1幾丁聚醣降解產物之代號73	表4.2幾丁聚醣以不同醋酸濃度進行水相分離之關係表 (0.05% NaClO, 醋酸濃度依序為0.01%、0.05%、0.09%、0.13%、0.17%及0.2%, 單位:w/v)
.....74	表4.3幾丁聚醣以不同醋酸濃度進行水相分離之關係表 (0.15% NaClO, 醋酸濃度依序為0.01%、0.05%、0.09%、0.13%、0.17%及0.2%, 單位:w/v)75	表4.4添加不同比例之有機溶劑對幾丁聚醣的分離效果 (即8 mL之水/有機溶劑混合液添加至12 mL之醋酸/幾丁聚醣混合液)
.....76	圖目錄76	圖2.1幾丁質、幾丁聚醣及纖維素的相似性結構
.....32	圖2.2幾丁質與幾丁聚醣之化學結構33	圖2.3幾丁質與幾丁聚醣結構間的相關性
.....34	圖2.4幾丁質與幾丁聚醣之結構轉換圖35	圖2.5由蝦、蟹殼製造幾丁質的方法
.....36	圖2.6幾丁聚醣的純化流程37	圖3.1實驗流程圖
.....52	圖3.2幾丁聚醣原料在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (0.5M醋酸濃度, 分子量 8.0×10^5)53	圖3.3幾丁聚醣在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 水解15小時, 分子量分別為 5.2×10^5 及 2.8×10^5)
.....54	圖3.4幾丁聚醣在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 水解30小時, 分子量分別為 3.1×10^5 及 1.6×10^5)55	圖3.5幾丁聚醣在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 水解45小時, 分子量分別為 1.97×10^5 及 1.35×10^5)
.....56	圖3.6幾丁聚醣在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 水解60小時, 分子量分別為 1.58×10^5 及 1.02×10^5)57	圖3.7幾丁聚醣在醋酸溶液中還原黏度與濃度之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 水解75小時, 分子量分別為 1.7×10^5 及 7.97×10^4)
.....58	圖3.8幾丁聚醣以不同反應時間進行降解分子之關係圖 (幾丁聚醣以0.05及0.15%次氯酸鈉水溶液, 反應時間分別為15、30、45、60及75小時)59	圖3.9不同反應時間降解之幾丁聚醣 (2.5%) 與pH值之關係圖
.....60	圖3.10於40°C下幾丁聚醣以不同反應時間降解對回收率之影響61	圖4.1不同醋酸濃度之水相分離之流程圖
.....77	圖4.1添加不同有機溶劑對幾丁聚醣的分離效果78	圖4.2添加不同比例之有機溶劑對幾丁聚醣的分離效果
.....79	圖4.4幾丁聚醣以不同醋酸濃度進行水相分離之關係圖 (0.05% 次氯酸鈉水溶液, 醋酸濃度依序為0.01, 0.05, 0.09, 0.13, 0.17及0.2%)80	圖4.5幾丁聚醣以不同醋酸濃度進行水相分離之關係圖 (0.15%次氯酸鈉水溶液, 醋酸濃度依序為0.01, (1. 0.05, 0.09, 0.13, 0.17及0.2%)
.....81	圖4.6幾丁聚醣以不同醋酸濃度進行水相分離之回收率82	圖4.7不同比例之有機溶劑(水與丙酮比例由左至右分別為0:8, 2:6,4:4,6:2及8:0; 最終醋酸濃度為0.13%)對幾丁聚醣分離的反應情形; (A)、(B)、(C)為反應時間15分鐘、1小時及3小時
.....83	圖4.8不同比例之有機溶劑(水與丙酮比例由左至右分別為0:8, 2:6,4:4,6:2及8:0; 最終醋酸濃度為0.13%)對幾丁聚醣分離的反應情形; (A)、(B)、(C)為反應時間5小時、10小時及25小時84	圖4.9添加不同比例之有機溶劑對幾丁聚醣的分離效果(即8mL 之水/有機溶劑混合液添加至12 mL之醋酸/幾丁聚醣混合液)
.....85	圖4.10添加不同有機溶劑對幾丁聚醣分子量之影響(即8 mL 之水/有機溶劑混合液添加至12 mL之醋酸/幾丁聚醣混合液)86	

REFERENCES

1. Aiba, S. I. (1992) Studies on chitosan:4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans, *Int J. Biol. Macromol.*,14:225-228.
2. Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis (1981) Chinin:New facets of research, *Science*,212:749-753.
3. Blackwell, J. (1988) Physical methods for the determination of chitin structure and conformation, *Methods enzymol.*,16:435-442.
4. Davies, D. H. and E. R. Hayes (1988) Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In: *Method in Enzymology Volume 161. Biomass Part B Lignin, Pectin and Chitin*. Academic Press, pp.442.
5. Domard, A. (1987) Determination of N-acetyl content in chitosan sample by c.d. measurements, *Int. J. Biol. Macromol.*,9:333.
6. Domszy, J. G.. and G. A. F. Roberts (1985) Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan, *Macromol. Chem.*,186:161.
7. Fry, S. C. (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals, *Biochem. J.*, 332:507-515.
8. Hackman, R. H. (1954) *Austr. J. Biol. Sci.*,7:168-178.
9. Heux, L., J. Brugnerotto, J. Desbrieres, M. F. Versali, and M. Rinaudo (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan, *Biomacromolecules*,1: 746-751.
10. Holan, Z. and J. Vortruha (1980) New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid, *J. Chromatogr.*,190:67-76.
11. Ikeda, I., M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto and K. Hatano (1993) Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats, *J. Agric. Food Chem.*, 41:431-435.
12. Knorr, D. (1984) Use

of chitinous polymers in food . A challenge for food research and development, Food Technol.,38:85-97. 13. Knorr, D. and J. Klein (1986) Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or *Phycomyces blakesleeana*, Biotechnol. lett., 8:691-694. 14. Mima, S., M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa (1983) Highly deacetylated chitosan and its properties, J. Appl. Polym. Sci., 28:1907. 15. Mima, S., M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa (1982) Highly deacetylated chitin and its properties, Proc. Second International Conference on chitin/chitosan.p.21. 16. Moore, G. K. and G. A. F. Robert (1980) Determination of degree of N-acetylation of chitosan, Int. J. Biol. Macromol., 2(4):115. 17. Muzzareli, R. A. A. (1977) Enzymic synthesis of chitin and chitosan, In: " Chitin " Muzzareli, R. A. A. p.5. Pergamon Press. Oxford. 18. Muzzarelli, R. A. A. (1985) Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivation ultraviolet spectrometry, Carbohydrate Polymers, 5:461. 19. Muzzarelli, R. A. A., F. Tanfani, G. Scarpini, and G. Laterza (1980) The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy, J. Biochem. Biophys. Methods.,2:299. 20. Naoji, K., T. Nobuhide, S. Takayuki, and T. Kaori (2000) A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents, Carbonhydr. Res.,324:268-274. 21. Neugebauer, W. A., E. Neugebauer, and R. Brzezinski (1989) Determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan with picric acid, Carbohydr. Res.,189: 363-367. 22. Nil (1996) Market of chitin and chitosan, Bio Ind.,13(3):52-61. 23. Nishi, N., J. Noguchi, S. Tocura, and H. Shiota (1979) Studies on chitin I. Acetylation of chitin, Polym. J.,11(1):27-32. 24. Nola, F., N. Basora, E. Chormet, and P. F. Vidal (1993) A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC, Carbohydr. Res.,238:1. 25. Rege, P. R and L. H. Block (1999) Chitosan processing:influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan ' s properties, Carbohydr. Res.,321:235-245. 26. Roberts, G. A. F. (1992) Chitin Chemistry, The MacMillan Press, London. 27. Roberts, G. A. F. and J. G. Domszy (1982) Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan, Macromol. Chem.,186:1571. 28. Sannan, T., K. Kurita, and Y. Iwakura (1976) Studies on chitin, 2: Effect of deacetylation on solubility. Makromolekulare Chemie. 177: 3589-3600.SAS. 1989. SAS User ' s Guide: Statistics (Version 6 Eds.). SAS Institute,Cary, NC. 29. Shahidi, F., J. K. Vidana Arachchi, and Y. J. Jeon (1999) Food application of chitin and chitosan, Trends in FoodSci. & Technol.,10:37-51. 30. Shigemasa, Y., K. Saito, H. Sashiwa, and H. Saimoto (1994) Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins, Int. J.Boil. Macromol., 16: 43-49. 31. Shimahara, K., Y. Takiguchi, K. Ohkouchi, K. Kitamura, and O. Okada (1984) Chitin, Chitosan and related enzymes, ed. P. J. Zikakis. pp.239-255, Academic Press,Orlando. 32. Tan, S. C., E. Khor, T. K. Tan, and S. M. Wong (1998) The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination, Talanta. 45:713-719. 33. Terbojevich, M., A. Cosani, and R. A.A. Muzzarelli (1995) Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain, Carbohydrate Polymers.29:63-68. 34. Toei, K. and T. Kohara (1976) A conductometric method for colloid titrations, Anal. chim. acta.,83:59-65. 35. Wang, Y., R. I. Hollingsworth, and D. L. Kasper (1999) Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution, Carbohydr. Res.,319: 141—147. 36. 方紹威 (1989) 幾丁聚醣的抑制微生物作用及其在低糖金橘蜜餞應用。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文,台北。 37. 王三郎 (1996) 水產資源利用學。高立圖書出版社,台北。 38. 王祖善 (2000) 磺酸苯幾丁聚醣之不同分子量及含硫率對水溶性及抗菌性之影響。大葉大學食品工程研究所碩士論文,彰化。 39. 吳建隆 (1998) 高速微射流作用對幾丁聚醣物化性質之影響及其在水溶性幾丁聚醣製備上的應用。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文,基隆。 40. 吳家成 (2001) 幾丁質與幾丁聚醣之理化性質,幾丁質/幾丁聚醣專輯。食品工業發展研究所。 41. 杜予民 (2002) 中國甲殼素生產與科技現狀及其發展前景。2002年幾丁質幾丁聚醣研討會-論文專輯。 42. 周婉萍 (1993) *Bacillus coagulans* NTU-FC-I 幾丁質酵素之研究。國立台灣大學化學研究所碩士論文,台北。 43. 林志芳 (1999c) 幾丁聚醣對油麵品質的影響。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文,台北。 44. 林宜賢 (1999b) 以氧化降解法製備水溶性幾丁聚醣與幾丁寡醣之探討。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文,基隆。 45. 林欣榜 (1999a) 幾丁類物質在食品加工上之應用。食品工業, 31(10):26-37. 46. 林淑珍 (2001) 以臭氧降解幾丁聚醣製備幾丁寡醣之研究。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文,基隆。 47. 林瑞洵、蔣蘇洪、張慕珊 (1992) 脫乙醯度測定方法。化學通報, 3:39-42. 48. 俞國平 (1997) 光散射與膠體滲透層析儀的聯結與應用。科儀新知, 18(5):44-53. 49. 徐世昌 (2001) 生物性高分子-《幾丁質與幾丁聚醣》之介紹與應用。化工資訊, 36-45. 50. 徐珠璽 (1995) 水溶性幾丁聚醣的製備與其物性持性。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文,基隆。 51. 徐錦祥 (1998) Chitosan低分子量化之研究。紡織中心期刊, 8(4):363-366. 52. 高寶珠 (1997) 黏度量測設備之選擇與使用-玻璃毛细管黏度計。量測資訊, 55:115-120. 53. 張展榮 (1996) 剪力超音波或兩者合併作用對幾丁聚醣物化性質之影響及其在水溶性幾丁聚醣製備上之應用。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文,基隆。 54. 陳忠漢 (2000) 中國大百科:化學?。台北。 55. 陳建宏 (1998) 溶劑效應對高分子物理凝膠之結構形成與性質影響之研究。國立台灣科技大學纖維及高分子研究所碩士論文,台北。 56. 陳美惠, 莊淑惠, 吳志津 (1999) 幾丁聚醣的物化特性。食品工業, 31(10):1-6. 57. 陳慶源 (1999) 以真菌發酵法生產幾丁聚醣。食品工業, 31(10):7-18. 58. 陳義融 (1979) 次氯酸鈉,工業技術, 61:44-48. 59. 陳榮輝、張展榮、徐珠璽 (1998) 剪力處理條件與儲藏在酸性水溶液對處理後之幾丁聚醣分子量與分散度的影響。台灣水產學會刊, 25 (3) 219-229. 60. 曾厚 (1997) chitin與chitosan之應用與發展現況。生物產業, 8(2):102-108. 61. 廖萬裕 (1997) 幾丁聚醣及其衍生物之抑菌性研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文,彰化。 62. 劉曉君 (2000) 幾丁質類產品純度分析方法之建立。國立海洋大學食品科學系研究所碩士論文,基隆。 63. 劉瓊淑 (1994) 幾丁質、幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。食品工業, 26(1):26-35. 64. 蔡政家 (1995) 以化學法由蝦殼製備幾丁質及幾丁聚醣之處理條件與反應動力學之探討。國立海洋大學水產食品科學系研究所碩士論文,基隆。 65. 蔡敏郎 (1997) 稀薄溶液中對幾丁聚醣構形轉變之因子及其機制。國立海洋大學食品科學系研究所碩士論文,基隆。 66. 鄭映雪 (1999) 水溶性幾丁聚醣梅納反應產物之生物理化特性。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文,台北。 67. 鄭福相 (2001) 以過氧化氫或臭氧降解幾丁聚醣及甲基纖維素之探討。國立海洋大學食品科學系研究所碩士論文,基隆。 68. 賴進此 (2000) 幾丁類物質在生物技術上之應用。食品工業, 32(1):31-39. 69. 戴明志 (1999) 以氧化還原降解

法從不同來源幾丁聚醣製備幾丁寡醣之探討。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文，基隆。70. 薛裕元（1999）羧甲基化水溶性幾丁聚醣的製備及其理化性質。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文，台北。