

文章编号:1009-038X(2001)05-0550-05

酶法改性壳聚糖的研究进展

夏文水

(江南大学食品学院,江苏无锡 214036)

摘要:壳聚糖经酶法水解生成具有重要生理活性和功能性质的甲壳低聚糖,这已成为近年来甲壳素科学领域中的一个研究热点.本文介绍了水解壳聚糖的几种酶和方法,讨论了这些酶水解产物的生理活性与其结构之间的关系,对甲壳素工业产品深度加工以及开发壳聚糖在食品、医药、农业等方面的应用具有理论指导意义.

关键词:壳聚糖;甲壳低聚糖;酶法改性;生理活性

中图分类号:TS 241

文献标识码:A

Advances in Enzymatic Modification of Chitosan

XIA Wen-shui

(School of Food Science and Technology, Southern Yangze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Chitosan is modified by enzymatic hydrolysis into chitooligosacchrides with some interesting functional properties and physiological activities, which have attracted many researchers in chitin science in recent years. Several hydrolases to chitosan and methods were described and the relationship between physiological activities of enzymatic hydrolysates and their structures was discussed in detail. There is a very significance to development of applications of chitosans in food, pharmaceutical, medical and agricultural industries.

Key words: chitosan; chitooligosacchrude; enzymatic modification; physiological activity

壳聚糖(Chitosan)是由D-氨基葡萄糖通过 β -1,4糖苷键连接起来的生物多糖,是甲壳素(chitin)脱去乙酰基后的衍生物,根据脱去乙酰基的程度不同,分子中游离氨基的含量以脱乙酰度(DD)来表示,通常在75%~95%.由于分子中含有游离氨基,与甲壳素的性质不同,可在酸溶液中溶解,反应活性比甲壳素和纤维素要高.

对壳聚糖进行改性可得到各种各样的衍生物,这些衍生物显示出多方面的功能性质和潜在的应用价值.其中一类重要的反应是水解反应,壳聚糖

降解后生成低聚合度的产物(低聚物),当低聚物为甲壳低聚糖(Chitooligosaccharides)或单糖时,可溶于水,能在人体内被消化吸收,由此可产生许多有益人体健康的生理活性.特别是甲壳低聚糖,近年来报道了其许多重要的生理活性和功能性质.这类改性通常有化学法和酶法.酶法因条件温和、选择性强、易于控制、污染小、产物安全性好,而越来越引起重视和关注.因此,酶法水解壳聚糖制备甲壳低聚糖已成为当今甲壳素领域的一个研究热点^[1,2].

收稿日期:2001-09-19; 修订日期:2001-09-24.

收稿日期:教育部高等学校骨干教师资助计划资助课题.

作者简介:夏文水(1958-),男,江苏高淳人,工学博士,教授,博士生导师.

近年来,随着酶法改性研究的深入和发展,在水解壳聚糖的酶种类和方法、水解产物的生理活性与其结构之间的关系方面都已取得了许多进展,有力地促进了甲壳素的深入研究.国内这方面的报道也正在逐渐增多^[3,4].

1 水解壳聚糖的酶和方法

1.1 壳聚糖酶

壳聚糖最合适的水解酶是壳聚糖酶(Chitosanase),当壳聚糖分子中氨基被乙酰化后,亦可被甲壳素酶和溶菌酶水解.根据壳聚糖酶的作用模型,可分为外切型和内切型两种类型.内切壳聚糖酶以释放二聚体、三聚体或低聚糖为主,外切型则从壳聚糖或甲壳低聚糖的非还原末端产生单糖残基-氨基葡萄糖.不同微生物来源的壳聚糖酶水解不同的底物.*Bacillus* sp 壳聚糖酶主要作用于高 DD 的壳聚糖;*Bacillus* sp 7-M 和 R-4 壳聚糖酶对完全乙酰化的壳聚糖水解释活性最高;*Bacillus circulans* MH-K1 水解 80% DD 壳聚糖;*Bacillus licheniformis* UTK 作用于 65%~80% DD 壳聚糖.相反, *Enterobacter* G-1 壳聚糖酶对 20% 乙酰化度(DA)壳聚糖有最高活性;*Streptomyces* 壳聚糖酶适合于 25%~35% DA 的壳聚糖, *F. solani* 和 *N. orientalis* 壳聚糖酶对 30% DD 壳聚糖作用最好^[2].

壳聚糖酶对壳聚糖降解,产物一般为二至七糖的甲壳低聚糖(壳寡糖).Miyake 利用芽孢杆菌属 LCC-1 壳聚糖酶在 pH 5.0 下水解反应 10 h, 获得平均相对分子质量为 1 500 的低聚糖;Perkins 和 Takiguchi 也报道用壳聚糖酶进行降解反应得到了二至五糖的产物;Shimai 等人用膜过滤酶反应器来水解壳聚糖,可进行连续反应,滤液用甲醇沉淀分离可得到五糖含量 >92.3% 的甲壳低聚糖.若再进行 N-乙酰化,则产物为 N-乙酰化甲壳低聚糖^[5].

Yamashita 研究了壳聚糖的脱乙酰度(DD)对 *Bacillus* sp 壳聚糖酶生产甲壳低聚糖的影响,发现随着 DD 的增加,甲壳低聚糖的得率也增加.在水解反应的初期,产物的聚合度(n) > 5; 反应延长时, n < 4 的低聚糖增加,说明反应时间是控制产物聚合度大小的一个关键因素^[6].

Aiba 也试图用甲壳素酶(Chitinase)水解壳聚糖,然后再 N-乙酰化以制备 N-乙酰化的甲壳低聚糖.他用 *Streptomyces griseus* 甲壳素酶水解 20% DA 的壳聚糖 7 d 时, n 为 3, 4, 5, 6 的产物得率分别是 23.5%, 25.5%, 19.6% 和 12.3%^[7]. 为了获得

高聚合度的甲壳低聚糖, Murakami 等人探讨了几种不同来源的壳聚糖酶的特性,他们最终选择了 *Streptomyces griseus* HUT 6037 的培养上清液作为粗酶,在 pH 5.0 醋酸缓冲液中,构建一个连续酶水解流动体系,可有效地获得大量的高聚合度的甲壳低聚糖^[8].

虽然近 20 年来,已经从微生物中开发了许多种壳聚糖酶和甲壳素酶,但这些酶生产成本昂贵,难以实现商业化应用.另一方面,由这些微生物酶所得到的产物低聚物,其聚合度较低($n \leq 5$).

1.2 溶菌酶

溶菌酶能降解甲壳素和部分 N-乙酰化壳聚糖(DA 12%~60%).在大多数的哺乳动物中,甲壳素的降解主要是由溶菌酶引起的.在人乳和人体血清中也含有丰富的溶菌酶.溶菌酶有 6 个亚基,在催化反应中,活性部位需要有 GlcNAc 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 N-乙酰化度(DA)的增加而提高,但不能催化水解 95% DD 的壳聚糖. Ragnhild 以 DA 4%~6% 的水溶性壳聚糖为底物,研究了鸡蛋白溶菌酶的水解动力学,结果表明:这种溶菌酶-壳聚糖体系遵循米氏方程式;其反应初速度随着 DA 的增加而增加,而含有 34 个或更多乙酰基团的六聚物对反应的初速度影响最大^[8]. Fukunizo 等人报道,人体溶菌酶对(GlcNAc)₅ 中糖苷键的水解速率要比鸡蛋白溶菌酶快 1.2 倍. Aiba 还研究了溶菌酶对具有不同乙酰基分布模型的壳聚糖的水解作用,他用由非均相脱乙酰化反应得到的 10%~30% DA 的壳聚糖(MDC)与具有相同 DA 而由均相脱乙酰化反应得到的壳聚糖(PAC-H)进行比较,结果表明:MDC 水解的初速度大约是 PAC-H 的 4 倍,他认为这主要是由于 MDC 中有连续 3 个以上的 GlcNAc 残基,而 PAC-H 中 N-乙酰基则是随机分布.由于溶菌酶能识别乙酰氨基葡萄糖序列,因此可以从高 DA 的壳聚糖获得高聚合度($n > 5$)甲壳低聚糖^[9].

此外,溶菌酶也有转糖苷活性,可以将 GlcNAc 二聚体的链长增加到六聚体或七聚体. Maeda 等人用溶菌酶在质量分数 20% 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液中,将 GlcNAc 单体转化为 (GlcNAc)₂₋₄,若在质量分数 75% 的乙醇和 70 ℃ 时,可检测出 (GlcNAc)₂₋₆^[10]. Fukunizo 等人报道,人体溶菌酶比鸡蛋白溶菌酶对甲壳低聚糖的转糖苷作用有更高的速率常数.

目前,商业化溶菌酶的生产主要来自于蛋品加工厂,这种酶在酶法制备甲壳低聚糖中将有潜在的应用价值.同时,研究溶菌酶对壳聚糖的水解作用

也将有助于阐明壳聚糖在人体内的消化过程。

1.3 非专一性酶

壳聚糖和纤维素都是由 D-葡萄糖以糖苷键连接聚合形成起来的多糖化合物,由于结构上的相似性,纤维素酶对壳聚糖也应该有相似的降解作用。Pantaleone 等人就纤维素酶和一些其他酶,在一定条件下对不同均分子式量壳聚糖溶液的降解作用的研究证明了这一点。对于较低粘度的壳聚糖溶液,一些聚糖酶(glycanase)对壳聚糖有显著的降解作用,其中纤维素酶 TV、AP 和果胶酶的粘度降低比率(VDP)可达 99%,半纤维素酶的 VDP 为 93%,淀粉酶(amylase)和葡聚糖酶(dextranase)的 VDP 为 70%~80%;对于较高粘度的壳聚糖溶液,在试验所用的 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,木瓜蛋白酶和单宁酶(tannase)也显示了较强的降解能力^[11]。Muraki 等人进行的研究得到了与 Pantaleone 相似的结论。Yalpani 等人的研究结果表明: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℃^[12]。

Aiba 等人研究用低成本的脂酶、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,当使用脂酶、纤维素酶和半纤维素酶制剂时,乙酰化度 22%的壳聚糖(200 mg)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(55 mg)。通过凝胶过滤色谱分离后,纯的六糖和七糖产量分别为 35 mg 和 5 mg。乙酰度 10%~30%的壳聚糖用这些酶水解后,再用乙酸酐进行 N-乙酰化反应,用高效液相层析 HPLC 可以在反应混合物中测到甲壳低聚糖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^[13]。

Muzzarelli 等人用脂肪酶、淀粉酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶对壳聚糖的非专一性活力进行了研究,认为这些酶比甲壳素酶和溶菌酶更加有效地催化壳聚糖的水解^[14]。

作者对非专一性酶水解壳聚糖进行了较深入的研究,发现某些水解壳聚糖的酶类具有协同作用,采用这些酶组成复合酶,其水解作用比单一酶要强。在适当的条件下,用这些酶水解壳聚糖可以

得到相对分子质量低于 3 000 的甲壳低聚糖^[15]。该方法得率高,适合工业化生产。

2 壳聚糖及其低聚糖生理活性与结构间的关系

壳聚糖及其低聚糖生理活性或功能性是与脱乙酰度(DD)和相对分子质量(MW)密切相关的,DD 和 MW 是两个重要的结构参数。近年来,报道的抗菌作用、增强免疫抗肿瘤作用、防感染作用、降胆固醇作用、增加钙吸收的作用等,都有其不同的结构要求^[16]。

2.1 抗菌作用

壳聚糖由于是一种带阳电荷的高分子离子化合物,对真菌和微生物的生长有抑制作用。Hirano 和 Nagao 研究了壳聚糖相对分子质量大小对植物病原体的抑菌作用,结果表明甲壳低聚糖(n 在 2~8)和部分降解的低相对分子质量壳聚糖对 *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi* 和 *Alternaria alternata* 这样的植物病原体的抑制作用比高相对分子质量的壳聚糖要强。Uchida 等人发现较高聚合度的甲壳低聚糖比壳聚糖本身和低聚合度甲壳低聚糖对真菌和细菌的抑制作用更大。

Jeon 和 Kim 报道,在用超滤膜酶反应器生产和分离出的三部分低聚糖中,MW 在 5 000~10 000 的低聚物对所试病原体显示了较强的抗菌活性。Ueno 等人也报道,MW < 2 000 的甲壳低聚糖对细菌生长抑制作用小,而 MW 为 9 300 的低聚糖在很低浓度时几乎完全抑制细菌的生长。作者也曾报道甲壳低聚糖比壳聚糖的抑菌作用强,且随着脱乙酰度的增加而增加。

Muraki 和 Aiba 在甲壳低聚糖中的游离 NH_2 上进行 N-月桂酰化,产物是大约在 50% N-月桂酰化的甲壳低聚糖(n 在 7~8),对大肠杆菌有相当强的抑菌作用,而聚合度小于 7 的 N-月桂酰或未酰化的甲壳低聚糖则抑菌活性小。

2.2 增强免疫抗肿瘤作用

Suzuki 证实甲壳低聚糖通过增加免疫作用而抑制肿瘤细胞生长, n 为 4~7 的甲壳低聚糖(GlcNAc)₄₋₇对 BALB/C 鼠中的腹膜渗出液细胞显示了强烈的吸引效应,而对于完全脱乙酰化的甲壳低聚糖(GlcN)₂₋₆则没有该作用。但若都是六聚体(GlcNAc)₆和(GlcN)₆,则对同种基因和同系鼠类的肉瘤 180 实体肿瘤和 MM46 实体肿瘤,都具有很强的抑制生长作用。Tokoro 等人也报道了同样的结果。这种甲壳低聚糖的抗肿瘤机制可能是通过增加淋

巴因子,随后由溶细胞的 T-细胞增生来产生抗肿瘤效果。Tsukada 等人报道 (GLcNAc)₆ 对鼠的路易斯肺癌有抗转移作用。Suzuki 等人分析了患癌鼠的脾细胞变化,证实甲壳低聚糖的抗肿瘤机制是增强免疫作用,也就是通过加速帮助 T-细胞分化来增加细胞毒素 T-细胞活性,并伴随抑制 T-细胞活性的减少。

2.3 体内细菌感染的防护作用

部分脱乙酰的甲壳素,特别是 70% DD 的甲壳素能促进宿主对 *Escherichia* 大肠杆菌和 Sendai 病毒感染产生非专一性的抵抗。动物试验表明,70% DD 的甲壳素是一种免疫调节剂,会激活豚鼠腹膜的巨噬细胞和中性杀伤细胞,增加抗体生成,提高迟发型超敏反应,增加老鼠的细胞毒性,诱导如间白细胞、增殖因子和干扰素的细胞分裂。Suzuki 等人报道, (GLcNAc)₆ 具有强的抗念珠菌活性。Tokoro 等人发现这种甲壳低聚糖通过提高细胞免疫功能而对单核细胞增多性李斯特菌具有较强的抑制生长作用。

总之, (GLcNAc)₆ 比 (GLcN)₆ 对体内细菌感染的保护作用要强,而 (GLcN)₆ 的抗菌作用则较 (GLcNAc)₆ 强。这说明 N-乙酰葡萄糖胺单元深深地影响和激活免疫系统。

2.4 降胆固醇作用

众所周知,壳聚糖在各种动物试验中具有较大的降胆固醇活性,而壳聚糖经水解后的甲壳低聚糖没有显示降胆固醇活性。Sugano 等人研究了降胆固醇作用和平均相对分子质量之间的关系,证实部分水解产物的相对分子质量在 8 000~20 000,其降低胆固醇的作用比相对分子质量大约 30 万的壳聚糖要大。

2.5 增加钙的体内吸收作用

甲壳低聚糖($n=3\sim7$)能减少粪便钙排泄,增加鼠股骨的骨折力。若对鼠喂服 1%~5% 壳聚糖,与喂食纤维素膳食比较,其放射性钙(⁴⁷Ca)的全身滞留量大大减少,膳食性壳聚糖影响钙在动物体内的

代谢。Deuichi 等人也注意到,喂食老鼠壳聚糖 2 周后,会使钙的吸收和骨钙含量降低。因此,壳聚糖会减少钙的吸收,而甲壳低聚糖却会增加钙和其它矿物质的吸收。

3 前景展望

酶法改性壳聚糖使壳聚糖的理化性质和生理活性都发生了变化,特别是酶水解产物甲壳低聚糖,是一种有广泛应用价值的新兴低聚糖。根据这些水解低聚物的作用,在食品工业可开发降胆固醇或增加钙吸收的保健食品或功能性食品添加剂,如防腐剂、保鲜剂等;在医药领域可将其进一步纯化以用作抗菌消炎和抗癌、抗肿瘤或作为免疫强化剂等药物;在农业上可作为农作物的生物防治剂或植物调理性。据报道,目前日本已将甲壳低聚糖作为功能性食品成分应用于饮料、糖果、糕点等食品中,或直接作为保健食品。美国、欧洲以甲壳低聚糖为成分的保健食品也在逐渐增加。我国这方面的研究正在开展,一些高校和科研机构在甲壳低聚糖保健食品的开发上,以及甲壳低聚糖用于农作物的防病毒和增产方面,都已取得了一些成果。

随着对甲壳低聚糖应用的开发,对酶法生产甲壳低聚糖实现工业化生产提出了迫切的要求。关键的问题就是如何提高壳聚糖酶或甲壳素酶的活力,降低酶法生产的成本,从而开发出商业酶制剂,但由于这方面还存在许多难题,还需有较长的路要走。另一方面,现有一些非专一性酶是商业酶制剂,成本低、来源易得,如果在这类酶的作用机制上进行深入研究,相信将为酶法生产甲壳低聚糖提供一条新途径。

我国近几十年来,甲壳素工业发展很快,甲壳素产量估计近万吨,绝大部分衍生物产品的生产都是采用化学法,主要产品为氨基葡萄糖盐酸盐,而酶法改性只是近几年才开始研究,随着研究的深入和广泛,必将有力地推动我国甲壳素工业的发展。

参考文献:

- [1] MUZZARELLI R A A. Chitin Enzymology, II [M]. European Chitin Society: Lyon and Ancona, 1996.
- [2] YOU-JIN-JEON, SHAHIDI F, KIM SE-KWON. Preparation of chitin and chitosan chitoooligosacchrides and their applications in physiological functional foods[J]. *Food Reviews International*, 2000, 16(2): 159~176.
- [3] 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.
- [4] ZHANG H. Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme[J]. *Carbohydr Res*, 1999, 320(3-4): 257~260.
- [5] SHIMAI. Enzymic preparation of high quality chitosan oligosaccharides[P]. Kokai Tokkyo Koho JP 05068580, 1993-01-01.

- [6] YAMASHITA. Effect of chitosan-deacetylation degree on the production of chitooligosaccharides by *Bacillus sp.* Chitosanase [J]. *Kichin Kitosan Kenkyu*, 1999, 5(2):148~149.
- [7] SEI-ICHI AIBA. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from enzymic hydrolyzates of chitosans[J]. *Chitin World 6th*, 1994:108~111.
- [8] RAGNHILD J NORDTVEIT, KJELL M. Varum & Olav Smidsrod, Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme[J]. *Carbohydr Polym*, 1996, 29:163~107.
- [9] SEI-ICHI AIBA. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 261:297~306.
- [10] MAEDA. Preparation of chitooligosaccharides by transglycosylation using lysozyme[J]. *Sci Engineering Rev Doshisha Univ*, 1997, 38(2):99~105.
- [11] PANTALEONE D, YALPANI M, SCOLLAR M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1992, 237:325~332.
- [12] YALPANI M, PANTALEONE D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 256:159~175.
- [13] SEI-ICHI AIBA, EINOSUKE MURAKI. Preparation of higher N-acetylchitooligosaccharides in high yields[J]. *Advances in Chitin Science*, 1998(3): 89~96.
- [14] MUZZARELLI R A A, XIA WENSHUI. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation[J]. *Enzyme Microbial Technol*, 1995, 17:541~545.
- [15] 夏文水, 张帆, 何新益. 甲壳低聚糖抗菌作用及其在食品保藏中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(4):10~14.
- [16] MURAKAMI. The efficient production high DP chitooligosaccharides by enzymic hydrolysis of chitosan[J]. *Adv Chitin Chitosan*, 1991(2):59~67.

(责任编辑:秦和平)

更名启事

经教育部批准,2001年2月13日,无锡轻工大学、江南学院、无锡教育学院合并组建江南大学。为适应江南大学“211工程”建设和发展重点学科、特色学科的新形势,2002年1月始,《无锡轻工大学学报》拟更名为《食品与生物技术》,更名后仍为自然科学与工程技术融合的专业性学术刊物(双月刊),旨在反映自然科学领域中生物科学与化学的最新研究成果及其在食品工业、发酵工业、粮油工业的应用,内容侧重食品与轻工生物技术。主要发表食品科学与工程、发酵工程、微生物学、粮油科学与工程、环境生物工程、生物化工等学科的科技论文,兼发动物营养与饲料科学专业的科技论文。刊物为全国食品工业类中文核心期刊。欢迎全国各地高等院校相关专业的师生,以及有关科研院所和企业的研究人员、工程技术人员踊跃投稿,积极订阅。

《食品与生物技术》编辑室

2001年9月30日