

甘露低聚糖及其衍生物 制备技术研究进展

毛跟年,瞿建波*,李鑫,郭倩

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021)

摘要 综述了近年来国内外有关甘露低聚糖的制备和分离纯化技术,介绍了甘露低聚糖衍生物的制备技术和发展前景,为甘露低聚糖衍生物的进一步研究提供了方向。

关键词 甘露低聚糖,衍生物,制备技术,分离纯化

Research progress in preparation technique of mannose-oligosaccharides and its derivatives

MAO Gen-nian, QU Jian-bo*, LI Xin, GUO Qian

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract The recent domestic and foreign technology of preparation, separation and purification of mannose-oligosaccharides (MOS) were reviewed, the preparation technology and the development of derivatives were introduced, so as to provide suggestions for further study of the derivatives.

Key words mannose-oligosaccharides (MOS); derivative; preparation technology; separation and purification

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)02-0366-04

甘露低聚糖(Mannose-oligosaccharides, MOS)又称甘露寡糖,是唯一能结合肠道中外源性病菌的新型功能性低聚糖,广泛存在于魔芋粉、瓜尔豆胶、田菁胶及多种微生物细胞壁内^[1]。甘露低聚糖除了具有功能性低聚糖的特点外,还具有防治高血脂、抗氧化、增强免疫功能等作用^[2]。近年来,随着人们的生活水平的不断提高,低聚糖越来越受到消费者的青睐,甘露低聚糖作为一种较优秀的新型低聚糖,也将越来越受到人们的关注。

1 甘露低聚糖的特征

1.1 结构特征

由于来源不同,甘露低聚糖在结构上有所差异,现在研究较多的为魔芋甘露低聚糖。魔芋中所含的葡甘聚糖是 β -D葡萄糖与 β -D甘露糖以1:1.6或1:1.7的比例,通过 β -1,4糖苷键联结成的杂多糖^[3]。魔芋葡甘聚糖经 β -甘露聚糖酶作用后的产物为M-G, G-M, G-G, M-M, M-M-M, G-G-M, M-G-M, G-M-M, M-M-M-M, G-M-M-M, G-M-M-G, G-G-M-M, M-M-M-M-M。(其中M

为甘露糖, G为葡萄糖)^[4-5]。

1.2 理化特性

甘露低聚糖属于非还原糖,味微甜,清爽纯正,安全无毒,易溶于水和极性有机溶剂,不溶于乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。其主要有糖浆和糖粉两种存在形式,糖浆为无色或淡黄色液体,糖粉为白色或淡黄色粉末。由甘露低聚糖的分子结构可知,甘露低聚糖分子链中含有乙酰基团和大量的羟基^[6],且其分子中C2、C3、C6位上的-OH均具有较强的反应活性^[7],可方便地对其进行脱乙酰基或酯化、螯合离子化等化学改性处理,依此可制备成具有各种特异功能的衍生物。

2 甘露低聚糖的制备技术

2.1 酶解法

甘露低聚糖可采用 β -甘露聚糖酶酶解甘露聚糖获得。 β -甘露聚糖酶(endo-1,4- β -Mannanase, EC3.2.1.78)能作用甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖,形成低聚糖。许牡丹等^[8]以魔芋精粉为原料,选用黑曲霉 β -甘露聚糖酶制备甘露低聚糖,通过正交实验优化出最佳工艺,在此条件下甘露低聚糖的产率为32.3%。Masahiro Kurakake等^[9]利用从草酸青霉菌株中提取的 β -甘露聚糖酶水解瓜尔豆胶,制得葡甘露低聚糖。在pH为5,温度为60℃的条件下,酶解得到的产物中92%为低聚糖,经电离飞行时间质谱分析,其中大部分低聚

收稿日期 2010-06-12 * 通讯联系人

作者简介 毛跟年(1963-),男,教授,研究方向 药物新材料的制备与应用。

基金项目 陕西省科技厅攻关项目(2007K07-25) 陕西省教育厅科研项目(07JK197)。

糖的聚合度为6~7。吴长菲等^[10]先利用 β -甘露聚糖酶水解魔芋胶得到葡甘露低聚糖粗品,再利用酵母发酵去除可发酵性糖,最终获得纯度为100%的葡甘露低聚糖。

2.2 酸酶结合法

目前制备甘露低聚糖的方法主要是酶解法,但是由于魔芋精粉在水中呈胶体状,粘度大,酶反应底物质量浓度低,难以提高产量。许牡丹等^[11]通过采用先酸解再酶解的方法,对魔芋精粉进行预处理,先降低其粘度,再酶解,进而提高酶解效率,增大产量。并确定最佳工艺为:酸解时间1.5h,酶解温度55℃,HCl浓度0.07mol/L,酸解温度85℃,加酶量6000U/g,底物质量浓度80g/L。陶兴无^[12]利用盐酸和 β -甘露聚糖酶水解魔芋精粉,水解率为20.65%,产品得率为59.54%,多数水解产物分子的大小在三糖以上。

2.3 氧化-酸解法

H_2O_2 具有稳定的漂白效果,反应产物具有无残毒、易处理、成本低、环境污染小等特点。在酸解法降解魔芋葡甘露聚糖时,加入双氧水,可以起到辅助降解作用,同时可增加白度及去除异味。李涛等^[13]在恒温摇床180r/min,温度35℃,pH1.0,加入3.5% H_2O_2 的条件下对魔芋精粉处理3h,产品得率为86.7%;用薄层层析方法分析上清液中含有单糖、双糖和三糖。

2.4 微波-氧化法

黄永春^[14]等研究了在微波辐射下 H_2O_2 对魔芋葡甘露聚糖的降解作用,结果表明,微波能有效促进 H_2O_2 对魔芋葡甘露聚糖的降解,其效果优于微波或 H_2O_2 的单独作用。当魔芋葡甘露聚糖的浓度为2%时,最适的降解条件为:pH3.6, H_2O_2 的浓度为1.8%,微波功率为540W,降解时间为3min。

2.5 辐照酶解法

γ -射线是一种具有高能量、长射程和强穿透力的离子流,可用于高聚物的降解和改性。徐振林等^[15]研究表明,魔芋葡甘露聚糖经⁶⁰Co γ -射线辐照后,用 β -甘露聚糖酶水解葡甘露聚糖,然后用活性炭、离子交换树脂纯化葡甘露低聚糖,最后用凝胶渗透色谱(GPC)和质谱(MS)鉴定产物。结果表明,辐照不仅可以显著地降低魔芋葡甘露聚糖的黏度,还可以在在一定程度上提高其酶解效率。

2.6 超声波降解法

超声作为一种新技术在化学领域中发挥着越来越大的作用,利用超声波对甘露低聚糖进行降解,是一种高效、环保的降解方法。黄永春^[16]等研究了超声波对魔芋葡甘露聚糖的降解作用,研究结果表明,超声波对魔芋葡甘露聚糖有明显的降解作用,降解的最佳条件为超声功率100~150W、超声时间120~150min、降解温度45℃、魔芋葡甘露聚糖浓度0.8~1.0g/mL。

3 甘露低聚糖分离纯化

目前甘露低聚糖的制备方法得到的产物中,除了甘露低聚糖外还含有单双糖和多糖,甘露低聚糖的含量不高,所以必须进行分离纯化。目前主要的纯化方法有柱层析法和膜分离法。

3.1 柱层析法

柱层析又称柱色谱,是通过色谱柱的分离作用而达到纯化的目的。许牡丹等利用硅胶柱层析法^[17]和离子交换柱层析法^[18]对甘露低聚糖进行纯化。利用硅胶柱层析法纯化,在进样量为10mL、柱高为600mm、流速为1mL/min、温度为60℃的条件下得到甘露低聚糖的纯度为71.34%。采用离子交换树脂法分离纯化甘露低聚糖时,在进样量为10mL、柱高为600mm、流速为2mL/min、温度为60℃的条件下制得甘露低聚糖的纯度为68.4%。

3.2 膜分离法

膜分离法不仅能够节约能源,而且具有无污染、高效保留生物活性成分等特点,尤其适用于工业化大生产。史劲松等^[19]对甘露聚糖的水解液进行超滤(截留相对分子质量3000Da)和纳滤(截留相对分子质量300Da)处理,获得的精制滤液中,甘露低聚糖的平均聚合度为2.13。HPLC分析表明,甘露低聚糖中的单糖组分占13.6%,二糖组分占52.0%,三糖以上的组分占34.4%。实验表明,联合应用超滤和纳滤,能够较好地对甘露低聚糖进行精制、脱盐和浓缩,是一种高效、经济的分离纯化方法。

4 甘露低聚糖衍生物的制备

4.1 甘露低聚糖金属络合物

碳水化合物具有广泛的生物功能,而且可以作为配体同大部分金属阳离子进行络合而发挥作用。金属离子与碳水化合物络合作用的研究在生物无机化学研究中占有极为重要的地位,也是配位化学的重点研究科目^[20]。

近年来国内外对补铬(Ⅲ)剂的研究表明^[21],低聚糖铬的配合物作为补铬(Ⅲ)剂不仅具有较好的稳定性和溶出性能,同时释放出铬(Ⅲ)后的配体低聚糖还有助于金属离子的吸收和利用。陈秀敏等^[22]用 β -甘露聚糖酶水解产生的魔芋葡甘露低聚糖与 Cr^{3+} 在强碱性水溶液中络合,制备魔芋葡甘露低聚糖铬络合物。毛跟年等^[23]利用甘露低聚糖与氯化铬进行反应制备MOS铬配合物,得出最佳工艺为:pH12、反应时间2.0h、反应温度为50℃、0.45mol/L氯化铬的加入量为5mL。通过UV和IR分析表明Cr(Ⅲ)与甘露低聚糖的羟基发生了配位反应。

在对补铜剂的研究过程中,低聚糖因本身的特点而受到人们的关注。将铜离子与甘露低聚糖有机结合做为补铜剂,不仅能降低Cu(Ⅱ)的毒性,还有助于铜离子的吸收。毛跟年等^[24]以甘露低聚糖与氯化铜为原料制备MOS铜配合物,得出最佳工艺为:温度54℃、pH6.4、氯化铜量0.0021mol,反应时间108min。通过UV和IR分析表明铜离子结合在甘露低聚糖羟基上。

低聚糖铁配合物作为补铁剂不仅具有合适的配合稳定性,对胃肠道无或甚少刺激作用,而且当其释放铁之后,配体低聚糖具有多方面的生理活性,是对机体有益的成分,可被吸收利用,不会产生毒副作用^[25]。毛跟年等^[26]利用甘露低聚糖与氯化铁进行反应制备MOS铁配合物,经单因素及正交实验,确定出

甘露低聚糖铁配合物的最佳工艺条件: pH9、时间1.5h、氯化铁浓度0.45mol/L、柠檬酸钠浓度0.20mol/L。通过UV和IR分析表明铁配合到了甘露低聚糖的-OH、-C=O上。

4.2 甘露低聚糖硫酸酯化衍生物

硫酸酯化多糖是指含有硫酸基团的天然及半合成的酸性多糖,为聚阴离子化合物。自1987年发现硫酸酯化葡聚糖具有抑制艾滋病病毒HIV活性以来^[27],该类多糖在抗病毒方面的研究十分活跃。

干信等^[28-29]以魔芋精粉为原料,经酶解、羟丙基化和硫酸酯化修饰,制成了水溶性良好的魔芋葡甘露低聚糖硫酸酯化衍生物。甘露低聚糖醛酸双酯化最佳条件:羟丙基化过程:m(甘露低聚糖醛酸)/m(环氧丙烷)=1.00/1.25,恒温30℃,搅拌反应3h。硫酸酯化过程:m(甘露低聚糖醛酸羟丙酯)/m(氯磺酸)=1.0/2.5,恒温68℃,搅拌反应3h。甘露低聚糖醛酸双酯钠对甘露低聚糖醛酸的得率为76.4%。该物质有机硫含量为20%,凝胶色谱显示其相对分子质量为2000~4000Da。红外光谱和¹H核磁共振光谱分析,按低分子肝素质量标准药检及药理实验,确证是一种新型肝素类药物。

4.3 双硫化甘露低聚糖

李庆国等^[30]利用魔芋甘露糖与二硫化碳和二甲胺进行双硫化加成反应制备了双硫化魔芋寡糖素。孙春等^[31]应用酶法降解魔芋甘露聚糖制得魔芋甘露低聚糖,并对其进行双硫化化学改性,制得魔芋寡糖糖DS-VLK杀菌剂。二者都证实双硫化后的魔芋寡糖对魔芋软腐病、山药炭疽病、小麦赤霉病、梨黑斑、棉花黄萎、稻瘟、大白菜软腐病、水稻白叶枯等农作物病害有明显抑制作用,可以较长时间附着于植物表面,具有刺激植物产生植保素和直接抑制微生物的双重作用,并且不会产生抗生素的耐药性,应用广泛,是一种新型广谱生物农药。

5 展望

近年来,随着人们生活水平的提高,对低聚糖的需求也越来越大。甘露低聚糖作为比较优秀的低聚糖,具有提高人体免疫机能、吸附毒素、护肝和软化血管等功效,且可用于各类食品中,如饼干、调味品、蛋糕、饮料等,尤其是酸奶、乳酸菌饮料、碳酸饮料等酸性饮料中,是一种非常理想的保健食品原材料。因此,开发甘露低聚糖保健食品有着非常广阔的市场前景。

甘露低聚糖由于分子中存在乙酰基和大量的羟基,能进行一系列的化学改性,制成各种衍生物,从而极大地丰富了甘露低聚糖的研究内容。通过化学改性提高了甘露低聚糖原有特性,使其具有更佳的作用效果,更重要的是可以制得新的衍生物,开发出更具魅力的新产品。作为一种资源丰富、用途广泛的天然低聚糖,对它的研究才刚刚起步,因此很有必要对其进行更深入、更全面系统的研究。可以预见,对于甘露低聚糖衍生物的研究将会受到越来越多的重视。

参考文献

- [1] 许牡丹,柯蕾.甘露低聚糖的酶法制备与研究进展[J].食品研究与开发,2005,26(4):163-165.
- [2] 陈小兵,丁宏标,乔宇.甘露低聚糖的益生作用、免疫机制与应用技术[J].营养与饲料,2005,32(8):6-8.
- [3] T Yui, K Ogawa, S Sarko. Molecular and crystal structure of konjac glucomannan in the mannan II polymorphic form [J]. Carbohydr Res, 1992, 229(1): 41-45.
- [4] Emis, Fukumoto J, Yamalloto T. Crystallization and some properties of mannanase [J]. Agric Biol Chem, 1972, 36(6): 991-1001.
- [5] Shimahara H, Suzuki H, et al. Isolation and characterization of oligosaccharides from an enzymic hydrolysate of konjac glucomannan [J]. Agric Biol Chem, 1975, 39(2): 293-299.
- [6] Anderson RA, Cheng NZ, Bryden NA. Elevated intakes of supplemental Chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 1997, 46: 1786-1791.
- [7] Katssuraya K, Hatanaka K, et al. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53: 183-189.
- [8] 许牡丹,柯蕾,曾桥.黑曲霉β-甘露聚糖酶水解魔芋粉制备甘露低聚糖的研究[J].西北农业学报,2005,14(6): 115-118.
- [9] Masahiro K, Takuya S, Daisuke M, et al. Production of galacto-manno-oligosaccharides from guar gum by β-mannanase from penicillium oxalicum SO [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 7885-7889.
- [10] 吴长菲,董岩岩,李俊俊,等.魔芋葡甘露低聚糖的酶法制备工艺的初步研究[J].生物技术通报,2010(1): 118-122.
- [11] 许牡丹,汤木红.酸酶结合法制备甘露低聚糖的工艺研究[J].现代食品科技,2008,24(1): 32-34.
- [12] 陶兴无.酸酶结合法水解魔芋葡甘露聚糖工艺研究[J].武汉工业学院学报,2005,24(3): 1-4.
- [13] 李涛,马美湖,邬应龙.氧化-酸解法制备魔芋葡甘露低聚糖的初步研究[J].食品与发酵工业,2005,45(1): 35-39.
- [14] 黄永春,谢清若,何仁,等.微波辅助H₂O₂降解魔芋葡甘露聚糖的研究[J].食品科学,2005,26(8): 197-200.
- [15] 徐振林,孙远明,丁金龙,等.魔芋葡甘露聚糖的辐照降解研究[J].农产品加工,2006(10): 27-29,46.
- [16] 黄永春,谢清若,马月飞,等.超声波降解魔芋葡甘露聚糖的研究[J].食品科技,2006(9): 103-105.
- [17] 许牡丹,汤木红,王小燕.硅胶柱层析法分离纯化甘露低聚糖[J].食品工业科技,2008,29(9): 188-190.
- [18] 许牡丹,姚甲玉,毛跟年,等.离子交换法分离纯化甘露低聚糖[J].食品科技,2008(8): 150-152.
- [19] 史劲松,郭鸿飞,孙达峰,等.半乳甘露寡糖的膜法精制工艺研究[J].中国野生植物资源,2009,28(4): 45-47.
- [20] 王学松,方积年.糖类的金属络合物[J].化学通报,2004(12): 883-889.
- [21] Dvorak R A. Effects of bio-MOS, FOS and carbadox

(下转第372页)

delivery, by ex-vivo somatic cell gene therapy [J]. Mol Med, 1999, 77: 244-249.

[6] Shuiying G, Jiangning C H. Galactoylated low molecular weight chitosan as DAN carrier hepatocyte-targeting [J]. Pharm, 2003, 255 (1): 57-63.

[7] Gumbiner B. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions [J]. Am J Physiol, 1987, 253: C749-C755.

[8] Artursson P, Lindmark T. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. Pharm Res, 1994, 11 (9): 1358-1364.

[9] Kotze AF, Lueben HL. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. J Controlled Release, 1998, 51: 35-43.

[10] Kotze AF, Thanou MM. Enhancement of paracellular drug transport with highly quaternized N-trimethyl chitosan chloride in neutral environments: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. J Pharm Sci, 1999, 88 (2): 253-259.

[11] Kotze AF, Lueben HL. N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. Pharm Res, 1997, 14 (9): 1197-1202.

[12] Thanou M, Florea BL. N-trimethyl chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug buserelin in vitro (Caco-2 cell) and in vivo (rats) [J]. Pharm Res, 2000, 17 (1): 27-32.

[13] Agarwal V, Nazzari S. Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids [J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53 (8): 1313-1318.

[14] 吴正红, 平其能. 壳聚糖及其衍生物包覆的脂质体对胰岛素细胞旁路转运的促进作用 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36 (4): 306-310.

[15] 吴正红, 平其能. 壳聚糖及其衍生物包覆脂质体对胰岛素肠道吸收的影响 [J]. 药学学报, 2005, 40 (7): 618-622.

[16] 王鑫, 母中明, 张新歌, 等. 壳聚糖/乙酰半胱氨酸纳米粒

子的性质及体外释药性 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29 (4): 851-857.

[17] Prego C, García M, Torres D, et al. Transmucosal macromolecular drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 101 (1-3): 151-162.

[18] Takeuchi H, Yamamoto H. Adv Drug Deliv Rev [J], 2001, 47: 39-54.

[19] Guan Xipeng, Quan Daping, Shuai Xintao, et al. Chitosan-graft-poly(α -caprolactone)s: An optimized chemical approach leading to controllable structure and enhanced properties [J]. J Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2007, 45 (12): 2556-2568.

[20] Bernkop Schnürch A. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57: 1569-1582.

[21] Bernkop Schnürch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 57: 9-17.

[22] Krauland A H, Lettner V M, Grabovac V. J Pharm Sci [J], 2006, 95 (11): 2463-2472.

[23] 杨利芳, 薛伟明. 载胰岛素壳聚糖微球口服降血糖作用的研究 [J]. 化学工程, 2008, 36 (1): 71-74.

[24] 张洪, 代文兵. N-三甲基壳聚糖对胰岛素液体栓剂体外性质的影响 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (4): 281-284.

[25] 何文, 代文兵. N-三甲基壳聚糖对胰岛素液体栓剂体外性质的影响 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (16): 1240-1243.

[26] Yu SY, Zhao Y. Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies [J]. Int J Pharm, 2004, 281 (1-2): 11-23.

[27] Illum L, Watts P. Novel chitosan based delivery system for the nasal administration of a LHRH-analogue [J]. STP Pharm Sci, 2004, 10 (1): 89-94.

[28] Thanou M, Verhoef JC. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 50 (1): S91-S101.

[29] 于少云, 郑爱萍. 壳聚糖对胰岛素透过 Caco-2 细胞单层的影响 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15 (6): 436-440.

(上接第 368 页)

performance of pigs days 0-21 postweaning [J]. J Anim Sci, 1998.

[22] 陈秀敏, 傅德贤, 欧阳帆. 魔芋葡甘聚糖铬(Ⅲ)络合物制备及其对小鼠血糖的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24 (1): 1-3.

[23] 毛跟年, 张云丽, 张晓霞, 等. 甘露低聚糖铬(Ⅲ)配合物制备工艺的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34 (2): 250-253.

[24] 毛跟年, 张云丽, 李静. 甘露低聚糖与铜(Ⅱ)配合物制备工艺的研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2008, 26 (6): 88-91.

[25] Bannister WH, Bannister JV, Searle AJ, et al. The reaction of superoxide radicals with metal picolinate complexes [J]. Inorg Chem Acta, 1983, 78: 139-142.

[26] 毛跟年, 汤木红, 凌未霄, 等. 甘露低聚糖铁配合物的制备工艺研究 [J]. 食品科技, 2008 (6): 134-137.

[27] Ito M, Baba M, Sato A, et al. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in vitro [J]. Antiviral Res, 1987, 7 (1): 361-367.

[28] 张迎庆, 干信, 邹群, 等. 魔芋葡甘低聚糖硫酸酯化衍生物的制备及结构分析 [J]. 药物生物技术, 2001, 8 (4): 200-203.

[29] 干信, 张迎庆. 魔芋葡甘低聚糖醛酸双酯钠的合成 [J]. 精细化工, 2002, 19 (2): 105-108.

[30] 李庆国, 干信. 双硫化魔芋寡糖素的合成 [J]. 化学与生物工程, 2008, 25 (10): 57-59.

[31] 孙春来, 干信. 魔芋寡糖 DS-VLK 杀菌剂的研制 [J]. 现代商贸工业, 2004 (4): 44-46.