

甲壳低聚糖的研究近况

THE RESEARCH ON CHITO-OLIGOSACCHARIDE

叶 眉 徐家敏 薛长湖

(青岛海洋大学水产学院食品工程系 266003)

甲壳质是节肢动物如虾、蟹和昆虫等外壳的重要成分,也是一些低等植物如真菌类的重要成分。据估计,自然界中每年甲壳质的生物合成量约为 $10^9 \sim 10^{10}$ t,它是地球上仅次于纤维素的第 2 大类再生有机资源。甲壳质的化学结构为 β -(1,4)-2-乙酰氨基-D-葡萄糖的直链聚合物^[1],其部分或全部脱乙酰基的

产物称为甲壳胺,它们是天然多糖中少见的带正电荷的高分子物质^[2]。随着甲壳质/甲壳胺研究的深入,人们发现甲壳胺/甲壳质的降解产物——甲壳低聚糖,其性质得到改变,具有独特的更具魅力的生理活性和

收稿日期:1998-04-02;修回日期:1998-10-30

1999 年第 2 期

21

功能性质^[1,3]:提高巨噬细胞的吞噬功能;促进脾脏抗体生成;抗肿瘤和抑制肿瘤转移;降低胆固醇和血脂含量;抗血栓、抗凝血、抗菌、保湿;选择性地活化、增殖人体肠道中的双歧杆菌等。而较高聚合度的甲壳低聚糖具有阻碍病原体生长繁殖、促进蛋白质合成、植物细胞活化从而促进植物生长的作用等,显示出甲壳低聚糖在医药、功能食品、化妆品研制等方面有光明的前途。

甲壳低聚糖的获得方法主要有化学降解法、酶降解法和酶合成法。化学降解主要有氧化降解和酸降解,但化学法难控制,产物转化率低,产物分子量低,完全水解时得到葡胺糖单糖,不易得到低聚糖等。酶法则反应条件温和,水解过程和产物分布容易控制而显示其优越性。酶法降解主要有专一性酶和非专一性酶降解。

1 化学酸降解法

1.1 酸降解法^[4,5]

用 HCl, HF 酸降解时,甲壳质/甲壳胺主链上发生水解,β-1,4 糖苷键断裂,即使在稀的弱酸溶液中也缓慢地进行。提高酸的强度、浓度及加热能促使反应快速进行。水解产物可为葡胺糖、葡胺糖的衍生物或各种低分子量的多聚糖,但充分水解时只得到葡胺糖一种产物。延长浸泡时间,可得到低分子量甲壳质/甲壳胺产品,加热条件下又生成聚合度为 2~7 低聚糖。如,用稀酸(2~3 mol/L)、高温(100 ℃)、长时间(20~40 h)水解;或浓酸(10~12 mol/L)、中温(40~60 ℃)、短时(2~4 h)水解,然后用浓氢氧化钠中和,活性炭脱色,用透析、电渗析或凝胶柱层析等方法脱盐,浓缩后用甲醇结晶,得到聚合度在 1~7 的产品,这种方法简便易掌握,但产品的聚合度不好控制。

1.2 氧化降解法

用 HNO₂, H₂O₂ 和亚硝酸盐-酸等试剂将甲壳质/甲壳胺的 β-1,4 糖苷键氧化而断裂,产生低聚物,但有些氧化法会引起反应产物的结构变化^[7,8]。

2 酶降解法

2.1 专一性降解酶

2.1.1 甲壳质酶 主要存在于微生物、植物、昆虫和鱼类等中。甲壳质酶在生物体内可随机地降解甲壳质,生成甲壳二糖及少量甲壳三糖。甲壳质酶有外切酶活和内切酶活,来源不同的甲壳质酶的两酶活力比例不同,甲壳质酶的内切或外切作用方式主要

取决于底物的性质。

已有学者对不同来源的甲壳质酶进行了分离、纯化和鉴定。SHINSHI 将甲壳质酶分为 3 类:一类是碱性蛋白,有氨基末端,含有一个半胱氨酸富集区和高度保留的催化区,主要存在于液泡中;二类是酸性蛋白,无半胱氨酸富集区,有催化区,在催化区域或附近有酪氨酸残基,并影响酶活力;三类为酸性细胞外蛋白,不具有前二者的特性。现已发现与这 3 类不同的第 4 类甲壳质酶。

从真菌和植物病原体中分离制备出甲壳质分解酶,溶于 MCLLVAIN 缓冲液(0.2 mol/L NaH₂PO₄; 0.1 mol/L 柠檬酸)中,30 ℃保温降解,按照产物聚合度控制反应时间,用 10% 的三氯乙酸终止反应。此方法特异性好、条件温和、易控制,有选择的切断特定糖苷键,从而制得特定的低聚糖。这种方法发展速度快、前景好,其主要因素取决于甲壳质酶。现已有商品酶。缺点是不易得到高聚合度的低聚糖(>6)的产品。

最近报道^[8],可利用羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯(AS-L)作载体固定甲壳质酶。用 AS-L 具有随 pH 变化而呈可溶不可溶性之间的变化,固定化甲壳质酶(CH-AS)在 pH 5.2 以上可溶, pH 4.5 以下不可溶。在酶解液中,CH-AS 处于可溶状态;酶解结束后,将 pH 调至 4.5 以下,CH-AS 成为沉淀,分离沉淀使产物与酶分离。这为半连续化生产提供了可能。

2.1.2 甲壳胺酶 主要存在于真菌细胞中。甲壳质酶与甲壳胺酶的主要区别在于作用底物不同,前者作用于甲壳质,后者作用于甲壳质脱乙酰后的产物甲壳胺,并只能作用于可溶性底物。甲壳胺酶的内切作用,随 N-乙酰化度的提高,反应 V_{max} 降低。在非均相反应中,具有一定取代度的 N-乙酰化甲壳胺比甲壳胺易水解,但当脱乙酰化度 < 36% 时,由于不能溶解,而难被水解。甲壳胺酶的 pH 最适为 4.0~6.8,产物为聚合度 2~8 的低聚糖。

2.1.3 溶菌酶^[9] 存在于鸡蛋蛋白、人眼泪及唾液中。能催化一系列的反应,裂解 β-1,4 糖苷键、水合碳正离子中间产物及碳正离子中间产物的转糖苷化反应。其降解甲壳胺的反应动力学、作用机制和脱乙酰度等方面对其活力的影响都已有报道。不同来源的酶的催化反应重点不同。从鸡蛋蛋白中提取的溶菌酶,其转糖苷化反应力要比水解力强;人唾液中的溶菌酶,裂解 β-1,4 糖苷键的能力较强。关于溶菌酶降解甲壳胺的作用机制仍在深入研究,其结果将有助于阐明甲壳胺及其低聚物促进伤口愈合的相关机理。

2.2 非专一性降解酶

由于甲壳质/甲壳胺与纤维素结构的相似性,因此从纤维素酶降解纤维素中得到启迪,对甲壳质/甲壳胺以纤维素酶开始非专一性酶降解的研究。到目前为止,已有各类水解酶有非专一性降解的作用,如糖酶、蛋白酶、脂肪酶^[6]等,主要来源于微生物、动物和植物。现已发现37种酶有降解甲壳胺的作用,较为显著的有:果胶酶、纤维素酶、来源于黑曲霉的脂肪酶AIE、木瓜蛋白酶、无花果酶、菠萝蛋白酶、胃蛋白酶等。这为由甲壳胺生产甲壳低聚糖提供了廉价酶源。

各类酶降解底物的模式不符合酶促反应的原理,一般最终产物分子量在10 kD左右。从电泳结果来看,分子量分布范围较广,降解最适pH为3~5。

YALPANI等研究了纤维素酶TV、半纤维素酶、脂肪酶、木瓜蛋白酶相互联合对甲壳质/甲壳胺酶解,及pH、时间、底物浓度、温度、酶顺序等酶解条件,并与溶菌酶的酶解效果相对比。

MURAKI利用来源于绿色木霉的纤维素酶生产聚合度为5~9的甲壳低聚糖,并得到甲壳低聚糖盐酸盐结晶。

夏文水等进行了由3种酶组成的复合酶降解甲壳胺,制取甲壳低聚糖的研究,取得了较好的效果。非专一性降解酶的降解作用及条件优化,使近期内酶法生产甲壳低聚糖成为可能。但非专一性降解酶的作用机制并不清楚,TERAYAMA等学者提出糖膜型,认为底物链上的羟基对酶解起重要作用,但仍需研究各种非专一性降解酶的降解特点、模式,来揭示它们的降解机制。

3 甲壳低聚糖的酶合成法

酶合成法是一种新技术,TERAYAMA于1993年报道,采用具有糖转移功能的甲壳质合成酶,如放线菌的发酵液中分离纯化到一种甲壳质合成酶,在醋酸

缓冲液中,在高底物浓度条件下催化甲壳质从低聚合度(2~5)向高聚合度(6~7)转化,产品聚合度范围小,目标产品纯度高。

总之,在甲壳低聚糖的研究开发方面,国外走在前面。日本已有分子量10 000~60 000的系列低聚糖。国内,甲壳质/甲壳胺的研究起始于50年代,80年代受到重视,近些年来发展迅速,但甲壳低聚糖方面的研究刚刚开始。我国海岸线长,海洋渔场面积大约 2.8×10^8 ha,海水可养殖面积492 000 ha,海洋渔业资源十分丰富,并且我国淡水养殖业发展也相当迅猛,各种虾(包括龙虾、口虾蛄)、蟹产量有所增加,我国已成为甲壳质类产品的生产大国,年产量约为2 000~3 000 t。总之,我国甲壳质/甲壳胺的资源十分丰富,但甲壳质/甲壳胺工业存在规模小、产品仅限于甲壳质和甲壳胺,一般作为化工、医药等的工业原料,附加值低等缺陷。

甲壳低聚糖具有显著的生理活性和一定的功能性质,研究甲壳低聚糖的生产工艺,可充分有效地利用我国甲壳质/甲壳胺资源,生产附加值高的产品,提高我国甲壳胺/甲壳质工业的技术水平。

参考文献

- 1 夏文水、吴焱楠.中国海洋药物.1997,1:31~35
- 2 曾名勇.中国海洋药物,1995,1:49~53
- 4 曾宪放、陈苏陵、李吉高.中国海洋药物,1995,3:46~51
- 5 陈西广、刘万顺、刘晨光.生物工程进展,1997,3:5~9
- 6 夏文水,Muzzarelli R. A. A. .无锡轻工大学学报,1996,15:1~5
- 7 Allan, G. G. and Peyron, M. . *Carbohydr Res.* , 1995,277: 257~272
- 8 Allan, G. G. and Peyron, M. . *Carbohydr Res.* , 1995,277: 273~282
- 9 Nordtveit, R. J. , Varum, K. M. and Smidsrod O. . *Carbohydrate Polymers*, 1996,29: 163~167