文章编号:1009-038X(2003)06-0075-06

离子交换层析色谱法分离壳聚糖

王岸娜, 王 璋, 许时婴
(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要: 用 CM sepharose CL-6B 离子交换剂,使用不同的柱尺寸,采用离子强度线性梯度洗脱,对脱乙酰度 80%, 90%的壳聚糖样品进行分离。从脱乙酰度 80%的壳聚糖样品分离得到 3 个组分实验结果表明,采用线性梯度洗脱时,直径相同的柱子,长的离子交换柱有利于壳聚糖的分离;对同一根离子交换柱,线性梯度洗脱体积的增加有利于壳聚糖的分离. 分离不同脱乙酰度壳聚糖时,高脱乙酰度壳聚糖较低脱乙酰度壳聚糖在起始缓冲液洗脱时,洗脱出的壳聚糖含量较低,在高离子强度处洗脱出的壳聚糖含量较高.

关键词: 壳聚糖; 脱乙酰度; 离子交换层析色谱
中图分类号:Q 539 **文献标识码**: A

Study on the Separation of Chitosan by Ion-Exchange Chromatography

WANG An-na, WANG Zhang, XU Shi-yin
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The factors such as the eluate volume eluate and the size of column affecting the separation of chitosan by ion-exchange chromatography were studied. Chitosans with 80% and 90% degrees of deacetylation were separated. Three fractions were collected, freezed and lyophilized, respectively. The result demonstrated that longer column and increase of eluate volume eluate were favorate to isolation with a continuous grandient.

Key words: chitosan; degree of deacetylation; ion-exchange; chromatography

壳聚糖(chitosan(1,4)-2-胺基-2-脱氧-β-D-葡聚糖)是由甲壳素(chitin(1,4)-2-乙酰胺基-2-脱氧-β-D-葡聚糖)经脱乙酰化反应而得到的一种生物高分子,其分子链中通常含有 2-N-乙酰氨基葡萄糖和 2-氨基葡萄糖 2 种结构单元,两者的比例随脱乙酰基反应进行程度不同而不同. 甲壳素是地球上第二大丰富的可再生利用的有机资源,广泛存在于无脊椎动物的外壳、昆虫的外角质层和内角质层及真菌的细胞壁中,尤其是虾、蟹等甲壳动物的外壳中含量更为丰富[1].

壳聚糖与纤维素等多种膳食纤维具有相似的特性[2],并且是惟一带有正电荷的动物性纤维,其独特的化学结构和生理活性已成为近年来人们研究的焦点,被欧美一些发达国家誉为人体"第六生命要素"[3]. 壳聚糖良好的生物相容性、可生物降解性,以及无毒副作用的安全特性,越来越被人们广泛应用于医药、食品、化工、农业、环保等各个领域[4]. 在食品工业中,壳聚糖可用于果蔬饮料的加

收稿日期:2003-03-24; 修回日期:2003-06-25.
作者简介: 王岸娜(1972-),女,山西洪桐人,食品科学与工程博士研究生.
万方数据

工、食品工业废水处理、焙烤食品、食品防腐保鲜；壳聚糖也可作为保健食品、酶的固定化载体、乳化剂、增稠剂和稳定剂[5~11]等. 壳聚糖线性分子链上具有游离氨基，其氮原子上还有一对未结合电子，使其呈现弱碱性，能从溶液中结合一个氢原子，从而使壳聚糖成为带正电荷的聚电解质，显示出优异的絮凝作用[12]；壳聚糖分子中含有氨基和羟基，是天然的高分子螯合剂，可和许多金属离子生成稳定的络合物，可用来从溶液中有效地捕集重金属离子；壳聚糖也能通过络合、离子交换等作用对染料、蛋白质、氨基酸、核酸、酚类等进行吸附[13]. 与以上应用相关的重要参数是壳聚糖的脱乙酰度和相对分子质量.

壳聚糖氨基含量的多少和相对分子质量大小对抗菌活性产生重大影响[14,15]. 食品加工废水净化、果汁澄清和污水处理时使用壳聚糖，成本低廉、无毒、无味，是不会造成二次污染的天然絮凝剂，壳聚糖的脱乙酰度和相对分子质量同样影响应用效果[16,17]，脱乙酰度和相对分子质量对作为膜材料的壳聚糖的成膜和所成膜的结构影响更为突出[16,18]，也直接影响壳聚糖在醇水分离、果蔬保鲜、固定化酶载体等方面的应用. 由于壳聚糖脱乙酰度和相对分子质量是与壳聚糖应用相关的重要参数，在溶液中壳聚糖分子上带有正电荷的量与壳聚糖的脱乙酰度有关，而离子交换层析色谱是根据被分离分子的电荷差异来进行分离的，为此，作者研究了离子交换层析色谱分离壳聚糖的方法，以期分离出分子链上含有不同电荷量的壳聚糖，即分离出不同脱乙酰度的壳聚糖组分.

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖：江南大学食品学院作者所在食品科学实验室自制.

1.2 仪器与试剂

试剂：所有化学试剂均为分析纯(AR)；氨基葡萄糖：购自 Sigma 公司；仪器：ZD-2 型自动电位滴定计；DZ-1 型滴定装置；CM sepharose CL-6B：Pharmacia Biotech 公司制造.

1.3 方法

1.3.1 脱乙酰度的测定 采用电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度，每个样品测定 3 次，结果取其平均值[19,20].

测定方法：精确称取 0.25 g 样品，溶于 20 mL 0.1 mol/L HCl 中，加入 10 mL 去离子水，用电位滴定仪及 10 mL 微量滴定管在不断搅拌下用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定，记录并绘出滴定曲线，按下式计算壳聚糖的脱乙酰度：

$$NH_2(\%)=\frac{(c_1V_1-c_2V_2)\times 0.016}{m}$$

c_1：标准 HCl 摩尔浓度(mol/L)；

c_2：标准 NaOH 摩尔浓度(mol/L)；

V_1：标准 HCl 体积(mL)；

V_2：终点时所消耗的标准 NaOH 体积(mL)；

m：样品质量(g).

$$\text{脱乙酰度}(\%)=\frac{NH_2}{9.94}$$

电位滴定曲线如图 1.

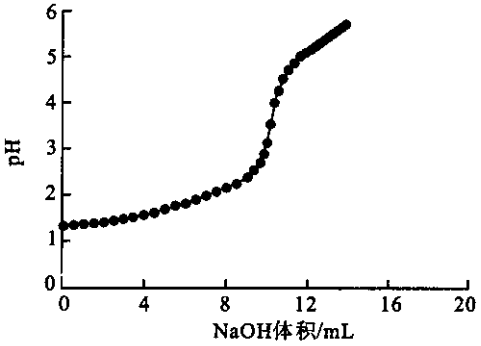


图 1 电位滴定曲线

Fig. 1 Curve of Potential titrate

1.3.2 粘度法测定相对分子质量

1)样品溶液制备：已知质量的干燥壳聚糖样品溶于 0.1 mol/L 乙酸钠＋0.2 mol/L 乙酸中，配制成 0.03 g/mL 质量浓度的溶液.

2)粘度测定：采用乌氏粘度计在 25 ℃恒温水浴中测定.

3)粘度公式：$\eta=\eta_{sp}/c$，$\eta_{sp}=(\eta_o-\eta_s)/\eta_s$

其中：η 为比浓粘度；η_{sp} 为增比粘度；η_s 为溶剂粘度；η_o 为样品粘度.

相对分子质量计算公式：$\eta=K\,Mr$

其中：K 和 α 是常数，$K=1.424\times10^{-3}$，$\alpha=0.96$[19]，Mr 为相对分子质量

1.3.3 离子交换层析色谱 用 CM sepharose CL-6B 色谱柱分离壳聚糖样品. 首先采用直径 2.6 cm、高 50 cm 和直径 2.6 cm、高 30 cm 的色谱柱对脱乙酰度为 80%和 90%的壳聚糖进行分离，再用直径 4.5 cm、高 30 cm 的色谱柱分离脱乙酰度为 80%的壳聚糖样品. 上样后用 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液洗脱，直径 2.6 cm、高 50 cm 和直径 2.6 cm、高 30 cm 色谱柱分离壳聚糖时每管 4 mL 分部收集，直径 4.5 cm、高 30 cm 色谱柱分离壳

万方数据

聚糖时每管 18 mL 分部收集,上样质量浓度都为 2.5 mg/mL.按文献方法[21]测定分部收集的每管壳聚糖含量.以氨基葡萄糖制作标准曲线.标准曲线:$y = 0.006\ 7x - 0.005\ 1$(ρ为氨基葡萄糖溶液质量浓度(μg/mL);y 为吸光度),线性相关系数 $R^2 = 0.998\ 9$.

1.3.4　脱盐率的计算　脱盐率以氯离子质量浓度的脱除率计算[22].

2　结果与讨论

2.1　壳聚糖脱乙酰度和相对分子质量的测定

采用电位滴定法测定了 2 个壳聚糖样品的脱乙酰度分别为 80%和 90%;用粘度法测得脱乙酰度 80%壳聚糖的相对分子质量为 1 140 000.

2.2　离子交换色谱柱 CM-sepharose-CL-6B 对壳聚糖分离纯化条件选择

2.2.1　不同离子交换柱柱长分离壳聚糖　采用离子强度线性梯度,即 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液,含 NaCl 浓度 0→2 mol/L.分别用直径 2.6 cm、高 50 cm,直径 2.6 cm、高 30 cm 的 CM-sepharose-CL-6B 离子交换柱对脱乙酰度 80%、质量浓度为 2.5 mg/mL 的壳聚糖溶液进行洗脱,起始缓冲液为 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液.线性梯度洗脱时,不含 NaCl 和含 2 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液各 200 mL.不同柱高洗脱时体积流量:直径 2.6 cm、高 50 cm 柱体积流量为 1 mL/min;直径 2.6 cm、高 30 cm 柱体积流量为 2 mL/min.直径 2.6 cm、高 50 cm 柱上样液体积为 100 mL;直径 2.6 cm、高 30 cm 柱上样液体积为 50 mL.洗脱曲线见图 2,3.

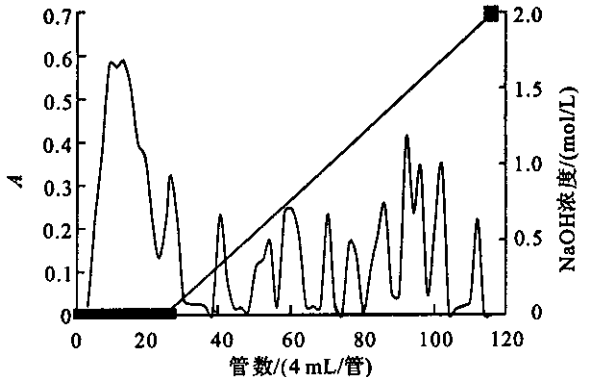


图 2　直径 2.6 cm、高 50cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖线性梯度洗脱曲线

Fig. 2　Elution curve of seperation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*2.6 cm×*H*50 cm

万方数据

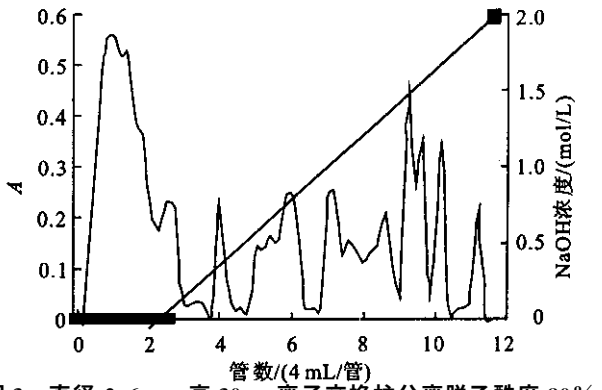


图 3　直径 2.6 cm、高 30cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖线性梯度洗脱曲线

Fig. 3　Elution curve of seperation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*2.6 cm×*H*30 cm

2.2.2　不同脱乙酰度壳聚糖的分离　用直径 2.6 cm、高 30 cm CM-sepharose-CL-6B 离子交换柱对质量浓度 2.5 mg/mL,脱乙酰度分别为 80%、90%的壳聚糖进行分离.缓冲液为 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液,线性梯度洗脱时,不含 NaCl 和含 2 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液各 200 mL.洗脱时体积流量为 2 mL/min.上样液体积都为 50 mL,壳聚糖脱乙酰度分别为 80%和 90%的洗脱曲线见图 4,5.

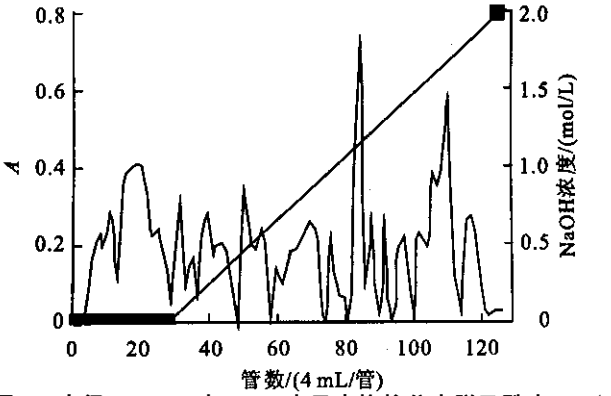


图 4　直径 2.6 cm、高 30cm 离子交换柱分离脱乙酰度 90%壳聚糖线性梯度洗脱曲线

Fig. 4　Elution curve of seperation of chitosan with 90% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*2.6 cm×*H* 30cm

2.2.3　不同洗脱液洗脱体积分离壳聚糖　直径 2.6 cm、高 30 cm CM-sepharose-CL-6B 离子交换柱在线性梯度洗脱时,用不同的洗脱液体积对脱乙酰度为 80%的壳聚糖进行分离,见图 3,5.图 5 为采用离子强度线性梯度时,不含 NaCl 和含 2 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液各 300 mL,其余条件与图 3 相同.

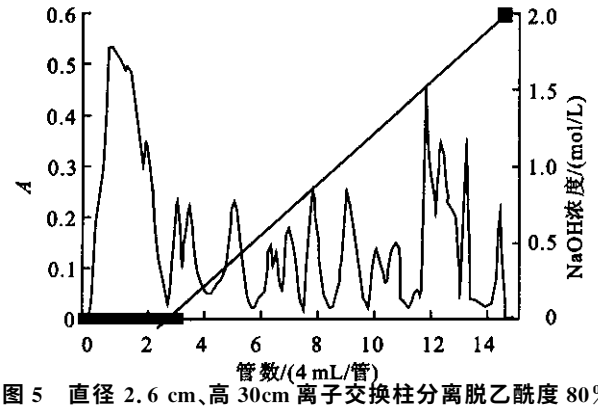


图 5 直径 2.6 cm、高 30cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80% 壳聚糖(洗脱体积 600 mL)线性梯度洗脱曲线

Fig. 5 Elution curve of seperation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*2.6 cm×*H*30 cm (elution volume 600 mL)

2.3 讨论

通过用直径相同、长度不同的离子交换柱在相同条件下对脱乙酰度 80% 的壳聚糖样品的分离洗脱曲线,可知在采用线性梯度洗脱时直径 2.6 cm、高 50 cm 的柱比直径 2.6 cm、高 30 cm 的离子交换柱有利于壳聚糖的分离. 这与在应用连续梯度洗脱时,适当地增加柱长可增加离子交换层析的分辨能力[23]的原理相一致. 用直径 2.6 cm、高 30 cm CM-sepharose-CL-6B 离子交换柱线性梯度洗脱时,用不同的洗脱液体积对脱乙酰度 80% 的壳聚糖进行线性梯度洗脱,即都用 0.05 mol/L、pH 5.3 含 NaCl 浓度 0→2 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液线性梯度洗脱时,洗脱液总体积自 400 mL 增加到 600 mL. 在上样液浓度、上样液体积、洗脱液流速均相同条件下,线性梯度洗脱时,洗脱液体积为 600 mL 的洗脱结果比洗脱液体积为 400 mL 的可更好的分离壳聚糖,即线性洗脱总体积的增加有利于壳聚糖的分离.

用直径 2.6 cm、高 30 cm CM-sepharose-CL-6B 离子交换柱对脱乙酰度分别为 80%、90% 的壳聚糖进行分离时,发现 90% 脱乙酰度壳聚糖较 80% 脱乙酰度壳聚糖在起始缓冲液洗脱时,洗脱出的壳聚糖量相对较低,在高离子强度处洗脱出的壳聚糖含量相对高一些. 壳聚糖在一些低浓度酸中溶解的实质是壳聚糖分子链上含有氨基,这些氨基的氮原子上具有一对未共用的电子,使氨基呈现弱碱性,可从溶液中结合一个氢离子,从而使壳聚糖成为带正电荷的聚电解质,破坏了壳聚糖分子间和分子内的氢键,使之溶解. 在溶液中,壳聚糖分子链上带有正电荷的量与壳聚糖的脱乙酰度(壳聚糖分子链上自由氨基的含量)有关. 脱乙酰度高的壳聚糖,其分子链上的氨基含量高,在酸溶液中,壳聚糖分子链上所带的正电荷多. 离子交换层析是利用离子交换剂来分离、纯化各种化学物质和生物大分子的层析技术,其原理是依据被分离分子的电荷差异来进行分离[24]. 在溶液中,高脱乙酰度壳聚糖的分子链上含正电荷电荷数多的分子相对多一些,在采用离子强度梯度洗脱时,就在洗脱曲线上表现出高脱乙酰度壳聚糖较低脱乙酰度壳聚糖在起始缓冲液洗脱时,洗脱出的壳聚糖量较低,在高离子强度处洗脱出的壳聚糖含量较高.

2.3.1 凝胶柱、离子交换柱分离纯化壳聚糖

用 sepharose 2B 凝胶柱和 CM sepharose CL-6B 离子交换柱分离纯化壳聚糖印证壳聚糖为不同相对分子质量、脱乙酰度壳聚糖的混合体系

首先用直径 1.6 cm、高 100 cm sepharose 2B 凝胶柱层析分离壳聚糖,0.2 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液作为流动相,80% 脱乙酰度壳聚糖上样液质量浓度为 1.2 mg/mL,上样体积 10 mL,柱的体积流量为 3 mL/min,得到 3 个不同相对分子质量的壳聚糖组分(见图 5). 合并 9 次相同条件下分离的组分,对组分 3 浓缩、冷冻干燥. 再用直径 2.6 cm、高 50 cm 离子交换柱进一步分离,得到 4 个组分(见图 6). 直径 2.6 cm、高 50 cm 离子交换柱的分离条件为:0.05 mol/L 、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液为起始缓冲液,采用离子强度线性梯度洗脱,即 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液含 NaCl 浓度 0→2 mol/L,线性洗脱液总体积 400 mL,上样液质量浓度每 10 mL 中含 0.16 mg,上样体积 10 mL,线性洗脱时体积流量 1 mL/min. 可见,经直径 1.6 cm、高 100 cm sepharose 2B 凝胶柱分离得到的组分 3 再经直径 2.6 cm、高 50 cm 离子交换柱分离后得到了 4 个组分,在起始缓冲液洗脱时得到 2 个组分,在高离子强度洗脱时得到 2 个组分,说明具相同相对分子质量的壳聚糖含有不同脱乙酰度的壳聚糖分子. 实验室所制备的壳聚糖样品是由不同相对分子质量和不同脱乙酰度壳聚糖组成的混合体系.

2.3.2 壳聚糖的分离、制备

1) 在以上实验的基础上,增加离子交换柱的床体积,进行了直径 4.5 cm、高 30 cm CM sepharoseK-CL-6B 离子交换柱对脱乙酰度 80% 的壳聚糖的分离制备. 首先采用离子强度线性梯度洗脱,即 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液,含 NaCl 浓度 0→2 mol/L,总体积分别为 1 000 mL 和 2 000 mL 的洗脱液体积对脱乙酰度 80%、质量浓

万方数据

度 2.5 mg/mL 壳聚糖样品进行洗脱,洗脱曲线见图 8,9.起始缓冲液为 0.05 mol/L、pH 5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液,洗脱时体积流量为 2 mL/min.上样液体积都为 200 mL.

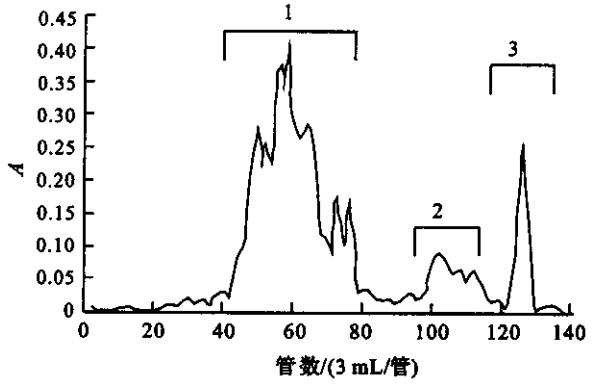


图 6　Sepharose2B 分离脱乙酰度 80%壳聚糖洗脱曲线

Fig. 6　Elution curve of seperation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on Sepharose-2B column *D*1.6cm×*H*100cm

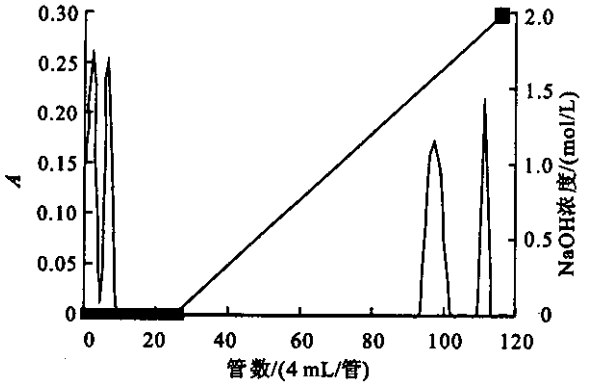


图 7　直径 2.6 cm、高 50 cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖线性梯度洗脱曲

Fig. 7　Elution curve of seperation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*2.6cm× *H*50cm

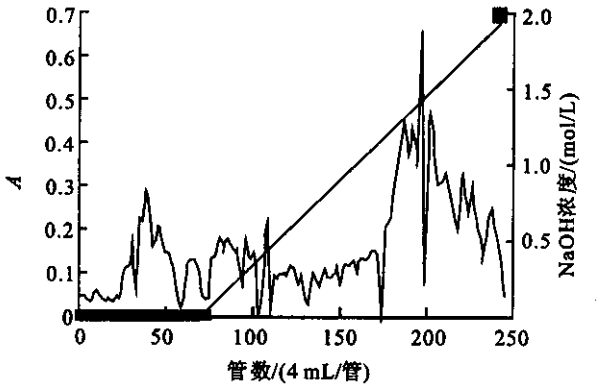


图 8　直径 4.5 cm、高 30 cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖线性洗脱体积 1 000 mL 时的洗脱曲线

Fig. 8　Elution curve of separation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*4.5cm× *H*30cm (elution volume 1000 mL)

由图 7,8 看出,用直径 4.5 cm、高 30 cm CM sepharose CL-6B 离子交换柱分离壳聚糖时,线性梯度洗脱时,洗脱液体积 1 000 mL 洗脱没有洗脱液体积 2 000 mL 洗脱的分辨率高.因此,在梯度洗脱时,选用总洗脱液体积 2 000 mL 的分离方法进行离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖样品,重复操作 11 次,分离壳聚糖样品 5.7 g.分别收集 3 个组分依次为 a,b,c(见图 9).

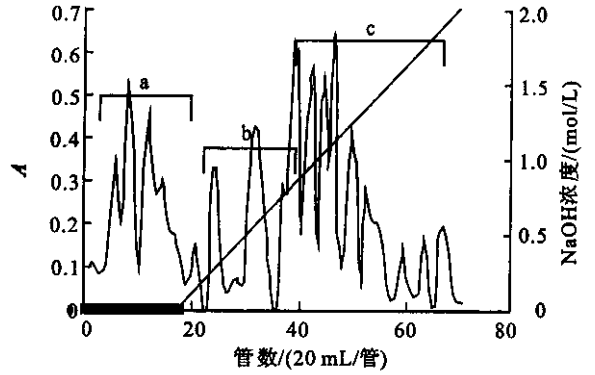


图 9　直径 4.5 cm、高 30 cm 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖线性洗脱体积 2 000 mL 时的洗脱曲线

Fig. 9　Elution curve of separation of chitosan with 80% degrees of deacetylation on ion-exchange chromatography column *D*4.5cm×*H*30cm (elution volume 2000 mL)

2) 对直径 4.5 cm、30 cm CM sepharose CL-6B 离子交换柱分离的 3 个组分 a,b,c 透析脱盐,分别收集用直径 4.5 cm、高 30 cm CM sepharose CL-6B 离子交换柱分离脱乙酰度 80%壳聚糖的各组分,旋转蒸发自离子交换柱中洗脱出的各部分洗脱液,装于透析袋中,去离子水中透析脱盐 6 次,旋转蒸发浓缩,冷冻,冷冻干燥,得到各组分的干燥样品.

脱盐率以氯离子质量浓度的脱除率计算[22].氯离子质量浓度的测定方法:取 25 mL 样液于 250 mL 锥形瓶中,加入 5 g/dL 的铬酸钾溶液 10 滴,用 0.01 mol/L 的硝酸银滴定至橘红色,记录消耗硝酸银的体积数,另作蒸馏水空白.

由参考文献[22]所计算的各组分的脱盐率分别为99.7%,99.5%,99.6%.

此外,在透析脱盐时,对每次透析后的去离子水测定电导率,检测透析脱盐的趋势,量化脱盐步骤.由透析脱盐趋势图(见图 10)可见,对组分 b,c 透析 6 次,组分 a 透析 3 次可以达到脱盐效果.故在此后的脱盐步骤中,对组分 b,c 透析 6 次,组分 a 透析 3 次.

万方数据

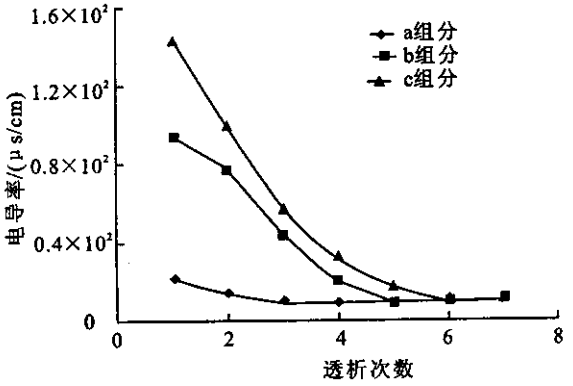


图 10 离子交换层析分离壳聚糖得到的 3 个组分的透析脱盐趋势图

Fig. 10 Dialysis diagram of three fractions of chitosan seperated on ion-exchange chromatography column: *D*4.5cm×*H*30 cm

3 结 论

研究了离子交换色谱法分离壳聚糖的条件，实验结果表明，离子交换色谱可以有效的分离壳聚糖. 采用线性梯度洗脱时，直径相同的柱子，长的离子交换柱有利于壳聚糖的分离；对同一根离子交换柱，线性梯度洗脱时洗脱体积的增加有利于壳聚糖的分离；用离子交换色谱法分离不同脱乙酰度壳聚糖时，高脱乙酰度壳聚糖较低脱乙酰度壳聚糖在起始缓冲液洗脱时，洗脱出的壳聚糖量较低，在高离子强度处洗脱出的壳聚糖含量较高. 并增加离子交换柱的床体积，分离制备了脱乙酰度 80％壳聚糖样品，又对分离的各组分进行透析脱盐，脱盐率分别达到 99.7％，99.5％，99.6％.

参考文献：

[1] Muzzarelli R A A. Chitin[M]. New York: Pergamon Press, 1977.8.

[2] Chobot V K J O L. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. chitin and chitosan[J]. **Ceska Slov Farm**, 1995,44(4):190.

[3] 顾其胜、侯春林. 第六生命要素：几丁质、几丁聚糖、甲壳质、壳糖胺[M]. 上海：第二军医大学出版社，1999.

[4] 李树品，康战燕，苏学艳. 壳聚糖与人体生理机能调节[M]. 山东科学，1998，11(1)：57－62.

[5] 郭开宇，赵谋明. 甲壳素/壳聚糖的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业，2000，26 (1)：59－63.

[6] Bough W A. Reduction of suspend solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan[J]. **J Food Sci**，1975，40(2)：297.

[7] Sapers G M. Chitosan enhances control of enzymatic browing in apple and pear juice by filtration[J]. **J Food Sci**, 1992，57(5)：1192－1193.

[8] 陈安和，孙敏，李坤培. 几丁质对贮存期草莓 SOD 活力和 Vc 含量的影响[J]，食品科学，1994(7)：65－67.

[9] 曾名勇，陈金芬. 微晶甲壳素作冰淇淋乳化剂的研究[J]. 食品工业科技，1996，(2)：65－67.

[10] Knorr D. Recovery and utilization of chitin in food processing waste management[J], **Food Technol**，1991(1)：114－119.

[11] Synowiecki J，Sikorske Z E. The activity of immobilized enzymes on different krill chitin preparations[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1981，23：2211.

[12] 吴长青. 壳聚糖在果汁澄清工艺上的应用[J]. 饮料工业，2001，4(3)：9.

[13] Dietrich knorr, Use of chitinous polymers in food—a challenge for food research and development[J]. **Food Technology**, 1984，38(1)：85.

[14] Muzzarelli RAA, Tarsi R, Filippinio. Antimicrobial properties of N－carboxybutyl chitosan, Antimicrob[J]. **Agents Chemother**, 1990，34(10)：2019－2023.

[15] 蒋玉燕，毕忙群，汪学伟，等. 聚氨基葡萄糖的体外抗菌活性[J]. 中国抗生素杂志，1996，21(1)：54－57.

[16] 董炎明，丘蔚碧，吴玉松，等. 甲壳素/壳聚糖及其在食品工业中的应用[J]. 食品科技，2000，(5)：28－31.

[17] 胡勇有、高健. 微生物絮凝剂的研究与进展[J]. 环境科学进展，1999，(4)：24－28.

[18] 严俊. 甲壳素的化学和应用[J]. 化学通报，1984，11：26－31.

[19] 王伟，薄淑琴，秦汶. 不同脱乙酰度壳聚糖 Mark—Houwink 方程的订定[J]. 中国科学，B 辑，1990，(11)：1126.

[20] 柯火仲，陈庆绸. 线性法电位滴定壳聚糖[J]. 化学通报，1990，10：44.

[21] Wagner W D. More sensitive assay discriminating galactosamine and glucosamine in mixture[J]. **Anal Biochem**, 1979，94：394－396.

[22] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京：北京农业大学出版社，1972.

[23] 孙志贤，王升启，林汝仙. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 军事医学科学出版社，1995.

[23] 孙志贤，王升启，林汝仙. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 军事医学科学出版社，1995.

（责任编辑：杨 萌）

万方数据