

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

糖苷鍵與分子量對臭氣降解寡糖之影響(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2214-E-002-024-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：葉安義

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 28 日

糖 鍵 與 分 子 量 對 臭 氧 破 壞 的 影 響

中 華 民 國 92 年 5 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

糖 鍵與分子量對臭氧降解寡糖之影響 (1/2)

Effects of glycosidic bond and molecular weight on the ozonolysis of oligosaccharides (1/2)

計畫編號：NSC 91-2214-E-002-024

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 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

本研究以四種雙糖（包括麥芽糖（maltose）、纖維二糖（cellobiose）、海藻糖（trehalose）、幾丁二糖（chitobiose））為原料以不同劑量的臭氧（10mg/min、32mg/min、52mg/min、72mg/min、87mg/min）探討於 70°C 下 糖 鍵 ~~結~~ α -1,4、 β -1,4、 α -1,1 對臭氧氧化降解雙糖的影響。實驗結果發現麥芽糖與纖維二糖的單糖產率並無差異，顯示臭氧於降解 α form 與 β form 之鍵結時，並無顯著性的差異。麥芽糖與纖維二糖的單糖產率均低於海藻糖，顯示 α -1,1 的鍵結較易受臭氧氧化而斷裂。幾丁二糖（具有胺基）的單糖（葡萄糖胺）產率高於纖維二糖（不具胺基）的單糖（葡萄糖）產率，顯示胺基的存在，有助於單糖的產生。

關鍵詞：雙 糖 、 糖 鍵 結

Abstract

The ozonolysis of four disaccharides (maltose, trehalose, cellobiose, and chitobiose) has been studied using different ozone dosages (10mg/min、32mg/min、52mg/min、72mg/min、87mg/min) at 70°C. The α and β form of glycosidic bond did not significantly affect the act of ozonolysis. As the yield of monosaccharide from trehalose was higher than that from maltose or cellobiose, the α -1,1

glycosidic bond appeared to be more favorable than α -1,4 or β -1,4 during ozonolysis. The presence of amide group on the glucose unit enhanced the yield of monosaccharide from chitobiose. The effects of ozone dosage on reaction rate and reaction order were also discussed.

Keywords: disaccharide, glycosidic bond, ozonolysis

二、緣由與目的

N-乙醯幾丁寡糖和幾丁寡糖是由幾丁質或幾丁聚糖經水解所得聚合度為 2-10 的寡糖，分子量比幾丁質或幾丁聚糖小，可溶於水，並具有許多生理活性，如活化吞噬細胞、抗癌及抑菌性等。

幾丁寡糖的製備包括酸水解、酵素水解、氧化降解、超音波降解等多種方法（陳等，1996）。酸水解不具有選擇性，可使用鹽酸、硫酸、硝酸（Allan and Peyron, 1995）、磷酸（Hasegawa 等，1993）、醋酸等，鹽酸的酸性較強，產率較高，故為最常用者，產品以聚合度 1-4 的幾丁寡糖為主（Chang 等，2000），其中以單糖為最多。反應後之溶液有高濃度的鹽酸，需謹慎處理以免造成環保問題，但是會增加成本。幾丁質酵素（Aiba, 1994）、幾丁聚糖酵素、纖維酵素、半纖維酵素、溶菌酵素（Aiba, 1992）等是水解常用

的酵素，通常以混合酵素方法進行 (Zhang 等、1999)，可以在薄膜反應器內降解 (Jeon and Kim, 2000)，雖然酵素有選擇性，但原料不溶於水，水解速率低，所得產品中 N-乙醯幾丁六糖與七糖的含量低 (Cheng and Li, 2000)，且酵素價格昂貴。氧化降解法以 H_2O_2 為主要氧化劑，輔以 $NaClO_2$ 或 HCl 進行水解，反應條件較強酸水解溫和，但是所得的產品也是以聚合度 1-4 的幾丁寡糖為主 (戴, 1999)。超音波可以進行部分降解，但是難以產生聚合度 2-10 的寡糖。

臭氧是一種強氧化劑，可破壞許多有機物的共價鍵結，產生降解的功能。臭氧的使用方法簡便，價格便宜，無殘留的問題，常被應用在水及空氣的消毒、淨化工程以及廢水處理上，以臭氧降解有機物是環保工業中常用的技術。以臭氧降解幾丁聚糖，發現可以獲得幾丁五糖與六糖，但是隨著反應的進行，溶液的 pH 值逐漸下降，顯示在反應的過程中有酸的產生 (陳, 2002)。酸的產生可能是因為糖類受到臭氧氧化而開環，羥基氧化成酸；或者是糖類並未開環但其中的羥基氧化成酸，使幾丁寡糖具有酸根。

為瞭解臭氧降解糖類的過程中，鍵結對臭氧降解糖類的影響。本研究以雙糖為起始反應物，探討糖鍵的影響。

三、材料與方法

A. 實驗材料

(一) 雙糖

海藻糖 (trehalose)，麥芽糖 (maltose)，纖維二糖 (cellobiose) 購自美國 Sigma 公司。Chitobiose (幾丁二糖) 購自日本 Seikagaku 工業株式會社。

(二) 化學藥品

1. Potassium iodide，Sodium thiosulfate 購自德國

Riedel-deHaen 公司。

2. Acetonitrile (氘甲烷) 購自美國 Mallinckrodt HPLC 分析級試藥。

B. 實驗方法

秤取 2.5g 雙糖 (海藻糖、麥芽糖、纖維二糖) 溶於 500mL 的去離子水溶液中，在 $70^{\circ}C$ 下通入臭氧 (10mg/min、32mg/min、52mg/min、72mg/min、87mg/min) 進行臭氧降解反應，分別於不同時間 (0~4 小時) 取樣，測定降解產物的 pH 值，經 HPLC 測定單糖的生成量。

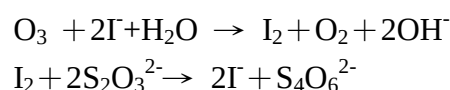
由於幾丁二糖價格昂貴，故於低濃度下進行反應。秤取 0.3g 纖維二糖或幾丁二糖溶於 500mL 的去離子水溶液中，在 $70^{\circ}C$ 下以臭氧 (10mg/min、32mg/min、52mg/min、72mg/min) 進行臭氧降解反應，分別於不同時間 (0~2 小時) 取樣，測定降解產物的 pH 值，經減壓濃縮後以 HPLC 測定單糖的生成量。

降解反應的進行，乃將乾燥氧氣通入臭氧產生機 (SG-01A，住友精密工業公司，日本)，由高壓放電的板型電極，(操作電壓約為 210 Volts，最大電流為 2.5A，放電室內壓力為 $0.9\sim 1.1kg/cm^2$)，放電產生臭氧。將臭氧直接導入 KI 溶液中，以分析產生量。調整閥門，將臭氧導入反應器中進行降解，由 sample port 收集溶液樣品，以進行分析。

C. 分析方法

(一) 臭氧的定量

本研究採用 Standard Method 20th edition (1998) 所認可的 Iodometric 碘定量法，利用 KI 吸收液將臭氧吸收 (如下所示之反應式)。由於臭氧會將碘離子氧化成碘分子，再以還原劑滴定，由還原劑的使用量、當量濃度、與通氣時間等推算臭氧濃度。



分析步驟如下：

1. 直接將臭氧通入兩個裝有 2%KI 吸收液（至少 200mL）的曝氣瓶(gas washing bottle)中，通氣約 10 分鐘。
2. 將已吸收臭氧之 KI 吸收液（兩瓶），倒入燒杯中加入 10mL 之 2N H₂SO₄使 pH 值維持在 2.0 以下。
3. 以 0.1N 之 Na₂S₂O₃ 滴定至碘的黃色幾乎消失，加 1~2mL 澱粉指示劑，繼續滴定至藍色消失，計其滴定量 A。

4. 計算臭氧濃度。

Ozone dose, mg/min=[A × N × 24]/T

A：Na₂S₂O₃ 滴定量，mL

N：Na₂S₂O₃ 的當量濃度

T：臭氧通氣時間，min

（二）pH 值測定

以 pH meter (SUNTEX,pH Meter,SP-2200,Taiwan) 在室溫下測定之。

（三）雙糖與單糖的分析

雙糖經臭氧降解後的產物，應以單糖為主要成分，與一些酸類，以高效率液相層析儀（HPLC）進行定性及定量分析。使用的設備與操作條件如下：

系統：PU-980（JASCO,Japan）

管柱：Hyperisil HS APS2（4.6×250mm, 5μm,England）

移動相：acetonitrile：H₂O=65:35

流速：1mL/min

注射量：20μL

偵檢器：RI detector（JASCO RI-930,Japan）

恆溫：40℃（管柱恆溫箱,尚偉股份有限公司）

積分軟體：SISC. Co.

以高效率液相層析儀（HPLC）分析臭氧氧化降解雙糖的產物，與標準品比對，測定單糖與雙糖的生成量。

標準品單糖（glucose、glucosamine）及雙糖（trehalose、maltose、cellobiose、chitobiose）以 acetonitrile：H₂O=65：35 溶液（移動相）在 Hyperisil HS APS2（靜相）流速 1ml/min 進行層析，將其分離得到各自到達 RI 偵測器的時間，單糖較快，之後才是雙糖。反應生成物以同條件下進行層析，依此二種糖偵測時間判定成分為何。

（四）單糖產率與雙糖消失率

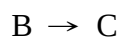
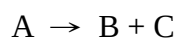
單糖產率：[單糖重量 / 反應前雙糖重量]*100

雙糖消失率：[(反應前雙糖重量-剩餘雙糖重量) / (反應前雙糖重量)]*100

單位：重量百分比

（五）臭氧降解雙糖的模式與反應動力學分析

1. 臭氧降解雙糖模式



A：雙糖

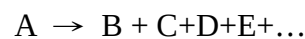
B：單糖

C：氧化至裂環的產物

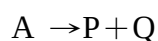
A 為未經降解的雙糖（原料），在反應槽通入臭氧的瞬間，臭氧對 A 進行氧化降解，產物為 B（單糖）、C（氧化至裂環的產物）。在 B 產生後，B 也因臭氧隨機氧化降解而生成 C。

2. 反應動力學分析

雙糖氧化降解後，產生不同分子量的產物，可表示成



其中 A 為反應物（雙糖），產物 B 可能再降解為 C、D 或 E 等，是一個相當複雜的反應式，為簡化數據分析的程序，可將反應式表示為



A：未經降解的雙糖

P：單醣

Q：氧化至裂環的產物

經由 HPLC 的定量可得到不同時間

反應物的量，可將降解速率 (r) 表為

$$-r_a = dC_A C_B / dt = k C_A^a C_B^b \dots\dots\dots (1)$$

C_A ：成分 A 之體積莫耳濃度 (mol/dm^3)

k：反應速率常數

n：反應階數

t：反應時間

C_B ：臭氧的體積莫爾濃度

假設 $[O_3]$ 濃度不是限制因子，(1)

式可簡化為假 a 次反應式

$$-r_A = K' C_A^a \dots\dots\dots (2)$$

其中 $K' = k C_B^b$ ，此為假 (pseudo)

b 次反應，故所得反應速率常數將受到臭氧濃度的影響。

(2) 式可表為：

$$\ln(-r_A) = \ln K' + n \ln C_A \dots\dots\dots (3)$$

利用微分法 (differential method) 分析所得數據，計算 K' 與 n。

四、結果與討論

單醣的產率隨反應時間而改變，以纖維二醣之降解為例，當臭氧劑量低於 87mg/min 時，單醣的產率隨反應時間或臭氧劑量而增加 (圖 1)，當臭氧劑量為 87mg/min 時，可於 1.5 小時內達到最高，隨之，所產生的單醣可能繼續分解，使單醣的產率下降，但產率均低於 2.5%，顯示臭氧降解的過程中，需消耗許多二醣，如圖 2 所示，二醣的消耗隨時間與臭氧劑量的增加而提高，當臭氧劑量為 87mg/min 時，反應三小時後，纖維二醣的剩餘量已很少，當臭氧劑量為 10mg/min 時，反應四小時後，僅耗用 40% 的纖維二醣，故臭氧劑量的提高，有助於降解反應的進行。臭氧降解的過程中，pH 值呈現下降的趨勢 (圖 3)，尤其是反應 0.5 小時，例如，臭氧劑量為 10mg/min 時，pH 由 6.0 降為 4.0；臭氧劑量為 87mg/min 時，pH 由 6.0 降為

3.0，顯示有許多酸產生，可能是導致低產率的原因，所產生的酸為何？則需進一步探討。麥芽糖、海藻糖與幾丁二糖的降解呈現類似情形。但產率不同，當臭氧劑量為 32mg/min 時，反應四小時後，海藻糖的產率接近 6% (圖 4)，而麥芽糖與纖維二糖的產率相似，接近 1%，麥芽糖與纖維二糖的糖

鍵之差異為 α form 與 β form，故結果顯示其並未影響臭氧降解之機制，海藻糖的糖鍵為 α -1,1，但具較高產量，顯示鍵結方式影響臭氧之降解，提高臭氧劑量為 87mg/min 時 (圖 5)，三種雙醣 (麥芽糖、纖維二糖與海藻糖) 皆於反應 1.5 小時達到最高產率，海藻糖仍具有較高的產率 (6%)，麥芽糖與纖維二糖間並無顯著性的差異，其最高產率接近 2%。顯示臭氧劑量的增加並未影響糖

鍵斷裂的機制，但促使單醣 (葡萄糖、葡萄糖胺) 產率增加，同時單醣也受臭氧隨機的氧化降解形成更小分子的產物，不過在反應初期單醣的生成速率高於單醣被氧化的速率，所以單醣的產率隨反應時間的增加而增加，當單醣的生成速率等於氧化速率時單醣的產率達到最高，之後單醣的氧化速率大於單醣的生成速率所以單醣的產率隨反應時間的增加而減少。

幾丁二糖 (chitobiose) 與纖維二糖的糖鍵均為 β -1,4，不同點為幾丁二糖具有胺基，纖維二糖不具胺基，實驗結果顯示幾丁二糖具有較高的單醣產率 (圖 6)，經以 32 mg/min 之臭氧反應兩小時，幾丁二糖的產率為 9.5%，但纖維二糖的產率僅略高於 2%，顯示胺基有助於糖鍵的斷裂。提高臭氧劑量，使雙醣的消耗率增加 (圖 7)，當臭氧劑量為 72 mg/min 時，每生產 1 莫耳的單醣，需耗用 10 莫耳以上的雙醣，當臭氧劑量為 32 mg/min 時，每生產 1 莫耳的單醣，所需耗用的雙醣低於 5 莫耳，提高臭氧劑量可加速反應，但易使產生的單醣繼續氧化，致使

單糖產率下降。

反應速率隨著臭氧劑量的提高而加速，以纖維二糖（起始濃度 0.5 wt.%）為例（表 1），當臭氧劑量由 32 mg/min 提高為 87 mg/min 時，反應速率由 4.48×10^{-5} mol/L min 增加為 2.43×10^{-4} mol/L min，證實提高臭氧劑量可加速反應，反應次數（reaction order）則介於 0.9–1.2 間，與臭氧劑量並無明顯的相關性；降低纖維二糖的起始濃度為 0.06 wt.% 時，反應速率呈減少的趨勢，當臭氧劑量由 32 mg/min 提高為 72 mg/min 時，反應速率由 3.02×10^{-5} mol/L min 略增加為 5.62×10^{-5} mol/L min，反應次數則介於 0.91–1.0 之間，顯示雙糖起始濃度影響反應速率。如前所述，幾丁二糖之單糖產率高於纖維二糖，於臭氧劑量為 32 與 52 mg/min 時，反應速率則較低（表 2），顯示反應速率高者，不盡然具有高的單糖產率。

五、計畫成果自評

由以上之結果，可獲得下列之結論：

1. 在 70°C 下，臭氧氧化降解纖維二糖（ β -1,4）所得到的葡萄糖產率與臭氧氧化降解於麥芽糖（ α -1,4）所得的葡萄糖產率並無差異，顯示鍵結中的 α form 與 β form 對臭氧氧化降解雙糖並無影響。
2. 在 70°C 下，臭氧氧化降幾丁二糖（具胺基）所得到的葡萄糖胺產率高於臭氧氧化降解於纖維二糖（不具胺基）所得的葡萄糖產率，顯示胺基有助於臭氧氧化降解糖鍵。
3. 在 70°C 雙糖起始反應濃度下 0.5% 下，海藻糖的單糖產率高於麥芽糖與纖維二糖，顯示 α -1,1 的糖鍵較易受臭氧氧化而降解。
4. 雙糖的降解速率隨著臭氧劑量的增加而增加，反應次數介於 0.7–1.4 之間。

本計畫之完成有助於瞭解臭氧氧化降解二糖之機制，顯然糖鍵之 α form 與 β form 對臭氧氧化降解雙糖並無影響，但官能基（如胺基）之存在有助於糖鍵的斷裂，因此，幾丁二糖的單糖產率最高，接近 10%，因此以臭氧降解幾丁質以生產幾丁寡糖或水可溶幾丁多糖是可行的方法，纖維素雖可受到臭氧之裂解，但產率偏低，意味著原料價格需非常低，才有可能商業化，提高反應物的分子量或改變反應條件如能增加產率，則有助於臭氧氧化多糖，以生產寡糖製程的發展。

六、參考文獻

- 陳坤上、黃珮芬、陳聰松、陳幸臣，1996，幾丁寡糖製備條件之探討，食品科學，23（6）：874-883。
- 戴明志。1999。以氧化還原降解法從不同來源幾丁聚糖製備幾丁寡糖之探討。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。
- 陳佳慶。2002。高溫下降解幾丁聚糖製備幾丁寡糖的研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
- Aiba, S.I. 1992. Studies on chitosan : 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. Int. J. Biol. Macromol., 14 : 225-228.
- Aiba, S.I. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. Carbohydr. Res., 265 : 323-328.
- Allan, G. G. and Peyron, M. 1995. Molecular weight manipulation of chitosan II : Prediction and control of depolymerization by nitrous acid. Carbohydr. Res., 277 : 273-282.

Chang, K. L. B., Lee, J., and Fu, W. R. 2000. HPLC analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *Journal of Food and Drug Analysis* 8 (2) : 75-83.

Cheng, C.Y., and Li, Y. K. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharide. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32 : 197-203.

Hasegawa, M., Isogai, A., and Onabe, F. 1993. Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydr. Polym.*, 20 : 279-283.

Jeon, Y. J., and Kim, S.K. 2000. Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.*, 41 : 133-141.

Zhang, H., Du, Y., Yu, X., Mitsutomi, M. and Aiba, S.I. 1999. Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan by a complex by a complex enzyme. *Carbohydr. Res.*, 320 : 257-260.

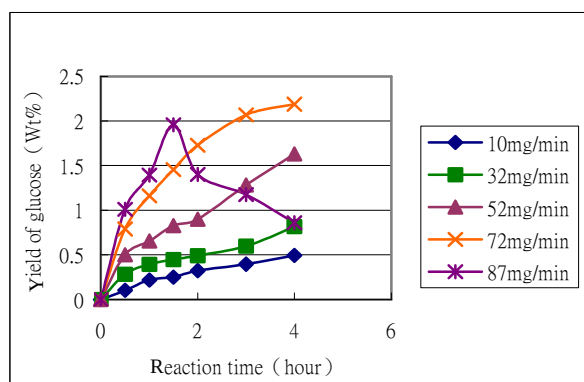


Figure 1. Glucose yield from cellobiose by ozonolysis with various ozone dosages at 70°C
圖 1. 纖維二糖經臭氧降解 (70°C) 之葡萄糖產率

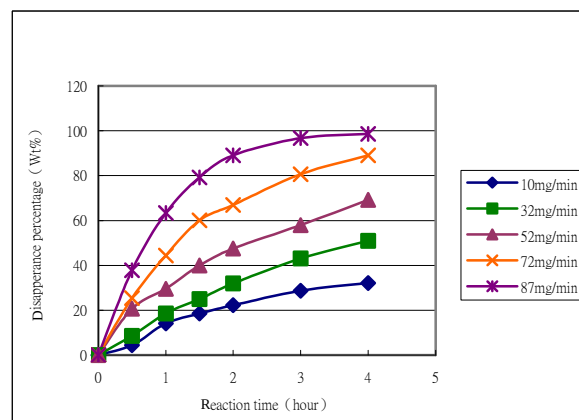


Figure 2. Disappearance percentage of cellobiose at 70°C

圖 2. 纖維二糖於臭氧降解 (70°C) 中之消耗率

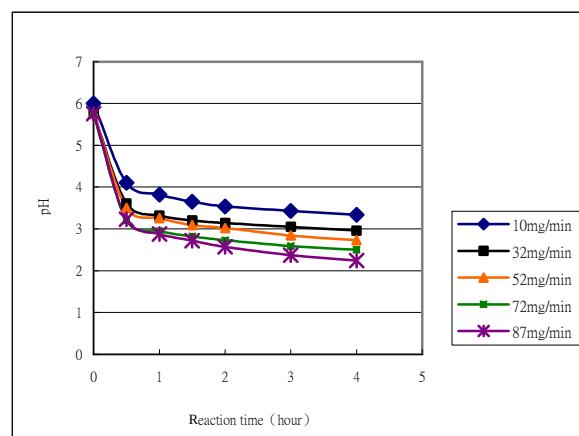


Figure 3. The changes of pH during ozonolysis of cellobiose

圖 3. 臭氧降解纖維二糖過程中，pH 值的變化

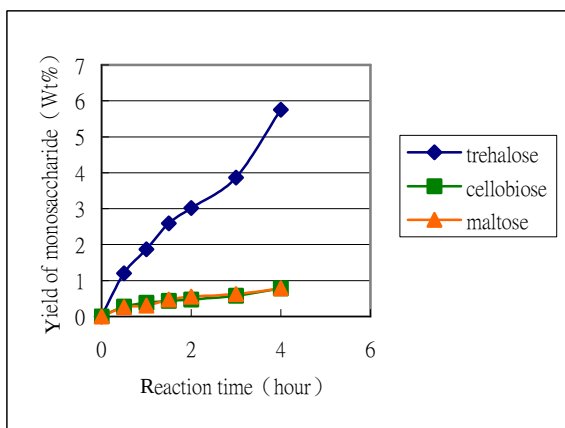


Fig 4. Yield of monosaccharide during ozonolysis (ozone dose 32mg/min) of disaccharides (Initial concentration of disaccharides was 0.5 wt.%)

圖 4. 雙醣經臭氧降解(臭氧劑量 32 mg/min)之單醣產率 (起始雙醣濃度為 0.5 wt.%)

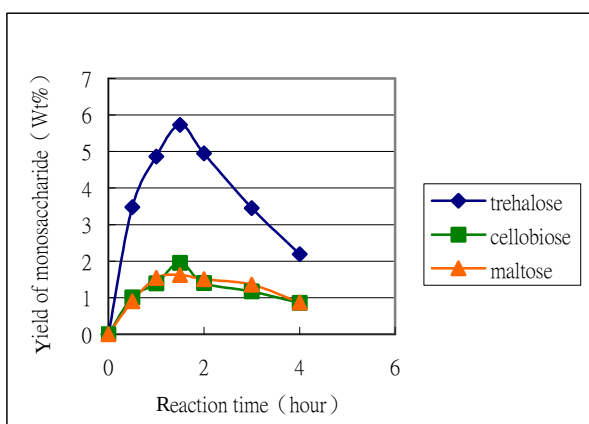


Figure 5. Yield of monosaccharide during ozonolysis (ozone dose 87mg/min) of disaccharides (Initial concentration of disaccharides was 0.5 wt.%)

圖 5. 雙醣經臭氧降解(臭氧劑量 87 mg/min)之單醣產率 (起始雙醣濃度為 0.5 wt.%)

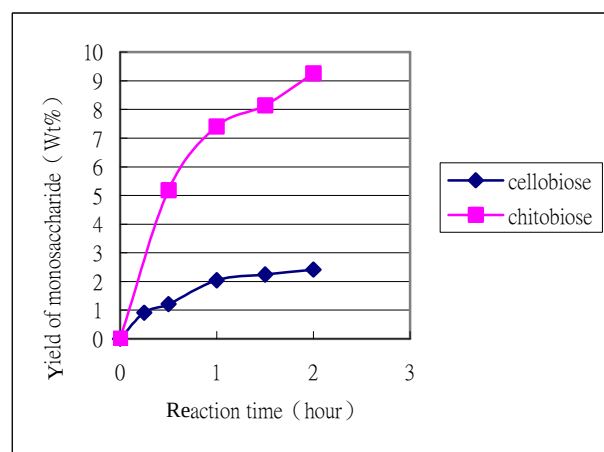


Figure 6. Yield of monosaccharide during ozonolysis (ozone dose 32mg/min) of disaccharides (Initial concentration of disaccharides was 0.06 wt.%)

圖 6. 雙醣經臭氧降解(臭氧劑量 32mg/min)之單醣產率 (起始雙醣濃度為 0.06 wt.%)

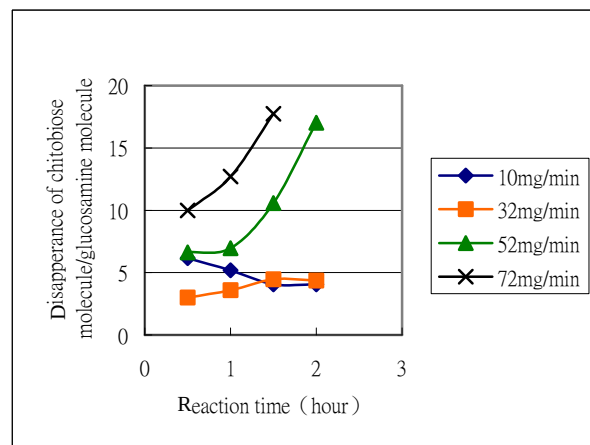


Figure 7. Disappearance of chitobiose molecule / glucosamine molecule at various ozone dosages

圖 7. 於臭氧降解幾丁二醣時，每生產一莫耳單醣所需消耗之雙醣

Table 1. Reaction rates and order for the ozonolysis of cellobiose

表 1. 纖維二醣之反應速率與反應次數

Ozone dose (mg/min)	Reaction order		Reaction rate (mol/min*L) x 10 ⁴	
	0.5% ^a	0.06%	0.5%	0.06%
32mg/min	1.08	0.94	0.448	0.302
52mg/min	1.22	1.00	0.930	0.555
72mg/min	1.11	0.92	1.460	0.562
87mg/min	0.90	-	2.430	-

a: Initial concentration of disaccharides.

Table 2. The reaction rate and reaction order for ozonolysis of chitobiose

表 2. 幾丁二醣之反應速率與反應次數

Ozone dose (mg/min)	Reaction order	Reaction rate (mol/min*L) x 10 ⁵	R ²
32mg/min	0.964	1.64	0.878
52mg/min	0.780	3.73	0.970
72mg/min	0.849	7.52	0.995