

文章编号: 1004 - 7271(2002)04 - 0383 - 05

·综述·

壳寡糖制备研究进展

The development of study on preparation of chito-oligosaccharides

严 钦, 沈月新, 王 愷

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

YAN Qin, SHEN Yue-xin, WANG Zao

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 壳聚糖; 壳寡糖; 降解; 水解

Key words: chitosan; chito-oligosaccharide; depolymerization; hydrolysis

中图分类号: S986.2 文献标识码: A

壳聚糖(chitosan), 为甲壳质(chitin)脱乙酰化处理后的产物, 是天然糖中唯一大量存在的碱性氨基多糖。由于壳聚糖具有特殊的生理活性, 且无毒、可生物降解、生物相容性好, 近年来在化工、环保、食品、医药、化妆品、农业等方面得到越来越广泛的应用。然而, 由于壳聚糖是高分子化合物, 分子量通常在几十万至上百万, 且分子结构紧密, 因而不能溶于水等一些普通溶剂, 难以被吸收利用, 这大大限制了壳聚糖的应用。

壳寡糖(chito-oligosaccharide), 又名葡萄糖胺寡糖(glucosamine oligosaccharide), 是壳聚糖降解以后聚合度为 2~10 的产物, 其水溶性好, 容易被吸收利用, 且生物活性比壳聚糖更强。特别是聚合度为 6 左右的壳寡糖, 更具有许多独特的生理活性和功能性质: 在人体肠道内活化增殖双歧杆菌, 抑制大肠杆菌的生长^[1]; 促进脾脏抗体生成, 抑制肿瘤细胞的生长^[2]; 强化肝脏功能, 防止胃溃疡; 降低血压、血糖、血脂, 吸附胆固醇; 在微酸环境中具有较强的抗菌作用和显著的保湿吸湿能力^[3]; 活化植物细胞, 促进植物快速生长^[4]等。因此, 水溶性的壳寡糖具有极为广泛的应用范围和发展前途。

1 制备方法

随着人们对壳寡糖认识的逐步深入, 各国学者对其的研究也日益展开。特别是进入九十年代以来, 国内外学者对壳寡糖制备方法, 尤其是对具有高生理活性的 5~9 糖的有效制备进行了广泛而深入研究。目前, 对于壳寡糖的制备大体可分为 3 大类: 化学降解法、酶降解法和物理降解法。

1.1 化学法

1.1.1 酸水解法

酸水解法是降解甲壳质和壳聚糖的传统方法。壳聚糖在酸性溶液中是不稳定的, 会发生糖苷键的断裂, 即长链的部分水解, 形成许多聚合度不等的片段。

盐酸水解法: 盐酸是水解壳聚糖的最常用的酸, 一般是用浓盐酸在较高的温度下水解壳聚糖, 降解得到低聚合度的壳寡糖。1958 年, Baker 等^[5]以 KOH(氮气保护)在 170~190℃下反应 95min, 将几丁

质去乙酰化后干燥得到壳聚糖,再以 3.3mol/L 盐酸在 100℃ 反应 32h,将所得到的产物在活性炭 - 硅藻土柱中用乙醇梯度洗脱分离,得到聚合度为 1~7 葡萄糖胺寡糖,然后在甲醇中结晶纯化,得到高纯度的产物。Rupley 等^[6]对浓盐酸水解甲壳素进行了较为系统的研究,研究表明,盐酸浓度越高、温度越高,水解速度也就越快。盐酸水解法制备壳寡糖虽然工艺简单易行,但是较难控制,所得到的寡糖主要为单糖和双糖,4 糖以上的寡糖含量非常低。此外,该方法对环境的污染也相当严重。

Emanuel 等^[7]用氯化氢取代传统的浓盐酸对固态的壳聚糖进行直接降解,通过控制氯化氢气体的用量、反应温度及反应时间来控制反应进程,以制得特定分子量的寡糖。用这种方法降解壳聚糖,对环境的污染大大减少。然而,降解以后的产品聚合度却比较高,寡糖含量很少,且产品的分子量分布宽,均一性差。

磷酸水解法: 鉴于强酸对壳聚糖的降解过于剧烈,有人便提出用较弱的酸来水解壳聚糖以制得较高聚合度的壳寡糖。Makoto 等^[8]对浓磷酸水解壳聚糖作了较为深入的研究,其流程见图 1。最后得到 12.5% 的水溶性组分和 43% 的水不溶性组分,其平均聚合度分别为 7.3 和 16.8,而且所得到的产品分子量分布都比较窄,均一性好。可见,用浓磷酸水解法制备壳寡糖是可行的。但是,其缺点也是相当明显的,该方法反应周期太长,应用于生产有一定的困难,且产率也不够高。

其他酸解法: 用氯化氢降解壳聚糖,能得到较高产量的聚合度为 3~10 糖^[9],但是由于反应后需移走大量的氯化氢,而且反应条件也非常苛刻,所以在实践上比较困难。此外,还有关于乙酸降解法^[5]、过醋酸降解法等报道。

1.1.2 酸-亚硝酸盐降解法

对于亚硝酸盐降解壳聚糖的研究,早在 1919 年,就有人将 $AgNO_2$ 加入到壳聚糖的酸溶液中,发现有低分子量的壳聚糖产生。现在一般使用 $NaNO_2$ 来降解壳聚糖酸溶液,其反应原理如图 2。

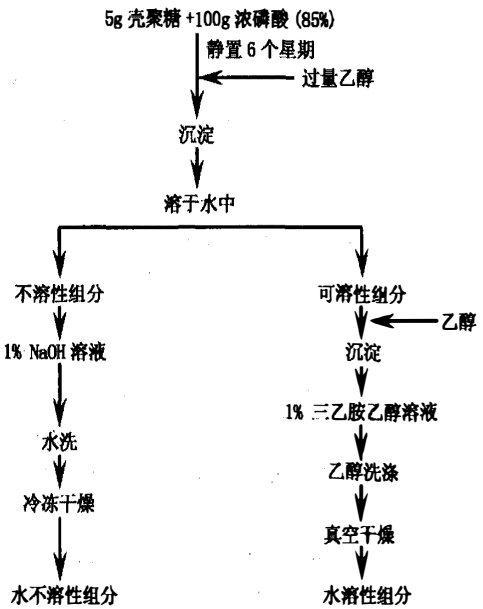


图 1 磷酸水解壳聚糖流程

Fig.1 Scheme for hydrolysis of chitosan in phosphoric acid

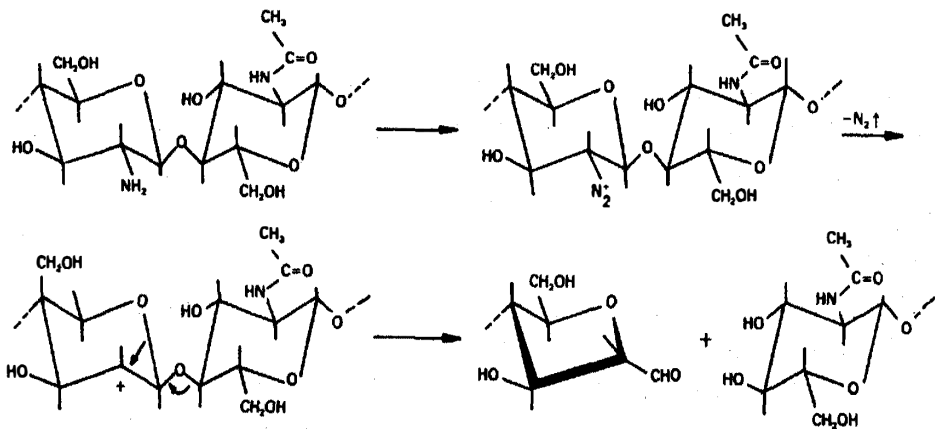


图 2 亚硝酸降解壳聚糖原理

Fig.2 Depolymerization of chitosan with nitrous acid

1977年, Yaku等^[10]将30g壳聚糖溶于2.25L浓度为0.1mol/L的HCl溶液中,再加入100mL浓度为2.5%的NaNO₂溶液,室温下反应15h,分离纯化后得到平均聚合度为9.7、15.9和18.0的3组降解产物,其得率分别为18.9%、9.6%和21.1%。1996年, Seiichi Tokura等^[11]将壳聚糖溶解于10%(w/v)的乙酸溶液中,在搅拌下缓慢滴入浓度为10%的NaNO₂溶液,滴加30min后,继续在4℃下静止10h使反应完全,然后用NaBH₄将端基上的醛基还原成羟基,最后分离得到平均分子量分别为9300和2200两组产物。

亚硝酸降解法相对于酸水解法来说,反应条件温和、速度快、得率可达90%以上^[12],且降解产物的分子量可以通过改变NaNO₂加入量来控制,所以在制备聚合度在5~9的壳寡糖方面是比较有效的。但是用亚硝酸降解壳聚糖时,所得到的产物分子量分布比较宽,有待于进一步改进其制备工艺。此外,在亚硝酸降解过程中,使壳聚糖具有良好生物相容性的氨基也有的一定程度的损失。

1.1.3 氧化降解法

氧化降解法是近年来国内外研究比较多的壳聚糖降解方法。尤其是关于H₂O₂氧化降解壳聚糖的研究,由于该方法具有反应速度快、产率高、反应物无毒等优点,是一种理想的化学降解方法,正受到越来越多的关注。其他的氧化降解法还包括H₂O₂-HClO法、NaBO₃法等。

H₂O₂降解法: H₂O₂降解法近几年在国内研究得比较多,一般是将一定量的壳聚糖溶解在1%或2%的醋酸溶液中,加入一定浓度的H₂O₂溶液进行均相降解反应,然后用NaOH溶液中和,加入过量无水乙醇沉淀,最后分离得到降解产物^[13-15]。这种方法降解壳聚糖速度快、产率高,水溶性产品可达80%以上。但是其降解的产物分子量仍然比较大,一般在3000以上。为降低降解产物的分子量,李邦良等^[16]提出非均相氧化降解法,就是用一定浓度的H₂O₂溶液直接氧化降解壳聚糖干粉,得到的降解产物有很好的水溶性,其中,聚合度在3~7的寡糖占总产物的52%。另外,覃彩芹等^[17]对H₂O₂降解壳聚糖作了较为系统的研究,指出以醋酸为溶解介质、使用较高脱乙酰度的壳聚糖和使用较高浓度的H₂O₂溶液,可以制得高回收率的较低聚合度的壳寡糖。

其他氧化降解法:除了单纯用H₂O₂降解壳聚糖之外,还可以在H₂O₂中混入其他的化学物质以提高降解效率。NaClO本身具有很强的氧化性,在水溶液中电离可以产生ClO⁻,能选择性进攻β-1,4糖苷键,对壳聚糖进行氧化降解。张文清等^[18]用NaClO/H₂O₂混合氧化剂降解壳聚糖,发现NaClO和H₂O₂具有协同氧化效果。相对于单一的氧化剂来说,混合氧化剂降解效率更高,反应转化率可达98%,产物相对分子量为930;而同时,降解过程对降解产物中氨基含量的影响很小。除此之外,制备壳寡糖的其他氧化降解法还包括有H₂O₂-HCl法、NaBO₃^[19]和Cl₂法等。

1.2 酶降解法

酶法制备壳寡糖,就是用特定的酶对壳聚糖进行降解,它可以选择性的切断壳聚糖分子中的β-1,4糖苷键,从而制得特定的寡糖,克服了化学降解产品分子量分布宽、均一性差的缺点,产品均一性好。与化学降解相比,酶降解法不发生副反应,反应条件温和,工艺较易控制,是一种较为理想的降解方法,近年来国内外常有相关研究见诸报道。

酶降解法可分为专一性酶降解法和非专一性酶降解法。

1.2.1 专一性酶降解

专一性酶主要包括壳聚糖酶和溶菌酶。壳聚糖酶(chitosanase)主要存在于细菌、真菌细胞中,它以内切作用方式将壳聚糖分解为聚合度2~8的低聚物,且一般无单糖生成,是一种比较有效的降解方法。Masato和Akira等^[20]从*Bacillus* sp. No. 7-M中分离出壳聚糖酶对99%脱乙酰度的壳聚糖进行降解,经离子交换色谱法分离以后,结果得到较高含量的聚合度2~5的壳寡糖。另外,Haruyoshi等^[21]利用*Bacillus* sp. PI-7S作为壳聚糖酶来源,提取纯化后降解壳聚糖,降解以后的产物中五糖和六糖的含量比较高。有研究表明,壳聚糖酶在降解壳聚糖时,需要有一定的乙酰基协助催化降解,因此在乙酰度不高的情况下,随着脱乙酰度的降低,酶活性越来越高^[22]。但是Haruyoshi等从*Bacillus* sp. PI-7S提取的

壳聚糖酶却显示对高脱乙酰度的壳聚糖具有更高的酶活性。

溶菌酶(Lysozyme)主要存在于鸡蛋蛋白、人的眼泪及唾液中,它同样具有水解 β -1,4糖苷键的能力。Aiba^[23]利用溶菌酶降解部分乙酰化的壳聚糖,得到主要是4糖以下的产物,聚合度高的寡糖难以获得。杜昱光等^[2]用溶菌酶与壳聚糖酶等其他酶分别降解壳聚糖,经过比较发现溶菌酶的降解效率不如壳聚糖酶。

1.2.2 非专一性酶降解

由于壳聚糖与纤维素在结构上有很大的相似性,人们便尝试用纤维素酶来降解壳聚糖。Einosuke等^[24]从 *Trichoderma viride*(绿色木霉)中分离纯化得到纤维素酶,在50℃和pH 5.6的条件下降解壳聚糖,取得良好的效果。降解产物经弱酸性离子交换柱分离,得到较高含量的聚合度6~8的壳寡糖。由此可见,用纤维素酶制备壳寡糖是非常有效的,并且,由于纤维素酶比壳聚糖酶经济便宜的多,因而是一种比较理想的方法。

非专一性酶除纤维素酶之外,还有糖酶、蛋白酶和脂肪酶等多种酶,主要来源于微生物、植物和动物,它们对壳聚糖也有不同程度的降解作用,其催化基团各不一样,其中降解效果较好的有纤维素酶TV、半纤维素酶、脂酶AIE和木瓜蛋白酶^[25,26]。相对于专一性酶,非专一性酶的降解效果较差,因此,降解以后的产物分子量比较大。国内关于用非专一性酶降解壳聚糖方面也有不少报道^[27-29],但大都是仅对降解工艺及其动力学作研究,而对于用其制备壳寡糖的研究比较少,有待于进一步深入研究。

关于非专一性酶催化降解壳聚糖的机理,大多认为是以内切酶的形式作用 β -1,4糖苷键,其具体机理国内外目前研究还不十分清楚。由于专一性酶价格昂贵难以商业化,所以使用非专一性酶(或其混合酶)来制备壳寡糖将是一条极具潜力的途径。

1.3 物理法

对壳聚糖降解,除了上述的化学法和酶法,其他还有一些用物理的方法,如微波法、辐射法和超声波法。其中对超声波降解法的研究比较多。王伟等^[30]将甲壳质脱乙酰化后,溶于乙酸溶液中,在60℃条件下用超声波处理,发现壳聚糖溶液粘度明显下降,而同时降解过程对氨基的含量没有影响。另据Rong等^[31]研究报道,超声波处理壳聚糖,不仅可以降低分子量,而且,可以明显的使其分子量分布变窄。另外,李治等^[32]用 γ 射线分别在大气环境和真空环境下对壳聚糖进行降解,发现当辐射剂量达到250kGy时,壳聚糖分子量可降至2万左右,而且不但没有破坏氨基含量,反而使其含量还略有增加。与化学法和酶法相比较,物理降解法操作简单,可控性好,因此,如果将这些物理方法与其他降解方法结合起来,相信会取得更好的效果。

2 展望

鉴于甲壳质及壳聚糖具有丰富的原料来源和广泛的应用范围,现在国内外对甲壳质及壳聚糖的利用研究已经成为一个巨大的产业。而壳寡糖由于其具有的独特的生理功能,正越来越被人们所重视,对其制备方法的研究报告也越来越多,是甲壳质及壳聚糖产业中一个重要的分支。但是,目前通过降解壳聚糖制备壳寡糖,尤其是聚合度6~8的寡糖的制备大都还处在实验室研究阶段,还没有完全令人满意的方法问世。现阶段,国内对 H_2O_2 降解壳聚糖的研究比较多,但是效果还不甚理想,因此,若能在 H_2O_2 中混入其他的氧化剂,也许会取得更好的效果。酶降解法制备壳寡糖同样受到十分的关注,但由于专一性酶价格昂贵,难以实现商业化。所以,若能寻求一种价格低廉、水解效果好的非专一性酶来替代专一性酶,并进一步优化其水解条件,有望近期内使酶法生产功能性壳寡糖成为可能。可以预见,随着人们对壳聚糖降解机理以及降解条件的进一步深入研究,具有高生理活性的壳寡糖会在不久的将来应用于商业化。

参考文献:

- [1] Kjell M V, Marit W A, Hans G, et al. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins(chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy[J]. Carbohydr Res, 1991,211:17-23.
- [2] 杜昱光,张铭俊,张 虎,等. 海洋寡糖工程药物——壳寡糖制备分离新工艺及其抗癌活性研究[J]. 中国微生物杂志,2001,13(1):5-7.
- [3] 夏文水,吴炎楠. 甲壳低聚糖功能性质[J]. 无锡轻工大学学报,1996,15(4):297-302.
- [4] Domard A. Advances in Chitin and Chitosan[M]. London and New York: Elsevier Applied Science, 1992:387.
- [5] Barker S A, Foster A B, Stacey M, et al. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin[J]. J Chem Soc, 1958:2218.
- [6] Rupley J A. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme[J]. Biochim Biophys Acta, 1964,83:245-255.
- [7] Emmanuel Belamie, Alain Domard, Marie-madeleine Giraud-guille. Study of the solid-state hydrolysis of chitosan in presence of HCl[J]. J Polym Sci Part A: Polym Chem, 1997,35:3181-3191.
- [8] Makoto Hasegawa, Akira Isogai, Fumihiko Onabe. Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid[J]. Carbohydr Polym, 1993,20:279-283.
- [9] Defaye D. Chitin and Chitosan[M]. London: Elsevier Applied Science, 1989:415
- [10] Yaku F, Muraki E, Tsuchiya K, et al. The preparation of glucosamine oligosaccharide and its Cu(II) complex[J]. Cellulose Chem Technol, 1977,11:421-430.
- [11] Kamachi M, Nakamura A. New Macromolecular Architecture and Functions, Proceedings of the OUMS'95 Toyonaka, Osaka, Japan, 2-5 June, 1995[A]. Seichi T, Keisuke U, Satoshi M, et al. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan[C]. Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 1996:199-207.
- [12] 丹沢智弥,浅尾由一,秋久保晚. 水溶性低分子化キトサニの制造方法[P]. JP:62-184002,1987.
- [13] 盛以虞,徐开俊,郑凤妹,等. 壳聚糖在过氧化氢存在下的氧化降解[J]. 中国药科大学学报,1992,23(3):173-176.
- [14] 卢凤琦,曹宗顺,王春香,等. 低分子量壳聚糖的研制[J]. 中国生化药物杂志,1997,18(4):178-179.
- [15] 罗 平,何波兵,黄显俊,等. 水溶性低分子壳聚糖的制备[J]. 化学研究与应用,2000,12(6):677-679.
- [16] 李邦良,高仕瑛,乔新惠,等. 甲壳低聚糖的制备和分析[J]. 中国生化药物杂志,1999,20(6):292-294.
- [17] 覃彩芹,肖 玲,杜予民,等. 过氧化氢氧化降解壳聚糖的可控性研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),2000,46(2):195-198.
- [18] 张文清,柴平海,夏 伟,等. NaClO/H₂O₂ 协同氧化制备壳寡糖[J]. 华东理工大学学报,2000,26(4):425-428.
- [19] Naaji Kubota, Nobuhide Tatsumoto, Takayuki Sano, et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents[J]. Carbohydr Res, 2000,324:268-274.
- [20] Masoto I, Akira O. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan[J]. Agric Biol Chem, 1987,51(4):1189-1191.
- [21] Haruyohi Seino, Koji Tsukuda, Yoshiyuki Shimasue. Properties and action pattern of a chitosanase from bacillus sp.PI-7S[J]. Agric Biol Chem, 1991,55(9):2421-2423.
- [22] Hutadilok N, Mochimasu T. The effect of N-substitution on the hydrolysis of chitosan by an endo-chitosanase[J]. Carbohydr Res,1995,268:143.
- [23] Aiba SI. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates[J]. Carbohydrate Res, 1992,261:297-306.
- [24] Einoeuke Muraki, Fumiko Yaku, Hiroyuki Kojima. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8[J]. Carbohydr Res, 1993, 239:227-237.
- [25] David Pantaleone, Mansur Yalpani, Mark Scollar, Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis[J]. Carbohydrate Research, 1992, 237:325-332.
- [26] Mansur Yalpgni, David Pantaleone. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J]. Carbohydr Res, 1994, 256:159-175.
- [27] 夏文水,Riccardo A, Muzzarelli A. 脂肪酶解聚壳聚糖及其衍生物的研究[J]. 无锡轻工大学学报,1996,15(1):1-5.
- [28] 陈 云,胡 健,赵国骏,等. 胃蛋白酶催化壳聚糖降解的特性研究[J]. 扬州大学学报(自然科学版),2000,3(3):31-34.
- [29] 郑连英. 壳聚糖水解脱的筛选[J]. 材料研究学报,2000,14(2):133-135.
- [30] 王 伟,秦 汶. 脱乙酰基甲壳素的超声波降解[J]. 化学通报,1989(9):44.
- [31] Rong Huei Chen, Jaan Rong Chang, Ju Shi Shyur. Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan[J]. Carbohydr Res, 1997, 299: 287-294.
- [32] 李 治,刘晓非,徐怀玉,等. 壳聚糖的 γ 射线辐射降解研究[J]. 应用化学,2001,18(2):104-107.