

甲壳低聚糖制备研究进展

夏文水* 魏新林
(江南大学食品学院 无锡 214036)

摘 要 详细分析了甲壳低聚糖的制备方法:化学法、酶法、葡基转移法、物理法,包括具体技术特点和产品类型,介绍了国内外近年来这方面研究的新进展。

关键词 甲壳低聚糖,壳聚糖/甲壳素,制备,综述

中图分类号:O636

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2004)04-0332-06

甲壳低聚糖(Chitooligosaccharides)是由 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖(GlcNAc, A)或 *D*-氨基葡萄糖(GlcN, D)通过 β -1,4-糖苷键连接起来的低聚合度水溶性氨基葡聚糖,是甲壳素(chitin)和壳聚糖(chitosan)经水解生成的一类低聚物。对应于甲壳素和壳聚糖,有些文献将甲壳低聚糖分成甲壳素低聚糖或甲壳寡糖(Chitin oligosaccharides)和壳聚糖低聚糖或壳寡糖(Chitosan oligosaccharides)。甲壳低聚糖具有独特的生理活性和功能性质,如调节免疫、促进有益菌的生长、抗肿瘤、抗菌、抵抗细菌侵染、降低胆固醇和促进钙吸收^[1];易溶于水、有吸湿性和保湿性^[2],是一种新兴的功能性低聚糖,在食品、医药、农业和化妆品等领域有广泛的用途。甲壳低聚糖很少在自然界存在,通常是由甲壳素和壳聚糖经降解而生成。由于甲壳素和壳聚糖分子中乙酰氨基或氨基基团的存在,使糖链中 β -1,4-糖苷键的水解断裂存在一定的特殊性,以致在水解效率、聚合度控制、产物分离纯化方面存在一些难题。为此,国内外对甲壳素和壳聚糖的降解进行了许多研究,取得了不少进展,已有文献报道了化学法、酶法、糖基转移法、物理法等几大类方法。本文结合多年来对甲壳低聚糖制备的研究,详细综述了这些甲壳低聚糖的制备方法,比较了各种方法的特点,介绍了国内外相应的研究进展。

1 化学法

1.1 酸降解法

酸降解是使糖苷键水解的一种最普通和最有效的方法。与一般的多糖相比较,甲壳素和壳聚糖分子中的糖苷键难以被水解,需要采用较强烈的反应条件。目前,工业上由甲壳素生产氨基葡萄糖就是采用浓 HCl 高温水解,反应同时发生糖苷键的断裂和酰胺键的水解^[3]。对于要制备低聚物,通常用浓 HCl 控制部分水解,进行中和与脱盐,再用柱层析分离出低聚物,这种方法难以制备较高聚合度的低聚糖。

早在上个世纪 50 年代,Horowitz 等^[4]用酸和碱纯化壳聚糖后,加入浓 HCl 溶液对其进行降解反应,首次得到聚合度 DP < 10 的甲壳低聚糖。Baker 等^[5]用 HCl 在 100 °C 下水解壳聚糖 32 h,再进行乙酰化反应,将所得产物在活性炭-硅藻土柱中以乙醇梯度洗脱分离,制备了 DP 为 1~7 的低聚糖,但四糖以上的产物很少。Domard 等^[6]将壳聚糖用 12 mol/L HCl 在 72 °C 水解 1.5 h,对水解液进行体积排阻色谱层析,以醋酸铵水溶液作洗脱剂,分离出 DP 为 15~37 的低聚糖。许多研究表明,HCl 水解甲壳素或壳聚糖的产物聚合度和产率与反应时的浓度、温度和时间等密切相关。最近,Vårum 等^[7]研究了壳聚糖在稀 HCl 和浓 HCl 中糖苷键水解和部分酰胺键水解速率的变化,发现在稀 HCl 中糖苷键的水解速率与酰胺键水解速率相等,而在浓 HCl 中前者是后者的 10 倍;同时还发现壳聚糖中 A-A 和 A-D 糖苷键的水解比 D-A 和 D-D 糖苷键的水解要快 3 倍。

90 年代又发展了浓硫酸法和氢氟酸法。浓硫酸法是在稀 HCl 中加入体积分数为 65% 的 H₂SO₄,对

2003-06-20 收稿,2003-12-10 修回

江苏省“十五”科技攻关资助项目(BE2001394)

通讯联系人:夏文水,男,1958 年生,教授,博士生导师;E-mail:xiaws@pub.wx.jsinfo.net;研究方向:生物活性物质与功能性食品

壳聚糖进行降解反应,反应后用 Me_2CO 和 H_2SO_4 的混合液处理得到甲壳低聚糖。氢氟酸法是将壳聚糖溶于稀 HCl 中,加入 HF 溶液进行降解反应 15 h 后,以 CaCO_3 中和,过滤,滤液冷冻干燥,可制得 DP 为 2~6 的甲壳低聚糖。Defaye 等^[8]用无水 HF 降解壳聚糖制得产率较高、DP 为 2~11 的低聚糖。但甲壳素在无水 HF 中室温下水解 10 h,主要产物是二糖到四糖,且有 β -1,6-糖苷键的低聚物异构体。

另外,还有其它酸降解法的报道。在室温下用质量分数为 85% 的 H_3PO_4 与壳聚糖反应一定时间后,再加入过量甲醇,得到 DP 为 7~16 的低聚糖。

1.2 氧化降解法

氧化降解是目前化学法中研究较多的一种壳聚糖的降解方法,最常用的氧化剂是 H_2O_2 。通常取壳聚糖按一定比例加入到体积分数为 6% 的 H_2O_2 溶液中,在 60 °C 反应 6 h,反应液过滤后,用体积分数为 95% 的乙醇沉淀出低聚糖。 H_2O_2 氧化法可制备相对分子质量 < 3 000 的甲壳低聚糖。 H_2O_2 的氧化与溶液的 pH 值有关,在中性或碱性溶液中,反应温和,副产物少,为非均相降解反应;若在酸性条件下,氧化反应在均相中进行,反应快,可制备聚合度较低的产物。据报道^[9], H_2O_2 - NaClO_2 法降解可制得相对分子质量为 600 的甲壳低聚糖,降解反应是在质量分数为 0.004%~10% 的 NaClO_2 和质量分数为 0.01%~3.50% 的 H_2O_2 溶液中加入适量 HCl 进行,于 80 °C 反应 1 h 后,用 NaOH 中和,再经 NaBH_4 处理。 H_2O_2 - HCl 法是将壳聚糖溶解在稀 HCl 溶液中,加入适量 NaOH 溶液使其形成悬浊液,然后加入一定量的 H_2O_2 溶液,在 70 °C 进行氧化降解反应;也可以在壳聚糖的稀酸溶液中,直接加入体积分数为 28% 的 H_2O_2 和浓 HCl 在 80 °C 进行降解反应,可得到甲壳低聚糖产物。Chang 等^[10]用低浓度的 H_2O_2 降解部分脱乙酰的甲壳素和壳聚糖,并研究了低聚糖的反应动力学和性质。结果发现,平均相对分子质量降低符合一级反应动力学, H_2O_2 降解反应较微波降解和酶水解快,链末端的断裂发生在壳聚糖的剧烈降解之后,当温度 ≥ 80 °C 时有大量的低聚糖产生,壳聚糖中痕量的过渡金属离子和氨基基团对 β -1,4-糖苷键的断裂非常重要。用高压液体色谱(HPLC)分析测定氨基葡萄糖和甲壳低聚糖的保留时间,可表征低聚糖的聚合度。甲壳低聚糖的组成取决于 H_2O_2 的浓度、反应温度以及甲壳素和壳聚糖的物理化学性质。

亦有酸-亚硝酸盐法、过醋酸法制备甲壳低聚糖的报道^[10]。酸-亚硝酸盐法先使氨基发生氧化而使糖苷键断裂,经还原后可制备相对分子质量为 $2 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ 、分子量分布相对集中的甲壳低聚糖,但氨基含量会减少;过醋酸法制备的甲壳低聚糖产品具有可以长期保存的优点,特别适合于食品及化妆品用甲壳低聚糖的生产。其它的一些氧化降解方法如 NaBO_3 法、 ClO_2 法、 Cl_2 法,从目前报道来看,一般降解产物分子量较高,其相对分子质量在 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 范围内。

2 酶水解法

酶法降解是利用对壳聚糖具有水解作用的酶进行生物降解。目前,已发现有近 40 种酶可用于壳聚糖的降解反应,这些酶包括甲壳素酶、壳聚糖酶、溶菌酶以及非专一性水解酶如脂肪酶、蛋白酶和其它聚糖酶等。对这些酶的反应作用机理已有较深入的研究^[11]。

2.1 甲壳素酶降解法

自然界中存在于真菌和无脊椎动物的甲壳素的年产量估计高达数十亿吨,它们的降解主要就是由细菌和真菌分泌的甲壳素酶来完成。甲壳素酶(chitinase)在生物体内可随机地降解甲壳素,形成甲壳二糖和少量甲壳三糖。但在体外,因甲壳素的不溶性,难以被甲壳素酶水解。通常将甲壳素在温和的酸处理条件下制成胶体甲壳素,再在 0.2 mol/L Na_2HPO_4 和 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲溶液中,于 36 °C 降解反应一定时间后可得到低聚糖。Chen 等^[12]将来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的甲壳素酶进行固定化,该固定化酶水解胶体甲壳素,通过间歇式沉淀法,酶与底物反应可进行连续化生产。

Aiba^[13]报道了用来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的甲壳素酶 I 水解不同乙酰化度(DA)的壳聚糖,水解产物用乙酸酐酰化,经 HPLC 检测到 DP 为 2~7 的壳寡糖。当底物是 DA 为 10%~30% 的壳聚糖时,主要产物是三聚体、四聚体和五聚体;DA 为 13% 时,壳聚糖的酶解产物经凝胶过滤色谱分离,其中三聚体到六聚体的产量分别为 50.5%、50.9%、39.1% 和 24.5%。因此,用甲壳素酶 I 水解 DA 为 10%~30% 的壳聚糖是一种适合制备高聚合度 N-乙酰甲壳低聚糖的方法。

2.2 壳聚糖酶降解法

壳聚糖酶(chitosanase)主要存在于真菌细胞中,若控制一定的条件,利用壳聚糖酶对壳聚糖大分子进行降解,则可方便地得到 DP 为 2~7 的壳寡糖,甚至单糖。Takiguchi 等^[14]使用芽孢杆菌属 SP. 7-M 株的壳聚糖酶进行降解反应,成功地得到了 DP 为 2~5 的壳寡糖;利用芽孢杆菌属 LCC-1 株得到的壳聚糖酶,在 pH=5.0 下降解壳聚糖 10 h,也获得了平均相对分子质量为 1 500 的壳寡糖^[15]。由此可见,壳聚糖酶在降解壳聚糖制备聚合度比较小的低聚糖时,显示出其优越性。

Shimai 等^[16]介绍了一种连续制备高聚合度低聚糖(DP 为 5~18 糖含量>40%)的工艺。此方法用芽孢杆菌 *Bacillus sp.* PI-7S 壳聚糖酶,使用最大效率的膜过滤酶水解产物,调整膜的效率使过滤液中含有的还原糖(以 D-氨基葡萄糖计)达 100~600 mg/g。滤液干燥后,加入 5~25 倍体积的甲醇,分离得到高质量的低聚糖,再进一步 N-乙酰化,低聚壳聚糖的相对分子质量为 500~2 000,DA 为 50%~100%。此法制备的甲壳低聚糖中五糖含量>92.3%。

为获得高聚合度的甲壳低聚糖,Murakami 等^[17]探讨了不同来源壳聚糖酶的特性,并研究了几种壳聚糖酶的一系列酶学性质。他们最终选择了灰色链霉菌(*S. griseus*) HUT 6037 的培养上清液作为粗酶,在 pH=5.0 醋酸缓冲液中,构建了一个连续反应流动体系,可有效获得大量的高 DP 的甲壳低聚糖。

壳聚糖酶水解壳聚糖并进一步经 N-乙酰化以制备 DP 为 2~6 的 N-乙酰甲壳低聚糖已有报道^[18]。对水解产物进行凝胶色谱层析,从二聚体到六聚体可以简单清楚地分离。使用不同 DA 的壳聚糖,研究 DA 对低聚糖产率的影响,产率以每种低聚糖对壳聚糖的质量分数计。当以 DA=5% 的壳聚糖为底物时,产率相对较低;而 DA>10% 的壳聚糖有较高的产率,主要产物是三糖、四糖和五糖。

Yamashita^[19]研究了壳聚糖的脱乙酰度(DD)对来自芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)的壳聚糖酶生产甲壳低聚糖的影响。不同 DD 的甲壳低聚糖(DP 为 2~10)由脱乙酰化后的壳聚糖制得,随着壳聚糖脱乙酰度的增加,低聚糖的量也增加。在水解反应初期,出现 DP>5 的低聚糖;随着反应的进行,DP<4 的低聚糖增加,说明反应时间是影响壳聚糖制备目标低聚糖的一个关键因素。

Jeon 等^[20]报道使用一个超滤膜反应体系,将来自芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) BN-262 的壳聚糖酶固定化制备低聚壳聚糖,成功地获得了产量超过 80% 的 DP 为 3~6 的低聚壳聚糖,酸可循环利用,降低了成本。Ilyina 等^[21]将链霉菌产的复合酶(含甲壳素酶、壳聚糖酶和 N-乙酰葡萄糖胺酶)固定在大孔交联甲壳素上,对蟹壳聚糖进行 2 步水解:第 1 步在 pH=4.6 时水解成相对分子质量为 $2.2 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^4$ 的低聚物;第 2 步在 pH=6.2 时水解为相对分子质量为 $2 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ 的水溶性壳聚糖。最近 Jeon 等^[22]又报道将酶降解和膜分离相耦合连续生产甲壳低聚糖,即形成一个装有固定化酶的柱反应器和超滤膜反应器的双效反应系统。低聚糖生产有 2 步:(1)壳聚糖粘液在装有壳聚糖酶(来自芽孢杆菌 BN-262)的柱反应器中被部分水解;(2)部分水解的壳聚糖经超滤膜反应器得到低聚糖。并研究了柱反应器中在 3 种不同流速(3.5 和 9 mL/min)下得到的 3 种部分水解壳聚糖产物对膜垢形成的影响。流速 5 mL/min 得到的水解物是减轻膜垢的最适底物。因此,双效反应系统可有效地水解和分离来生产甲壳低聚糖。

Kuroiwa 等^[23]报道用固定化酶控制酶解反应,以来自芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的固定化壳聚糖酶水解壳聚糖,可阻止目标产物的进一步水解,制备高功能活性的甲壳低聚糖。产率受固定化载体表面酶浓度和反应器中溶液的流速影响很大,在最佳反应条件下,五糖和六糖的产率可达 30% 以上。

2.3 溶菌酶降解法

溶菌酶能降解一些微生物的细胞壁、甲壳素和部分 N-乙酰化壳聚糖。溶菌酶有 6 个亚基,在催化反应中,活性部位需要有 N-乙酰化壳聚糖上 N-乙酰基团的结合。溶菌酶对 N-乙酰化壳聚糖的水解能力随着 DA 的增加而提高,但不能催化水解 95% DD 的壳聚糖。由于溶菌酶识别乙酰氨基葡萄糖序列,因此,可以从一定 DA 的壳聚糖获得高聚合度的低聚糖。Yoshida 等^[24]报道,溶菌酶适合于催化 30% DD 的均态甲壳素水解产生高聚合度的低聚糖,而甲壳素酶能最有效水解 70% DA 的均态壳聚糖生成高聚合度的低聚糖。由于溶菌酶水解产物中还原基团的量比甲壳素酶反应产物的高,因此,研究者们认为溶菌酶水解壳聚糖是生产高聚合度低聚糖的有效方法。

溶菌酶在一定条件下可有效地降解壳聚糖,且初始速度很快,反应 10 min 粘度下降百分率(VDP)

即可达55%。若先对壳聚糖溶液进行适当的处理,再由溶菌酶在37℃进行较长时间(6d左右)的降解,则经HPLC分离可得到较高收率的二糖至四糖产物。

2.4 非专一性酶降解法

非专一性酶降解壳聚糖的反应已引起许多研究者的兴趣。据Pantaleone等^[25]、Yalpani等^[26]和Muzzarelli等^[27]报道,有30多种酶对壳聚糖有水解作用,这些酶包括除了上述3种酶外的蛋白酶、脂肪酶和其它糖酶。研究表明,在酶与底物比率较低时,这些商业酶制剂如菠萝蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶和脂肪酶比甲壳素酶和溶菌酶更能有效地催化壳聚糖的水解。

Muzzarelli等^[27]使用麦胚脂肪酶(lipase)对壳聚糖及其衍生物的水解作用进行了研究。麦胚脂肪酶在微酸性条件下能非常有效地使壳聚糖及其衍生物降解,这种酶能在几分钟内快速降低壳聚糖粘度,使壳聚糖分子量降低。Pantaleone等^[25]亦利用来自猪胰腺的脂肪酶(lipase AIE)对壳聚糖进行水解,通过对降解产物的粘度分析可知,在酶与壳聚糖一定比率下,VDP几乎达到100%。

Pantaleone等^[25]研究表明:(1)对较低粘度的壳聚糖溶液,一些聚糖酶(glycanase)对壳聚糖有显著降解作用,其中纤维素酶(cellulase TV、cellulase AP)和果胶酶(pectinase)的VDP可达99%,半纤维素酶(hemicellulase)的VDP为93%,淀粉酶(amylase)和葡聚糖酶(dextranase)的VDP为70%~80%;(2)对较高粘度的壳聚糖溶液,在试验所用38种酶中,VDP在60%~100%的有17种,VDP在20%~60%的有12种,还有9种酶只有轻微的降解作用或完全没有降解作用(VDP为0~15%)。其中仍以聚糖酶的降解效率最高,木瓜蛋白酶(papain)和单宁酶(tannase)也显示了较强的降解能力。Muraki等^[28]进行的研究得到了与Pantaleone相似的结论。Yalpani等^[26]的研究结果是:在一定的酶与底物比率下,半纤维素酶具有比甲壳素酶及溶菌酶更好的降解能力;各种酶降解所适宜的pH值是不同的,纤维素酶为4.5,木瓜蛋白酶为3.0~4.0,半纤维素酶为3.5;各种酶适宜的降解温度亦有差别,一般为30~60℃。

我们近年来对壳聚糖的水解进行了较深入的研究,发现采用以上一些酶组成的复合酶对壳聚糖进行水解,由于某些酶之间存在协同作用,其水解作用比单一酶要强。在采用适当的预处理后,再以复合酶进行水解,可以得到相对分子质量<3000的甲壳低聚糖^[15]。

Zhang等^[29]用纤维素酶、 α -淀粉酶和蛋白酶的复合酶从壳聚糖水解释制备甲壳低聚糖,结果表明,DA为24%的壳聚糖经酶水解和膜分离后可以得到DP为3~10的低聚糖。

Aiba等^[30]用脂酶、纤维素酶和半纤维素酶制剂生产高聚合度的低聚糖。研究发现,当DA为22%的壳聚糖经过一系列反应后,添加甲醇选择沉淀可获得五糖(11%),六糖(69%)和七糖(18%)的混合物(占壳聚糖总量的27.5%)。通过凝胶过滤色谱分离后,纯的六糖和七糖产率分别为17.5%和2.5%。DA为10%~30%的壳聚糖用这些酶水解后,再N-乙酰化反应,用HPLC可以在反应混合物中测到六糖和七糖的产率分别超过20%和10%。因此,认为此法可以制备高产率的高聚合度甲壳低聚糖。

3 葡萄糖基转移法

该法又称酶法合成,是利用低聚合度寡糖在酶的催化下,延长糖链成为较高聚合度的寡糖。具有转糖苷能力且能合成寡糖的酶主要有甲壳素酶和溶菌酶。单纯采用酶解法不易制得DP>6的低聚糖,若采用转糖基反应则是有效方法之一。

Usui等^[31]采用甲壳素酶的糖基转移反应性能制得较好收率有生理活性的甲壳六糖和七糖,从诺卡氏菌属(*Nocardia orientalis*)IFO 12806的培养基滤液中分离得到的甲壳素酶能催化过量的N-乙酰-甲壳四糖或五糖进行转糖基反应。酶催化四糖生成主要产物六糖(21%)和二糖(63%),催化五糖生成七糖(23%)和三糖(59%)。在反应体系中添加硫酸铵能显著增加六糖产量。将100mg四糖溶解在1mL含质量分数为20%硫酸铵的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH=7.0)中,加入来自木霉的甲壳素酶(1u/mL),混合物在60℃下保温48h,随时间延长,溶液开始出现浑浊,最终有沉淀形成。将沉淀物离心收集、溶解,通过Bio-Gel P-4凝胶柱,收集六糖组分,冷冻干燥得24mg。转糖基反应的效率与硫酸铵浓度和温度密切相关。在含有质量分数为20%硫酸铵的体系中六糖的最高产率是不含硫酸铵体系的1.6倍^[31,32]。

Maeda等^[33]研究了溶菌酶转糖基制备甲壳低聚糖。在特定的反应条件下,甲壳低聚糖可用溶菌酶

催化 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖单体转糖基制得。转糖基反应是在较溶菌酶常规水解反应更高的底物浓度和温度条件下进行的,通过薄层色谱(TLC)和 HPLC 分析,发现硫酸铵的浓度对溶菌酶的活力及转糖基反应有影响。当溶液中无硫酸铵时,没有甲壳寡糖被检出;而当加入质量分数为 20% 的硫酸铵时生成了甲壳二糖~四糖。同时,甲醇和乙醇对反应有影响,甲壳二糖~六糖的形成受溶剂的种类、浓度、反应温度的影响,而且仅在体积分数为 75% 的乙醇中和 70 °C 下才有甲壳二糖~六糖检出。

4 物理方法

用于甲壳素/壳聚糖降解的辐射法、超声波法是受到研究最多的 2 种物理方法。

放射性射线照射壳聚糖,使分子产生电离或激发等物理效应,进而产生化学变化,既可使分子间形成化学键——辐射交联,又可导致分子链断裂——辐射降解。日本原子能研究所用 0.01~2 000 kGy 剂量的放射线照射壳聚糖,不论是自然态、固态壳聚糖还是壳聚糖溶液,都可得到包括有甲壳低聚糖的降解产物,该产物与丙三醇和双醋酸酐可构成植物生理调节剂。此外,采用钴 γ -射线法照射天然高分子壳聚糖,辐照 36 h 和 48 h,可制备粘均分子量分别为 4.8×10^4 和 4.61×10^4 的低分子量壳聚糖。李冶等^[34]近年来也对辐射法进行了研究,用放射性钴在大气和真空下照射相对分子质量为 2.74×10^5 的壳聚糖,得到一系列低聚合度壳聚糖。

王伟等^[35]报道用超声波法降解壳聚糖。将壳聚糖溶于稀乙酸后置于超声波发生器中,在 60 °C 下降解,可得到一定量低聚物,且壳聚糖中的一 NH_2 含量不随降解时间变化。近年来董岸杰等^[36]在上述体系中加入一定量亚硝酸钠。但用超声波处理过的壳聚糖溶液的粘度会随存放时间的增加而减小^[37]。日本有专利报道^[38]用超声波处理壳聚糖溶液将高分子量壳聚糖转化为低分子量的壳聚糖或甲壳低聚糖。

5 结 语

甲壳低聚糖的制备因结构不同、用途不同可用相应的不同方法。各种方法都有其不同的特点。化学法简便易行,所用酸或氧化试剂廉价易得,易于实现产业化。但所得降解产物的分子量范围很宽,水解产物的还原端基会发生氧化和降解,副产物多。

酶法降解可特异地、选择性地切断壳聚糖的 β -1,4-糖苷键,降解过程和降解产物的分子量分布容易便利地被控制,易得到所需分子量范围的低聚糖产品,反应专一性强,不会引起结构的破坏。反应可在较温和的条件下进行,降解过程不需要加入大量的反应试剂,副反应少,因而产物的安全性高,但生产周期长。虽然酶法降解优于化学反应,但在选择高活力的酶和低成本的分选纯化方法以适合工业化大规模生产上尚存在一定困难。目前,用微生物生产的甲壳素酶和壳聚糖酶活力偏低,且大多以复杂酶系存在,分离纯化很难,成本较高。非专一性酶水解活力高,价格低廉,易从商业上得到,有应用价值。

糖基转移法是一种新的合成高聚合度低聚糖的方法,此法不仅能调节聚合度,而且还可通过对基质精心设计合成一些特殊结构的低聚糖衍生物。但此法只能用来制备甲壳素低聚糖,而不能制备壳寡糖。

物理方法可使壳聚糖降解,但难以得到相对分子质量 $< 3\,000$ 的甲壳低聚糖。

目前,大多数的制备方法还只是处于实验室研究阶段,要最终实现产业化,还必须在其降解机理、降解效率、降解产物的分离纯化及现有工艺的完善和提高等方面进行更深入的研究,并探索新的经济可行的降解和合成方法。如何提高酶的水解活力、筛选新的酶种、将化学法与酶法相结合、采用化学合成的方法等等,将为甲壳低聚糖的制备提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 WEI Xin-Lin(魏新林),XIA Wen-Shui(夏文水). *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报)[J],2003,19:6 614
- 2 XIA Wen-Shui(夏文水),WU Yan-Nan(吴焱楠). *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报)[J],1996,15:4 297
- 3 XIA Wen-Shui(夏文水),LIU Xia-Zhong(刘夏忠),ZHANG Fan(张帆). *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报)[J],1997,16:429
- 4 Horowitz S,Roseman S,Blumenthal H. *J Am Chem Soc*[J],1957,79:5 046

- 5 Baker S A, Foster A B, Stacey M, *et al.* *J Chem Soc*[J], 1958; 2 218
- 6 Domard A, Cartier N. Chitin and Chitosan[M]. London: Elsevier, 1989: 383
- 7 Vårum K M, Ott y M H, Smidsrød O. *Carbohydr Polym*[J], 2001, **46**: 89
- 8 Defaye J, Gabelle A, Pedersen C, *et al.* *Carbohydr Res*[J], 1994, **261**: 2 267
- 9 JIN Xin-Rong(金鑫荣), CHAI Ping-Hai(柴平海), ZHANG Wen-Qing(张文清). *Progr Chem Ind*(化工进展)[J], 1998: 217
- 10 Chang K L B, Tai K L B, Cheng F H. *J Agric Food Chem*[J], 2001, **49**: 104 845
- 11 XIA Wen-Shui(夏文水), SU Chang(苏畅). *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报)[J], 2002, **21**: 4 434
- 12 Chen J P, Chang K C. *J Chem Technol Biotechnol*[J], 1994, **60**: 133
- 13 Aiba S I. *Chitin World*[J], 1994, **6**: 108
- 14 Takiguchi Y, Shimahara K. *Agric Biol Chem*[J], 1989, **53**: 61 537
- 15 XIA Wen-Shui(夏文水). *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报)[J], 2001, **20**: 5 550
- 16 Shimai Y, Kimoto K, Koga T, *et al.* JP 05 068 580[P], 1993
- 17 Murakami. *Adv Chitin Chitosan*[J], 1991: 2 259
- 18 Aiba S I. *Carbohydr Res*[J], 1994, **265**: 2 323
- 19 Yamashita. *Kichin Kitosan Kenkyu*[J], 1999, **5**: 2 148
- 20 Jeon Y J, Kim S K. *Adv Chitin Sci*[J], 1998, **3**: 198
- 21 Ilyina A V, Tikhonov V E, Albulov A I, *et al.* *Proc Biochem*[J], 2000, **35**: 6 563
- 22 Jeon Y J, Kim S K. *Proc Biochem*[J], 2000, **35**: 6 623
- 23 Kuroiwa T, Ichikawa S, Sato S, *et al.* *Biotech Bioeng*[J], 2003, **84**: 1 121
- 24 Yoshida S, Sato K, Takamori Y. *Kichin Kitosan Kenkyu*[J], 1998, **4**: 2 228
- 25 Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. *Carbohydr Res*[J], 1992, **237**: 325
- 26 Yalpani M, Pantaleone D. *Carbohydr Res*[J], 1994, **256**: 1 159
- 27 Muzzarelli R A A, Xia W S, Marco T. *Enzyme Microbial Technol*[J], 1995, **17**: 541
- 28 Muraki E, Yaku F, Kojima H. *Carbohydr Res*[J], 1993, **239**: 227
- 29 Zhang H, Du Y G, Yu X J. *Carbohydr Res*[J], 1999, **320**: 34 257
- 30 Aiba S I, Muraki E. *Adv Chitin Sci*[J], 1998, **3**: 89
- 31 Usui T, Matsui H, Isobr K. *Carbohydr Res*[J], 1990, **203**: 65
- 32 Nanjo F, Sakai K, Ishikawa M, *et al.* *Agric Biol Chem*[J], 1989, **53**: 82 189
- 33 Maeda. *Sci Eng Rev Doshisha Univ*[J], 1997, **38**: 299
- 34 LI Ye(李冶), LIU Xiao-Fei(刘晓非), YANG Dong-Zhi(杨东芝), *et al.* *Chin J Appl Chem*(应用化学)[J], 2001, **18**: 2 104
- 35 WANG Wei(王伟), QING Wen(秦汶). *Chem Bull*(化学通报)[J], 1989, **9**: 44
- 36 DONG An-Jie(董岸杰), ZHANG Xiao-Li(张晓丽), LI Jun(李军), *et al.* *J Polym Mater Sci Eng*(高分子材料科学与工程)[J], 2002, **18**: 6 187
- 37 Chen R H, Chang J R, Shyur J S. *Carbohydr Res*[J], 1997, **229**: 4 287
- 38 Tsuguhei K, Tatsuaki Y. JP 09 031 105[P], 1997

Research Progress in Preparation of Chitooligosaccharides

XIA Wen-Shui*, WEI Xin-Lin

(School of Food Science & Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract Some methods of preparing chitooligosaccharides, chemical hydrolysis, enzyme hydrolysis, transglycosylation and physical degradation are reviewed in this paper, including their technological specialties and variety of products. The recent developments of research at home and abroad are introduced.

Keywords chitooligosaccharide, chitosan/chitin, preparation, review