

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

以臭氧降解靈芝幾丁質製備幾丁寡糖之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90 - 2214 - E - 002 - 035 -

執行期間： 90年 8月 1日至91年 7月 31日

計畫主持人：葉安義

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學食品科技研究所

中 華 民 國 91 年 10 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以臭氧降解靈芝幾丁質製備幾丁寡醣之研究

Preparation of chito-oligosaccharides by degrading *Ganoderma* chitin using ozone

計畫編號：NSC 90-2214-E-002-035

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：葉安義 教授 國立台灣大學 食品科技研究所

一、中文摘要

本研究是以臭氧降解幾丁聚醣製備幾丁寡醣，以最具生理活性的幾丁寡醣(DP=6)產率為指標，探討降解反應條件(溫度、臭氧劑量)對水解率的影響，於實驗中監測pH值，檢測產物是否有羧基的產生。並進一步探討以臭氧降解靈芝殘渣，生產幾丁寡醣之可行性，期能提高其價值。高溫(80℃)下，以不同臭氧劑量(65.1 mg/min、78.3 mg/min、104.8 mg/min)降解靈芝殘渣，結果顯示臭氧可降解靈芝殘渣，但靈芝殘渣成分複雜，臭氧降解靈芝殘渣之生成物則需進一步鑑定。

關鍵詞：臭氧、靈芝殘渣、幾丁聚醣、
幾丁寡醣、氧化降解

Abstract:

This study was to investigate the method of degrading chitosan using ozone to produce chito-oligosaccharides. The yield of chito-oligosaccharides (DP=6) was used as the index for adjusting reaction conditions. Effects of reaction temperature and ozone dose on the yield of chito-oligosaccharides (DP=6) were evaluated. The formation of carboxylic group was observed as the drop in pH during experiments. In this study, the feasibility of degrading *Ganoderma* residue by ozone to produce chito-oligosaccharides was also evaluated. Commercial *Ganoderma* residue was reacted with ozone (65.1 mg/min, 78.3 mg/min, 104.8 mg/min) at high temperature (80℃). The data showed that it was possible to degrade *Ganoderma* residue by using ozone. The identification of the degraded products needs further studies.

Keywords: ozone, *Ganoderma* residue, chitosan, chito-oligosaccharides, oxidative degradation

二、緣由與目的

幾丁質(chitin)和幾丁聚醣(chitosan)廣泛分布於甲殼類與真菌細胞壁中，如蝦、蟹等的外殼，魷魚軟骨，以及靈芝等，是自然界中，含量僅次於纖維素(cellulose)的多醣類。幾丁聚醣可由幾丁質經去乙酰化而獲得，許多文獻指出，其具有許多特殊之生理特性，如增加免疫能力及抗菌性^[1]，可應用於食品、農業、醫療及廢水的處理上，但幾丁質與幾丁聚醣不溶於水，因此應用上受到限制。

甲殼類(如蝦、蟹等)之外殼，容易取得且價格低廉，是目前幾丁質的主要來源。近年來，真菌產品市場持續成長，所產生的廢棄菌體也增加，廢棄的菌體細胞壁結構較蝦殼鬆軟，且含有豐富的幾丁質或幾丁聚醣，而蛋白質含量低，不易腐敗，衛生條件較佳，可於較溫和的條件(較少量的酸液、鹼液，較低的溫度)下製備幾丁質或幾丁聚醣，有助於環保，且可生產具生理活性的產品，所以自靈芝殘渣製備幾丁質應是可行的方法。

N-乙酰幾丁寡醣和幾丁寡醣是幾丁質或幾丁聚醣經水解所得聚合度(DP)為2-10之寡醣類，其分子量小，溶於水，作為免疫治療藥劑時，無水溶性的問題。寡醣具有多項生理活性，如活化吞噬細胞及抑菌性，其中，又以DP為6-7之寡醣最具生理活性，具有高附加價值^[2]。製備方法則是業界與學者關切之焦點，常用的化學

法是利用高濃度的強酸水解，但難以控制寡醣種類，所得產品多是 DP 為 2-3 的寡醣，且高濃度強酸溶液的使用，產生廢液處理問題；酵素具有較高的選擇性，但由於產率太低^[3]，目前尚無法商業化，低廢液、高產率的水解方法是獲得 N-乙醯幾丁寡醣和幾丁寡醣的理想途徑。

臭氧是一種強氧化劑^[4]，能打斷一些共價鍵，產生降解的功能，且廢液量少，目前常用於水及空氣之消毒、淨化工程及廢水處理，以及有機物之氧化降解。靈芝殘渣不但是幾丁質的良好來源，且含有益健康的 β -1,3 glucan，目前被視為廢棄物，實在是一種浪費，應可作為生產幾丁寡醣的原料，以臭氧降解有機物是環保工業中常用的技術，如何利用該技術，以生產高附加價值的幾丁寡醣是本研究的目的。本研究擬以一年的時間，建立以靈芝殘渣製備幾丁質的經濟方法，並探討反應溫度與 pH 值對臭氧降解幾丁質的影響，由臭氧的消耗量與幾丁寡醣的產生量探討反應的型態，並由幾丁寡醣的產率評估臭氧降解的可行性，以供業界參考。

三、材料與方法

首先以幾丁聚醣替代靈芝殘渣，觀察臭氧 (SG-01A 臭氧產生機，購自日本住友精密工業公司) 降解成效，秤取 40 g 幾丁聚醣(購自挪威 Primex 公司，分子量：10 萬至 30 萬，其去乙醯度經膠態滴定法^[5]測定為大於 99%。購買規格：1% 市售蝦殼幾丁聚醣溶於 1% 醋酸溶液，在 25 30rpms 下，溶解度>99.9%)，溶於 4000 mL 的 1% (v/v) 醋酸(購自台灣皓峰公司)水溶液中，在不同臭氧劑量及不同溫度下進行臭氧降解反應，反應溫度設定為 10、20、30、40、50、70、80、90 與加入不同臭氧劑量 9.27 mg/min、15.6 mg/min、42.1 mg/min、55.3 mg/min、65.1 mg/min、78.3 mg/min、104.8 mg/min 分別於不同時間 (0~6 小時) 取樣，測定降解產物之 pH 值、黏度、顏色變化及還原醣量，經透析 (透析膜孔徑 Mw100)，加壓過濾 (過濾膜孔徑 Mw3000)，濾餅烘乾秤重，濾液減壓濃縮，經

HPLC(acetonitrile : H₂O = 60:40)測定幾丁寡醣的生成量與聚合度的分佈。確定臭氧可氧化降解幾丁聚醣後，秤取 40 g 靈芝殘渣(由台糖公司提供)溶於 4000 mL 的 1% (v/v) 醋酸水溶液中，在 80 以下以臭氧劑量 65.1 mg/min、78.3 mg/min、104.8 mg/min 進行臭氧降解反應，分別於不同時間 (0~6 小時) 取樣，測定降解產物之 pH 值，經透析 (透析膜孔徑 Mw100)，加壓過濾 (過濾膜孔徑 Mw3000)，濾餅烘乾秤重，濾液減壓濃縮，經 HPLC(acetonitrile : H₂O = 70:30)測定幾丁寡醣的生成量與聚合度的分佈。

四、結果與討論

1. 低溫下臭氧降解幾丁聚醣

- a. 為避免臭氧溶解度的問題，將反應溫度設定為 10、20、30、40、50。此五種不同溫度在高臭氧劑量(101.8mg/min)下，以較低反應溫度(10、20)的產糖量較高，各寡糖量及總產糖量皆隨著時間的增加而增加(圖一)。
- b. pH 值的變化可視為臭氧氧化降解時劇烈的程度，也可視作羧基生成的指標。因為在臭氧的氧化降解中，無外來的酸源可使 pH 值下降，只有氧化反應物而得的羧基是 pH 值下降的主因。所以在收集降解生成物的同時，監測其 pH 值，藉由 pH 值反推其羧基生成的情形。圖二是臭氧氧化降解反應後溶液 pH 值的變化情形，其結果顯示，除了低臭氧劑量(9.27mg/min)實驗組外，其餘實驗組反應後的 pH 值都有明顯下降的趨勢，可知，隨著臭氧氧化降解反應的進行，反應物會有酸的產生，且以較高臭氧劑量(101.8mg/min)實驗組反應後的 pH 值下降最劇，反應 12 小時後，1% (w/v) 幾丁聚醣醋酸溶液的 pH 值由 4.05 降至 2.37。不同反應溫度實驗組反應後，pH 值亦都有下降的趨勢。由於實驗的目的是產生具高價值的幾丁寡醣，故需更進一步研究鑑定產生的酸種類，並探討避免小分子酸或羧基等副產物產生的方法。

2. 高溫下臭氧降解幾丁聚醣

臭氧不溶於 60 以上的水中，就高於 60 環境下進行氧化降解反應，將使臭氧以分子的型式直接氧化降解反應物幾丁聚醣，應可有效抑制自由基生成，以達減少羧基生成的目的，可預測的

是氧化降解的速率將因無自由基參與而減緩，但臭氧反應速率卻又因高溫下反應速率加快，使得降解速率並無減慢。於是在高溫下加以不同劑量的臭氧，觀察在高溫的臭氧氧化降解是否有何不同。

- a. 為避免臭氧氧化降解過程中產生不需要的羧基問題，以及期望臭氧直接氧化降解而非藉由自由基型式裂解，將反應溫度設定為 70、80、90（皆高於 60），臭氧氧化降解幾丁聚醣溫度愈高，所得的葡萄糖胺及幾丁寡醣（DP = 2-6）總產量也有愈高的趨勢（圖三）。
- b. 70、90 時 pH 值比之 80 時 pH 值有明顯下降的趨勢（圖四）。90 時，葡萄糖胺及幾丁寡醣（DP = 2-6）總產量高，臭氧氧化劇烈，羧基生成也跟著多，致 pH 值下降。70 葡萄糖胺及幾丁寡醣（DP = 2-6）總產量並無較 80 時多，但 pH 值確有下降，是因為 70 離臭氧不溶於水的臨界點 60 較近，仍可能有些微臭氧溶於水中，自解產生自由基，以致寡醣雖產量不高，卻已有酸產生。
- c. 綜合以上兩點顯示臭氧氧化降解反應中，會有一個適中的反應條件（例：溫度、臭氧劑量），使得整個降解反應在產生較高量的葡萄糖胺及幾丁寡醣（DP = 2-6），同時羧基卻只有少量生成。

3. 比較高低溫幾丁六醣產量

將高、低溫實驗中幾丁六醣產量較高的反應條件挑出做比較，可得知 80 【O₃】78.3mg/min 此組在反應一小時後即可得到 248.45ppm 的幾丁六醣，同時 pH 值並無明顯的改變，是一較佳反應條件（圖五）。

4. 以臭氧降解靈芝殘渣

選出臭氧降解幾丁聚醣之中葡萄糖胺與幾丁寡醣（DP = 2-6）總產量較高的三組反應條件臭氧劑量 65.1 mg/min、78.3 mg/min、104.8 mg/min，反應溫度 80 進行降解靈芝殘渣反應。

- a. 圖六為各取樣時間之 pH 值，可以觀察到一開始 pH 值會下降，表示臭氧氧化降解正在進行，到了 3、4 小時就停止，成水平狀，表示反應溶液中可被臭氧降解產生羧基的物質幾乎全都降解完了，另臭氧劑量 65.1mg/min 此反應條件，到最後 6 小時為何 pH 值有升高的現象，目前尚

未清楚，亦值得探討。

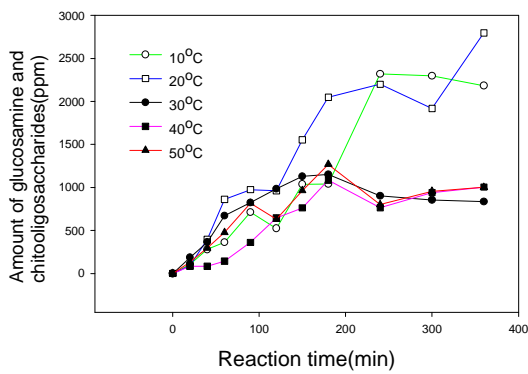
- b. 另一項靈芝殘渣被臭氧降解更有力的證明為測取樣時，尚有多少物質其分子量仍在 3000 以上（圖七），若 Mw3000 以上愈來愈少，表示臭氧氧化降解正在進行，圖三十三反應條件 80 104.8mg/min 可看出 Mw3000 以上的量在 0.33 至 4 小時都在減少，但 5、6 小時呈平緩，表示反應至 4 小時後，可受臭氧降解的物質已趨近於無，另兩反應條件也一如上述。
- c. 最後將生成物經前處理以 HPLC 分析，發現有未知物被降解出與標準品時間相近，但難以判斷為何物，故無法得知 N-acetylchitooligosaccharides 產量。

五、計畫成果自評

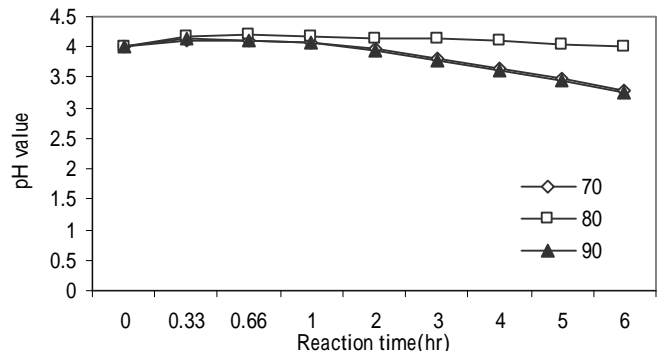
本計畫之完成有助於瞭解臭氧氧化幾丁聚醣之機制，但對靈芝殘渣氧化物解析則困難度較高。檢討原因有二：一為之前實驗樣品為幾丁聚醣，而靈芝殘渣所含為帶乙醯基的幾丁質，臭氧在降解兩物時，應有差別。二則是靈芝殘渣為混合物，內含 -1,3 鍵結者應可被臭氧降解，導致生成物內含較雜物種，以致 HPLC 難以分離判別。

五、參考文獻

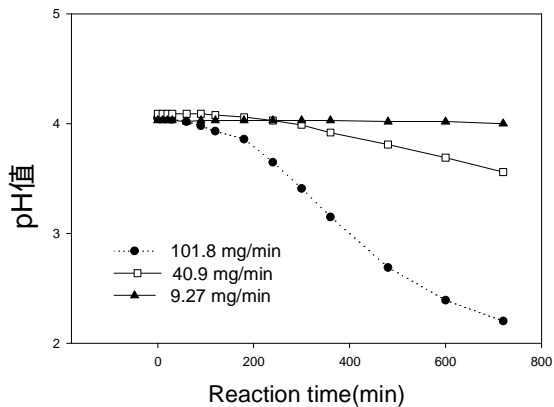
- [1] Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S., and Suzuki, M. 1985. Enhancing effects of N-acetyl-chito-oligosaccharides on active oxygen generating and microbicidal activities of peritoneal exudates cell in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 33:886-888.
- [2] Kendra, D.F., and Hadwiger, L.A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8:276-281.
- [3] Aiba, S. I. 1994b. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. *Carbohydr. Res.* 265: 323- 328.
- [4] Assembly of Life Science (US) Committee on Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants. 1977. Ozone and other photochemical oxidants. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- [5] Tōei, K., and Kohara, T. 1976. A conductometric method for colloid titration. *Analytica Chimica Acta.* 83:59-65.



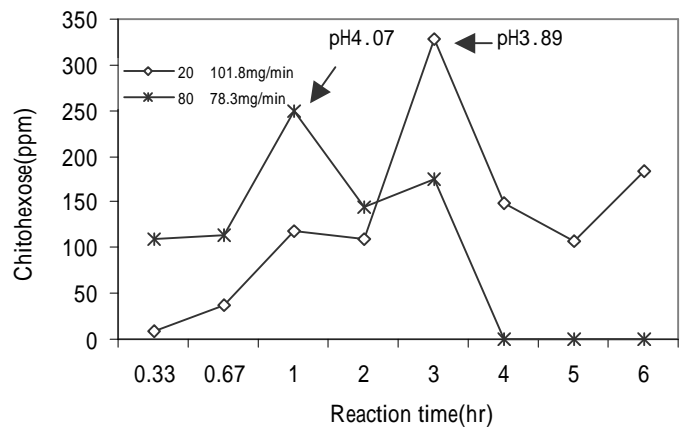
圖一、以臭氧劑量 101.8mg/min 及低溫的反應溫度對葡萄糖胺及幾丁寡醣總產量之影響



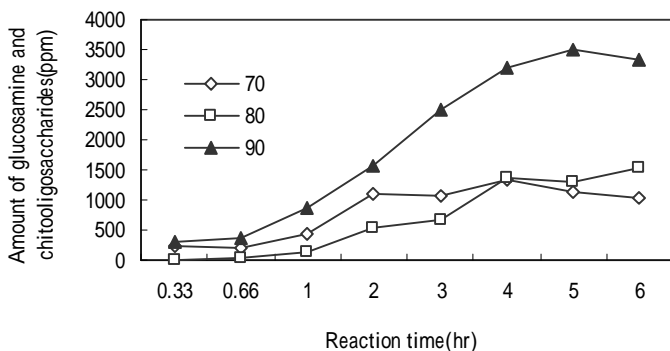
圖四、在臭氧劑量 65.1mg/min 下，以 70、80、90 降解之產物 pH 值變化情形



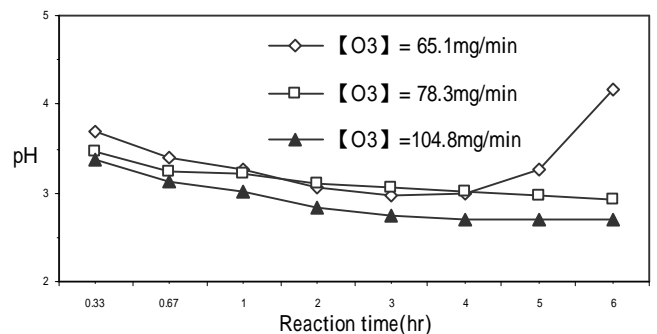
圖二、不同臭氧劑量反應後反應產物 pH 值變化情形



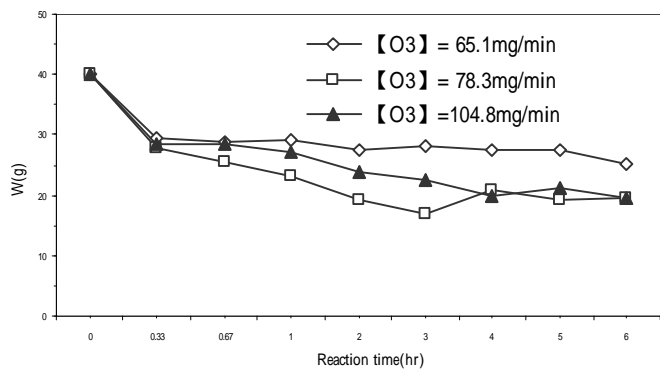
圖五、溫度與臭氧劑量對幾丁六醣產量之影響



圖三、在 65.1mg/min 臭氧劑量下，溫度對葡萄糖胺及幾丁寡醣 (DP = 2、6) 總產量之影響



圖六、80 下臭氧降解靈芝殘渣產物 pH 值之變化



圖七、80 下臭氧降解靈芝殘渣產物分子量 3000 以上重量之比較