

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.025

阳离子交换树脂法降低壳聚糖酶解产物灰分的研究

杜双有

(杭州澳医保灵药业有限公司, 浙江 杭州 310018)

摘要:目的 考察用阳离子交换树脂降低壳聚糖酶解产物的灰分。方法 采用强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂(湿计)与纤维素酶的不同比例进行静态浸泡,考察阳离子交换树脂降低纤维素酶灰分的能力。结果 采用强酸性苯乙烯系阳离子树脂(湿计)只进行1次阳离子交换,当纤维素酶-阳离子交换树脂用量的比例为1:5时,纤维素酶中的灰分已基本去除,无须进行阴离子交换就可有效降低纤维素酶的灰分,进而降低壳聚糖酶解产物(壳低聚糖)的灰分。结论 该方法工艺效果良好,操作简便易行。

关键词:阳离子交换树脂;纤维素酶;离子交换;灰分

中图分类号:R979.1;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0090-03

Research on Reduction of Ash Content in Chitosan Enzymatic Hydrolysis Products by Cationic Exchange

DU Shuangyou

(Hangzhou Aoyipollen Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China 310018)

Abstract: Objective To investigate the reduction of the ash content of chitosan enzymatic hydrolysis products by cation exchange resin. Methods Static immersion was conducted using different ratios of strong acid styrene cation resin(hygrometer) to cellulase to investigate the ability of cationic exchange resin of reducing the ash content of cellulase. Results Strongly acidic styrenic cationic resin (hygroscopic) was used for only one cation exchange. When the ratio of cellulase dosage - cationic exchange resin dosage was 1:5, the ash content in cellulase was roughly removed. Without anion exchange, the ash content of cellulase could be effectively reduced, and then the ash content of enzymatic hydrolysis products of chitosan(chitosan oligosaccharide) could be reduced as well. Conclusion This method is effective and easy to operate.

Key words: cation exchange resin; cellulase; ion exchange; ash content

壳低聚糖为低分子(chitooligosaccharide)壳聚糖,也称壳寡糖,化学名为2-氨基-β-1,4-葡萄糖胺,分子式为(C₆H₁₁O₄N)_n,聚合度在25~30。壳低聚糖具有独特优越的生理活性和功能性质,用途广泛。在医药方面,壳低聚糖有多方面生理功能及抗肿瘤效果,特别是甲壳六糖有很强的生理活性,可作为早期肿瘤的治疗药物,有抑制肿瘤毛细血管内皮的生成,致使肿瘤毛细血管不能加长而局限在局部的作用。但在医药生化领域应用壳低聚糖,往往对灰分有较严格的要求,如胶囊剂和片剂一般要求灰分少于1%。由于原料壳寡糖在加工过程中脱钙不完全及原料中重金属含量过高,市场上可售壳聚糖的灰分常大于0.5%,再加上传统的壳低聚糖的制备方法是对壳聚糖进行化学降解或酶解,一种较经典的工艺流程为,将壳聚糖加水混合均匀后加酸溶解,再加入纤维素酶制剂,经过滤后得壳低聚糖溶液,最后经喷雾干燥得壳低聚糖^[1-2]。纤维素酶的引入^[3],若纤维素酶的灰分大于7.5%时,其得到的产品壳低聚糖的灰分就有可能超过1%的标准,带来产品不合格的风险。市场上纤维素酶的灰分一般大于7.5%,为降低壳低聚糖的灰分,首先要降低纤维素酶的灰分,要了解纤维素酶

中的灰分组成。湖南利尔康生物股份有限公司制备的食品添加剂纤维素酶,采用的是常用里氏木霉经液体深层发酵和先进的后提取工艺生产、精制而成^[4]。包括以下步骤:种子培养→得种子液→发酵培养→粗提取→分离→纯化→浓缩→干燥。在粗提取过程中,由于纤维素酶能溶解于水,且在一定浓度的盐溶液中,其溶解度增加,故一般采取在稀盐溶液中进行纤维素酶的提取,常用的盐溶液一般为加入约占纤维素酶量的8%氯化钠盐溶液,在将发酵生产的纤维素酶浸提出来,在后续生产过程中不去除氯化钠盐,这些氯化钠盐就形成了纤维素酶最主要的灰分。

强酸性苯乙烯系阳离子树脂(湿计)是在交联为7%的苯乙烯·二乙烯共聚体上带有磺酸基(—SO₃H)的阳离子交换树脂,交换原理为:这类树脂含有大量的强酸性基团,如磺酸基—SO₃H,易在溶液中离解出H⁺,故呈强酸性。树脂离解后,本体所含的负电基团,如SO₃⁻,能吸附结合溶液中的其他阳离子。这2个反应使树脂中的H⁺与溶液中的阳离子互相交换^[5-6]。树脂在使用后要进行再生处理,即用化学药品使离子交换反应以相反方向进行,使树脂的官能基团恢复原来状态,以

第一作者:杜双有,女,大学本科,工程师,执业药师,研究方向为制剂工艺,(电话)0571-89707387(电子信箱)952101878@qq.com。

供再次使用。强酸性阳离子树脂是用强酸进行再生处理,此时树脂放出被吸附的阳离子,再与 H^+ 结合而恢复原来的组成。鉴于此,参考各类降低灰分研究的文献资料^[7-10],本研究中采用把酶溶于水后,与型号为“ Na^+ ”的强酸性苯乙烯系阳离子树脂(湿计)进行离子交换处理,以去除纤维素酶中的灰分,进而降低壳聚糖酶解产物(壳低聚糖)灰分。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,检测精度为 0.1 mg);SXL-1008 型程控箱式电炉(上海精宏实验设备有限公司);GL-100 型双层圆盘电炉(嘉兴市凤桥电热器厂)。

1.2 试剂

纯化水(杭州澳医保灵药业有限公司制水车间自制);强酸性苯乙烯系阳离子树脂(湿计,浙江杭州双林化工试剂厂);食品添加剂盐酸(杭州电化集团有限公司,批号为20170623);纤维素酶(湖南利尔康生物股份有限公司,批号为20171114-105,规格为每袋 1 kg);壳聚糖(青岛云宙科技生物有限公司,批号为1709023)。

2 方法与结果

2.1 灰分测定

取大小适宜的坩埚置程控箱式电炉中,在 $(550 \pm 25)^\circ\text{C}$ 下灼烧 0.5 h ,冷至 200°C 以下后,取出,放入干燥器中冷却至室温,精密称定,并重复灼烧至恒重(前后2次称量相差不超过 0.5 mg)。在恒重好的空坩埚中,加入 2 g (精确至 0.0001 g)样品,先在电热板上以小火加热,使样品充分炭化至无烟,然后置程控箱式电炉中,在 $(550 \pm 25)^\circ\text{C}$ 灼烧 4 h 至灰化完全,冷至 200°C 以下后,取出,放入干燥器中冷却至室温,精密称定(重复灼烧前后2次称量相差不超过 0.5 mg)。计算公式:灰分($\%$)= $(W_2 - W_{\text{空}})/W_1 \times 100\%$,其中 $W_{\text{空}}$ 为空坩埚重(g), W_1 为样重(g), W_2 为灼烧后称重(g)。

2.2 方法选择

由于在制备生产纤维素酶的过程中,引入淀粉作为载体,淀粉不易溶解,易形成糊状,在使用动态柱离子交换时会使交换柱堵塞,而用静态浸泡交换法时^[11-12],只要控制好树脂和纤维素酶液的比例,不断搅拌,可使离子在树脂与溶液间达到平衡,离子交换过程可顺利进行,故采用静态浸泡离子交换法来处理。

2.3 阳离子交换树脂法降低纤维素酶灰分的工艺方法

2.3.1 预处理

阳离子交换树脂预处理:取乌合桶1个,加强酸性苯乙烯系阳离子树脂 15 kg ,加纯化水 10 kg ,再加浓

$\text{HCl } 4\,500\text{ mL}$,搅匀, $\text{pH}=1$,放置 6 h 。以一层纱布过滤,加 50 kg 纯化水搅匀,过 5 min 过滤,如此重复 $8\sim 9$ 次,至 $\text{pH}=6\sim 7$,将乌合桶(内树脂浸于水中)放置,待用。

酶溶液预处理:在酶解前 1 d 进行,称取纤维素酶 5 kg 置乌合桶中,加水 30 kg ,搅拌,溶解,放置过夜。

纤维素酶液离子交换处理:将预处理好的酶液倒入已滤去水的树脂中,放置 0.5 h ,中间搅拌数次。以一层纱布袋过滤,滤除树脂,得经离子交换树脂处理好的酶液。

2.3.2 酶解

在夹层锅中加入纯净水 900 kg (50°C),加入经阳离子交换树脂处理好(或未经阳离子交换树脂处理过)的酶液,再加壳聚糖 100 kg ,搅拌均匀,再向夹层锅内缓缓加入食品级盐酸 36 kg ,适当搅拌, 55°C 保温,酶解 8 h ,过滤,喷雾,得壳低聚糖。根据食品安全国家标准食品灰分的测定方法(GB 5009.4-2016)测定壳低聚糖灰分。

2.4 纤维素酶与强酸性苯乙烯系阳离子树脂用量设计

若纤维素酶未进行阳离子交换树脂处理,其产物壳低聚糖的灰分预计:批号为1709023壳聚糖的灰分为 0.6% , 100 kg 壳聚糖的灰分为 $100\text{ kg} \times 0.6\% = 0.6\text{ kg}$ (I);批号为20171114-105纤维素酶的灰分为 7.5% , 5 kg 纤维素酶的灰分为 $5\text{ kg} \times 7.5\% = 0.3375\text{ kg}$ (II);总灰分= $I + II = 0.375 + 0.6 = 0.975\text{ kg}$ 。

100 kg 壳聚糖酶解后得壳低聚糖约 110 kg ,灰分估计为 $0.975\text{ kg} \div 110\text{ kg} = 0.89\%$ 。

为去除纤维素酶中的灰分,需强酸性苯乙烯系阳离子树脂(湿计)用量的计算^[13],强酸性阳离子树脂基本参数见表1。

表1 强酸性阳离子树脂基本参数

项目	参数
牌号	001 $\times$ 7(732)
外观	棕黄色至棕褐色球状颗粒
交换容量[mmol/g(干)]	$\geq 4.2(\text{Na}^+)$
粒度(0.3~1.2 mm)	95%
湿真比重	1.23~1.28
湿视密度(g/mL)	0.75~0.85
含水量($\%$)	46~52
型号	Na^+

批号为20171114-105纤维素酶的灰分为 7.5% , 5 kg 纤维素酶的灰分为 $5\text{ kg} \times 7.5\% = 0.375\text{ kg}$ (I)。

根据树脂全交换容量($\geq 4.2\text{ mmol/g}$)、钠的摩尔质量(M , 23 g/mol)、含水量($46\% \sim 52\%$),计算纤维素酶中 0.375 g 的灰分的物质的量为(以钠计): $n = m/M = 0.375\text{ g} \div 23\text{ g/mol} = 0.0163\text{ mol}$ (II)。其中, n 为物质的量, m 为物质的质量, M 为物质的量。

需阳离子树脂的量为 $0.0163\text{ mol} \div 4.2\text{ mmol/g} =$

3.88 kg。

折算掉含水量为 $3.88 \div (1 - 0.52) (\text{含水量}) = 8.08 \text{ kg}$ 。

因为强酸性苯乙烯系阳离子树脂的工作交换容量是在给定工作条件下实际可利用的离子交换能力,一般只有理论上的交换容量约 60%。按实际工作交换容量折算: $8.08 \div 0.6 = 13.5 \text{ kg}$ 。

考虑到工作交换容量与实际运行条件的关系非常大,起始用量采用 15 kg。第 1 次阳离子交换树脂 15 kg 处理后,壳低聚糖的灰分为 0.72%。可见,15 kg 阳离子交换树脂的真正工作交换能力不到 375 g,只有约 $110 \text{ kg} \times (0.92\% - 0.72\%) = 220 \text{ g}$,要去除 375 g 的灰分,估计需阳离子交换树脂为 $375 \text{ g} \div 220 \text{ g} \times 15 \text{ kg} = 25.6 \text{ kg}$ 。因此分别采用以每次递加 5 kg 的量,即 20 kg 和 25 kg 的强酸性苯乙烯系阳离子树脂用量继续考察对纤维素酶去除灰分的作用,强酸性苯乙烯系阳离子树脂分别为 0,15,20,25 kg。

2.5 强酸性苯乙烯系阳离子树脂的再生^[14]

经静态交换的强酸性苯乙烯系阳离子树脂,经甩干,水洗,再甩干的步骤,再加浓盐酸(HCl),搅匀,调 pH = 1,放置,再生,待用。结果见表 2。

表 2 纤维素酶与强酸性苯乙烯系阳离子树脂用量比例变化

序号	纤维素酶用量:阳离子 交换树脂用量	壳低聚糖灰分 (%)	去灰分率 (%)
1	5:0	0.92	
2	5:15	0.72	21.7
3	5:20	0.65	29.3
4	5:25	0.61	33.7

3 讨论

强酸性阳离子交换树脂可交换所有的阳离子,因纤维素酶中的灰分主要是氯化钠盐,故采用型号为“Na⁺”强酸性苯乙烯系阳离子树脂进行阳离子交换: $R-H(\text{阳离子交换树脂}) + M-Cl(\text{酶}) \rightarrow R-M + HCl$,其交换产生的 HCl 又可作为壳聚糖酶解时用的盐酸,故不需要对 Cl⁻ 进行阴离子交换去除。本研究中的创新点正是只需进行 1 次阳离子交换,无须进行阴离子交换去除阴离子,操作步骤简便,就可达到降低纤维素酶的灰分,进而降低壳低聚糖灰分的目的。

灰分是产品质量的关键控制点。由表 2 可见,壳低聚糖的灰分降低效果明显。纤维素酶用量 5 kg 不变的情况下,随着阳离子交换树脂用量的增加,能交换去除纤维素酶中

阳离子的量也相应增加,即能去除的灰分就增加,灰分降低。当纤维素酶用量-阳离子交换树脂用量(kg)的比例为 5:25(即 1:5)时,纤维素酶中的灰分已基本去除,壳低聚糖中的灰分达到产品的质量要求,不仅提升了产品质量,也大大降低了产品因灰分不合格而报废的风险,提高了效益。该方法具有交换容量大、产业化放大容易、树脂可长期反复使用的特点,操作工序简便易行、生产成本低,可广泛应用于生产实践,为壳低聚糖的生产 and 广泛应用在质量上提供了有力保障,也能产生良好的社会效益和经济效益。

鉴于壳聚糖原料中也存在一定的灰分,是否结合去除壳聚糖中的灰分,进一步提升壳低聚糖的质量,还值得今后进一步探讨^[15-16]。

参考文献:

- [1] 谭佩毅,黄秀锦. 纤维素酶法制备壳寡糖工艺的研究[J]. 中国调味品,2012,37(12):79-83.
- [2] 郑焯颖,郑海龙. 壳低聚糖的制备方法:CN,101338332 [P]. 2007-07-03.
- [3] 武秀琴. 纤维素酶及其应用[J]. 微生物学杂志,2009,29(2):89-92.
- [4] 张继泉,王瑞明,孙玉英,等. 里氏木霉生产纤维素酶的研究进展[J]. 饲料工业,2003,24(1):9-13.
- [5] 张 丽. 阳离子交换树脂[J]. 河北化工,2010,33(10):21-22.
- [6] 陈瑞秋. 大孔型强酸性阳离子交换树脂生产技术研究[J]. 化工管理,2018(4):184-185.
- [7] 任新林,龙 萍,吴 鉴. 001×7 阳离子交换树脂吸附氟硅酸钠母液中的钠离子[J]. 材料导报,2013,27(24):50-52.
- [8] 张 莉,狄留庆,吴 皓. 阳离子交换树脂法除珠蛋白的工艺研究[J]. 南京中医药大学学报,2004,20(3):173-174.
- [9] 李朝强. 降低桑叶提取物中灰分的方法探讨[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(7):101-102.
- [10] 卢 霞,赵培城,应雪肖. 去除明胶水解产物中灰分的研究[J]. 现代食品科技,2006,22(1):14-16.
- [11] 杨文斌,王玉昌,赛 音. 离子交换法降低甘草浸膏灰分的研究[J]. 离子交换和吸附,1992,8(4):346-348.
- [12] 罗 锋,卢世林,孟世荣,等. 甘草膏生产中降低灰分的研究[J]. 塔里木农垦大学学报,1998,10(1):47-49.
- [13] 王 菲,王连军,李健生. 大孔弱酸阳离子交换树脂对 Pb(II) 的静态吸附性能[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2009,36(1):23-27.
- [14] 张维科,郑斐斐. 再生方法对阳离子交换树脂再生度的影响[J]. 热力发电,2013,42(3):88-89.
- [15] 陈晓风,刘 莹,张俊燕. 红旱莲药材的质量标准研究[J]. 药学实践杂志,2018,36(5):426-429.
- [16] 李朝强. 降低桑叶提取物中灰分的方法探讨[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(19):101-102.

(收稿日期:2019-09-12)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办