

超声-微波预处理协同复合酶法制备壳寡糖的工艺优化及其抗氧化活性

贾飞鸿, 江宁, 杨慧晶, 刘钱媛, 孙荣雪, 王成, 纪倩倩, 马艳弘, 王愈

Preparation of Chitosan Oligosaccharide by Pre-ultrasound-microwave Assisted Composite Enzymatic Method and Its Antioxidant

JIA Feihong, JIANG Ning, YANG Huijing, LIU Qianyuan, SUN Rongxue, WANG Cheng, JI Qianqian, MA Yanhong, and WANG Yu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090318>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

南极磷虾壳聚糖、壳寡糖的制备与品质鉴定

Preparation and Quality Identification of Chitosan and Chitooligosaccharide from Antarctic Krill

食品工业科技. 2021, 42(15): 1-8 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100096>

微波强化壳聚糖固相酸降解研究

Study of Microwave Enhanced Solid-state Acid Degradation of Chitosan

食品工业科技. 2021, 42(2): 6-11 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040305>

壳寡糖的制备、纯化及应用研究进展

Research Progress on the Preparation, Purification and Application of Chitooligosaccharides

食品工业科技. 2024, 45(10): 412-422 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070123>

海洋寡糖酶法制备研究进展

Research Progress on Preparation of Marine Oligosaccharides by Enzymatic Method

食品工业科技. 2023, 44(18): 458-467 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100075>

酶法制备透明质酸寡糖及其透皮吸收活性研究

Preparation of Hyaluronic Acid Oligosaccharides by Enzymatic Method and Its Transdermal Absorption Activity

食品工业科技. 2022, 43(6): 77-82 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080002>

壳寡糖涂膜对鲜切苹果的保鲜作用

Effects of Chitosan Oligosaccharide on Preservation of Fresh-cut Apples

食品工业科技. 2019, 40(9): 269-274 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.047>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

贾飞鸿,江宁,杨慧晶,等.超声-微波预处理协同复合酶法制备壳寡糖的工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2024,45(17): 190–199. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090318

JIA Feihong, JIANG Ning, YANG Huijing, et al. Preparation of Chitosan Oligosaccharide by Pre-ultrasound-microwave Assisted Composite Enzymatic Method and Its Antioxidant[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 190–199. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090318

· 工艺技术 ·

超声-微波预处理协同复合酶法制备壳寡糖的工艺优化及其抗氧化活性

贾飞鸿^{1,2},江 宁²,杨慧晶³,刘钱媛²,孙荣雪²,王 成²,纪倩倩²,马艳弘^{1,2,*},王 愈^{1,*}

(1.山西农业大学食品科学与工程学院,山西晋中 030800;

2.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014;

3.淮安生物健康产业创新研发中心,江苏淮安 223001)

摘要:为了实现壳寡糖的高效制备,本研究以壳聚糖为原料,利用超声-微波预处理协同复合酶法制备低聚合度壳寡糖。以还原糖含量为指标,通过响应面设计法优化酶解工艺参数,并评估壳寡糖的抗氧化活性。结果表明: α -淀粉酶和壳聚糖酶1:1的复合酶组合效果最佳。最佳制备工艺参数为:微波功率200 W、超声功率200 W、超声-微波预处理时间5 min、底物浓度1%、pH5.8、温度53.5 °C、复合酶添加量0.24%,在此条件下酶解5.7 h,还原糖含量达到最大值8.10 mg/mL。所制备的壳寡糖为2~6糖,平均分子量为993.5 Da。抗氧化活性结果表明壳寡糖具有较强的自由基清除活性,其对DPPH自由基和ABTS⁺自由基的IC₅₀分别为0.274、0.127 mg/mL,铁离子还原能力在1.5 mg/mL时达到最大值24.56 mmol/L。本实验结果表明超声-微波预处理协同复合酶法在壳寡糖制备方向具有较好的应用前景。

关键词:壳聚糖,超声-微波预处理,酶解,壳寡糖,抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2024)17-0190-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090318

本文网刊:



Preparation of Chitosan Oligosaccharide by Pre-ultrasound-microwave Assisted Composite Enzymatic Method and Its Antioxidant

JIA Feihong^{1,2}, JIANG Ning², YANG Huijing³, LIU Qianyuan², SUN Rongxue², WANG Cheng²,
JI Qianqian², MA Yanhong^{1,2,*}, WANG Yu^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, China;

2. Institute of Agro-products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. Huai'an Bio-Health Industry Innovation Research and Development Center, Huai'an 223001, China)

Abstract: To achieve efficient chitosan oligosaccharide preparation, chitosan oligosaccharide was prepared from chitosan through a pre-ultrasound-microwave assisted composite enzymatic method. The enzymatic hydrolysis process conditions were optimized using reducing sugar content as an indicator based on the response surface design method. In addition, the antioxidant capacity of chitosan oligosaccharide was examined. The results showed that the composite enzymes consisting α -amylase and chitosanase (1:1) possessed superior hydrolysis ability for chitosan than others. The optimum conditions of chitosan oligosaccharide preparation were as follows: A microwave power of 200 W, ultrasonic power of 200 W, 5 min pre-ultrasound-microwave time, 1% substrate concentration, pH5.8, temperature at 53.5 °C, 0.24% composite enzyme additive amount, and 5.7 h enzymatic hydrolysis time. Under these conditions, the reducing sugar content reached the maximum

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 江苏省农科院横向科研项目(0130669012320);江苏省农业科技自主创新项目(CX(23)3056)。

作者简介: 贾飞鸿(1997-),男,硕士,研究方向:功能食品,E-mail:jfh19835147432@163.com。

*通信作者: 马艳弘(1972-),女,博士,研究员,研究方向:生物技术与功能食品,E-mail:ma_yhhy@126.com。

王愈(1968-),男,博士,教授,研究方向:功能食品,E-mail:sxtgwy@126.com。

(8.10 mg/mL). The prepared chitosan oligosaccharide contained 2~6 sugars with average molecular weight of 993.5 Da. The chitosan oligosaccharide had strong free radical scavenging activity, with the IC₅₀ of DPPH and ABTS⁺ free radicals at 0.274 and 0.127 mg/mL, respectively, as well as the ferric reducing power reached the maximum value of 24.56 mmol/L at 1.5 mg/mL. The results show that the ultrasound-microwave pretreatment combined with composite enzymatic method has a good application prospect in the preparation of chitosan oligosaccharide.

Key words: chitosan; pre-ultrasound-microwave; enzymatic method; chitosan oligosaccharide; antioxidant activity

壳聚糖是由氨基葡萄糖和少量乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接形成的天然碱性多糖, 具有抗氧化^[1]、降血糖^[2]、抗炎^[3]、提高免疫力^[4]等多种生物活性。壳聚糖难溶于水和有机溶剂, 只能溶解于酸性溶液中, 使其应用受到一定程度限制^[5]。壳寡糖是壳聚糖的降解产物, 由 2~20 个聚合度寡糖组成, 作为在自然界中唯一含有正电荷的碱性氨基寡糖, 被证实具有很多生物活性, 如抗肿瘤、抑菌、抗氧化、抗肥胖等, 能表现出比壳聚糖更好的水溶性和生物活性^[6], 在食品^[7]、医药^[8~12]、农业^[13~14]等领域都得到了广泛的应用。因此需要加快壳寡糖的产业化制备, 寻求高效、环保的制备方法对于壳寡糖的深入研究和应用具有重要意义。

壳聚糖的降解方法主要分为三种, 化学降解法^[15~16]、物理降解法^[17]、生物酶降解法^[18]。化学降解法主要有酸解法、氧化降解法等, 最早用于降解壳聚糖, 该方法技术要求低, 适合工业化生产。但是化学降解法产率低, 容易破坏其化学结构, 产品的安全性也存在质疑; 物理降解法主要有微波法、超声波法等, 操作简单、反应速度快但是降解效率低且分子量分布范围广, 通常用于辅助降解。与前两种方法相比, 酶解法反应温和, 既绿色高效, 又可有效保持壳寡糖生物活性, 因而是目前主要的壳聚糖降解方式^[19]。单一的水解酶对壳聚糖的水解度有限^[20], 复合酶降解可以将各个酶进行优化组合提高酶解效率^[21]。何新益等^[22]研究由胃蛋白酶、果胶酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶组合而成的复合酶对壳聚糖的降解作用, 结果表明复合酶对壳聚糖具有更高的水解活力且水解产物分子量低于 4000 Da。

超声波和微波辅助提取或制备活性物质可有效缩短时间、降低能耗。李丹丹等^[23]、XU 等^[24]利用单一物理场协同生物酶法制备壳寡糖, 有效缩短了酶解时间、提高生产效率。超声-微波处理法已经广泛应用于食品领域, 张红芳等^[25]通过正交试验优化超声-微波辅助提取庐山石耳多糖的工艺, 具有提取时间短、简便、稳定、重复性好、得率高等特点。而关于壳寡糖的超声-微波预处理协同复合酶法制备技术还未见报道。因此本研究以壳聚糖为原料, 利用超声-微波预处理协同复合酶酶解技术制备低聚合度壳寡糖。通过响应面分析法优化壳寡糖的制备工艺条件, 并采用薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析其聚合度, 评价抗氧化

活性, 为低聚合度壳寡糖的产业化生产及其功能性食品开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖(Mw=200000)、 α -淀粉酶(1500 U/g) 上海吉至生化科技有限公司; 壳寡糖标准品(99.6%, dp3~7) 上海惠诚生物科技有限公司; 壳聚糖酶(10 万 U/g) 上海源叶生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶(10 万 U/g) 南宁庞博生物工程有限公司; 果胶酶(10 万 U/g)、纤维素酶(10 万 U/g) 上海蓝季生物有限公司; D(+)-氨基葡萄糖盐酸盐(99%) 南京中东化玻仪器有限公司; 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂 北京索莱宝科技有限公司; 氨水、抗坏血酸 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 上海易恩化学技术有限公司; 冰醋酸 江苏强盛功能化学股份有限公司; 无水乙酸钠、三吡啶基三嗪(triptyridine triazine, TPTZ) 上海麦克林生化科技有限公司; 正丁醇 天津市科密欧化学试剂有限公司。

XO-SM400 型超声-微波协同反应工作站 南京先欧仪器制造有限公司; UV1600 型紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; 1260 型高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司; FE-28 型 pH 计 梅特勒托利多科技(中国)有限公司; DK-80 型恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司; B11-3 型磁力搅拌器 上海司乐仪器有限公司; H2050R 型高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; XD-52AA 旋转蒸发仪 上海贤德实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 壳寡糖的制备 取 1 g 壳聚糖溶解于 100 mL pH5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液中, 置于超声-微波协同反应工作站处理, 结束后加入 0.24% 复合酶(α -淀粉酶:壳聚糖酶, 比例为 1:1)酶解 5.7 h, 结束后 95 °C 灭酶 10 min、酶解液冷却至室温再调节 pH 至 8, 然后 10000 r/min 离心 10 min, 将上清液置于旋转蒸发仪浓缩至 1/5~1/6 体积, 向浓缩液中加入 3 倍体积的无水乙醇, 在冰箱中静置过夜。8000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 于旋转蒸发仪中浓缩后真空冷冻干燥, 得到壳寡糖^[26]。

1.2.2 适宜生物酶的筛选 壳聚糖溶液经超声-微波预处理后, 分别加入 0.24% 果胶酶、纤维素酶、木瓜

蛋白酶、 α -淀粉酶、壳聚糖酶，在适宜酶解温度和 pH 下(见表 1)，以还原糖含量为指标，考察 5 种酶对壳聚糖酶解效果的影响并对效果较好的两种酶进行组合探究其复合效果。

表 1 生物酶的最适酶解温度及 pH

Table 1 Optimum temperature and pH of the biological enzymes

生物酶种类	最适温度(℃)	最适pH
果胶酶	50	3.5
纤维素酶	50	4.8
木瓜蛋白酶	45	5.5
α -淀粉酶	55	5.8
壳聚糖酶	37	5.8

1.2.3 单因素实验设计 以 α -淀粉酶和壳聚糖酶组成的复合酶为酶制剂，固定微波功率 200 W，超声-微波协同处理温度 50 ℃，壳聚糖浓度 1%，超声功率 200 W，超声-微波预处理时间 5 min，复合酶比例 1:1，酶解温度 50 ℃，pH5.0，复合酶添加量 0.24%，酶解时间 4 h，以还原糖含量为指标，考察复合酶比例(α -淀粉酶:壳聚糖酶, 4:1、3:2、1:1、2:3、1:4)、超声功率(0、50、200、350、500、650 W)、超声-微波预处理时间(0、5、10、15、20、25 min)、酶解温度(45、50、55、60、65、70 ℃)、pH(3.8、4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.2)，复合酶添加量(0.09%、0.12%、0.15%、0.18%、0.21%、0.24%、0.27%)、酶解时间(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h)对壳聚糖溶液酶解效果的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素实验基础上，以酶解温度、复合酶添加量、酶解时间为自变量(X)，设计三因素三水平的 Box-Behnken 试验，以酶解液中的还原糖含量(mg/mL)为响应值(Y)，通过响应面分析法优化壳聚糖酶解工艺。试验因素和水平见表 2。

表 2 响应面试验因素及水平

Table 2 Factors and levels of the response surface test

水平	因素		
	A温度(℃)	B复合酶添加量(%)	C时间(h)
-1	50	0.21	4
0	55	0.24	5
1	60	0.27	6

1.2.5 DNS 法测定还原糖含量 参考李丹丹等^[23]的方法并稍作修改，以 540 nm 处吸光度(Y)为纵坐标，氨基葡萄糖盐酸盐浓度(mg/mL)为横坐标(X)，制作标准曲线。取 1 mL 壳聚糖酶解液，根据标准曲线方程(Y=0.4711X-0.0315, $R^2=0.9985$)计算还原糖含量。

1.2.6 乙酰丙酮法测定壳寡糖分子量 参考罗威等^[27]的方法并稍作修改，以 525 nm 处吸光度(Y)为纵坐标，氨基葡萄糖盐酸盐的浓度(mg/mL)为横坐标(X)，绘制标准曲线(Y=0.0225X+0.0961, $R^2=0.9982$)。

将最优工艺下的壳寡糖配制成 1 mg/mL 的水溶

液，按照标准曲线制作方法，根据方程计算 D-盐酸氨基葡萄糖浓度 c，然后根据公式(1)计算其平均分子量。

$$M = \frac{m \times V \times 215.6}{c \times 1000} \quad \text{式 (1)}$$

式中：M 为平均分子量, Da; m 为样品质量, g; V 为样液体积, mL; c 为对照标准曲线得出的 D-盐酸氨基葡萄糖浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.7 TLC 分析壳聚糖酶解物的组成 将硅胶板 105 ℃ 活化 30 min，以 1 mg/mL 的壳寡糖标准品溶液(壳二糖~壳七糖)为对照，将 1 mg/mL 壳寡糖溶液点于硅胶板，各点间距 1 cm，距底端 1.5 cm，将硅胶板置于预饱和好的层析缸中，展开剂为正丁醇:水:乙酸:氨水(体积比为 10:5:5:1)，上行展开 8 cm，用电吹风吹干展开剂，在硅胶板上喷洒 0.3% 苷三酮显色剂，根据显色结果分析酶解物组成^[28]。

1.2.8 HPLC 检测壳聚糖酶解物的组成 参考朱玉霞等^[26]的方法并稍作修改。色谱条件：色谱柱：HILIC-Z(2.1×100 mm, 2.7 μm)；流动相 A：水+0.3% NH₄OH(20%)，B：乙腈+0.3% NH₄OH(80%)；梯度条件：0~10 min 50% A-50% B、10~15 min 60% A-40% B、15~16 min 20% A-80% B；流速 0.6 mL/min；进样量 1 μL ，蒸发光散射检测器，温度 60 ℃，配制浓度为 5 mg/mL 壳寡糖样品，另配制浓度为 5 mg/mL 壳寡糖标准溶液(dp3~7)，根据其保留时间进行定性分析。

1.2.9 体外抗氧化能力的测定

1.2.9.1 DPPH 自由基清除能力的测定 取 1 mL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mg/mL)的壳寡糖溶液于刻度试管，加入 0.2 mmol/L DPPH 溶液 1 mL，摇匀后避光放置 30 min，取上清液，测定 517 nm 波长处的吸光度^[29]。根据公式(2)计算 DPPH 自由基清除率。以样品浓度为自变量，自由基清除率为因变量作图并进行线性拟合，计算 IC₅₀ 值，其中 IC₅₀ 值定义为清除率为 50% 时所需抗氧化剂的浓度。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中：A₁ 为试验组吸光度；A₂ 为对照组吸光度；A₀ 为空白组吸光度。

1.2.9.2 ABTS⁺自由基清除能力的测定 取 0.2 mL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mg/mL)的壳寡糖溶液并添加 1.8 mL ABTS 工作液，暗环境反应 10 min，测定 734 nm 处吸光度^[30]。根据公式(3)计算 ABTS⁺自由基清除率并计算 IC₅₀ 值。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中：A₁ 为试验组吸光度；A₂ 为对照组吸光度；A₀ 为空白组吸光度。

1.2.9.3 铁离子还原能力的测定 配制 0.3 mol/mL 乙酸盐缓冲液(pH3.5)、10 mmol/L 2,4,6-三吡啶三嗪(2,4,6-tri-2-pyridinyl, TPTZ)、20 mmol/L 氯化铁(体积比, 10:1:1)的铁离子还原(ferric reducing ability of plasma, FRAP)试剂, 以 80 mmol/L FeSO₄为标品, 根据参考文献 [31], 制作标准曲线($y=0.0127x+0.1198, R^2=0.9991$)。

取 0.2 mL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mg/mL)壳寡糖溶液, 添加 1.8 mL FRAP 试剂, 混合均匀后, 37 °C 水浴 10 min, 593 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算 FRAP 值。

1.2.10 验证试验 在单因素与响应面试验结果的基础上, 对水浴酶解、超声协同酶解(超声功率 200 W)、微波协同酶解(微波功率 200 W)、超声-微波预处理协同酶解(超声功率 200 W、微波功率 200 W)四种方法进行对比。

1.3 数据处理

所有实验均重复三次, 通过 Origin 2021 软件进行数据处理, 采用 IBM SPSS Statistics26 进行显著性分析, $P<0.05$ 为显著性差异, 图中用不同小写字母来表示显著性差异。采用 Design-Expert 12 软件对实验数据进行回归和响应面分析。

2 结果与分析

2.1 最适生物酶的筛选

考察不同酶对壳聚糖酶解效率的影响, 如图 1A 所示, 不同生物酶对壳聚糖的降解效果不同。 α -淀粉

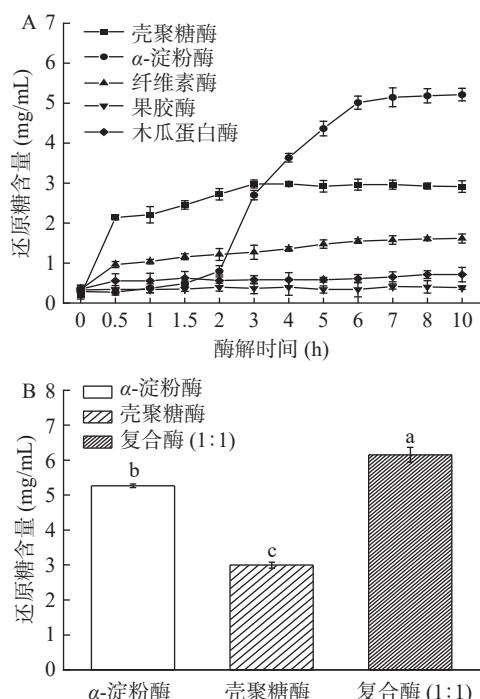


图 1 生物酶的筛选(A)和 α -淀粉酶、壳聚糖酶与复合酶效果对比(B)

Fig.1 Screening of biological enzymes (A) and comparison of the effect of α -amylase, chitosanase and composite enzyme (B)

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$, 图 2~图 8、图 10、图 12 同。

酶、壳聚糖酶对壳聚糖的酶解效果优于纤维素酶、果胶酶和木瓜蛋白酶。壳聚糖酶在酶解 3 h 时, 壳聚糖溶液中还原糖含量达到最高, 3 h 之后趋于平稳。 α -淀粉酶在酶解 6 h 内, 壳聚糖溶液中还原糖浓度随着酶解时间延长而提高, 6 h 之后逐渐趋于平缓。如图 1B 所示, 相同添加量下复合酶(α -淀粉酶与壳聚糖酶质量比为 1:1)的酶解效率比 α -淀粉酶提高 29.26%, 比壳聚糖酶提高 91.57%, 因此确定 α -淀粉酶与壳聚糖酶组成的复合酶为壳聚糖酶解的最适生物酶。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 复合酶比例对还原糖含量的影响 壳聚糖溶液经超声-微波协同处理后, 考察复合酶中 α -淀粉酶和壳聚糖酶两者的比例对还原糖含量的影响。如图 2 所示, 当 α -淀粉酶与壳聚糖酶达到 1:1 时, 还原糖含量达到最大, 显著高于其他比例下的还原糖含量($P<0.05$), 这可能是因为 α -淀粉酶以内切方式随机作用于壳聚糖分子链从而使更多的 β -1,4 糖苷键暴露出来, 增大了糖苷键被结合和催化的概率^[32]。因此选择 α -淀粉酶和壳聚糖酶 1:1 为制备壳寡糖的最适比例。

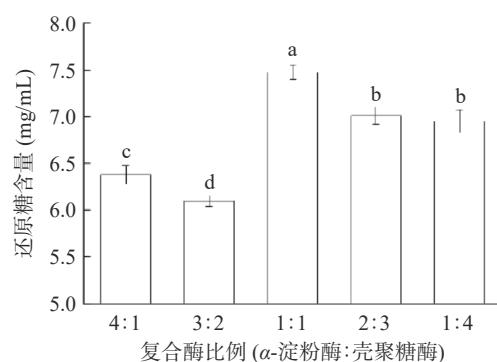


图 2 复合酶比例(α -淀粉酶:壳聚糖酶)对还原糖含量的影响

Fig.2 Effect of composite enzyme ratio (α -amylase:chitosan) on reducing sugar content

2.2.2 超声功率对还原糖含量的影响 超声波的空化效应可以断裂壳聚糖内部的化学键从而促进壳聚糖的降解^[33], 由图 3 可知, 随着超声功率增加, 还原糖含量显著升高($P<0.05$), 到 200 W 时, 还原糖含量

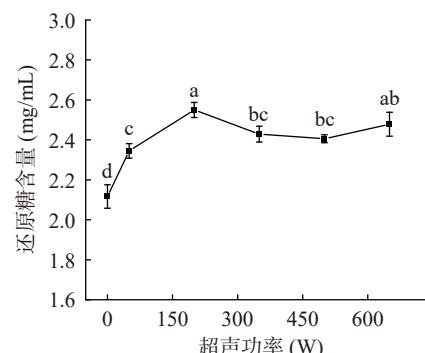


图 3 超声功率对还原糖含量的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on reducing sugar content

达到最大值 7.65 mg/mL, 超过 200 W 后, 还原糖含量降低。这是因为随着超声功率的增加, 空化作用也在不断增强, 壳聚糖胶体溶液由于内部化学键断裂, 壳聚糖分子链断裂, 黏度下降, 同时暴露更多的 β -1,4 糖苷键与酶结合, 从而提高酶解效率, 使还原糖含量升高。但是当超声功率超过 200 W 后, 继续增大超声功率, 连续高强度的超声波容易产生密集空泡, 反而会降低超声波在壳聚糖溶液中的传播以及减弱超声波的活性区域, 空化泡也会过大坍塌而导致空穴效应减弱^[34], 从而降低了酶解效率。

2.2.3 超声-微波预处理时间对还原糖含量的影响 从图 4 可见, 与未超声-微波预处理相比, 超声-微波预处理能显著提高还原糖含量($P<0.05$), 但处理时间超过 5 min 后, 各处理组酶解效果并无显著性差异($P>0.05$), 这是由于在作用初期, 随着超声处理时间的延长, 壳聚糖分子糖苷键断裂、黏度下降, 导致还原糖含量增加, 到 5 min 时还原糖含量达到最大值, 为 7.45 mg/mL。而由于超声所产生的空穴效应只对较大的壳聚糖聚合体起作用, 对较小的聚合体作用并不明显, 超过 5 min 后, 壳聚糖溶液中较大的聚合体减少, 也就不再有更多的糖苷键暴露出来^[35], 从而导致还原糖含量变化不再显著。因此确定 5 min 为适宜的超声-微波预处理时间。

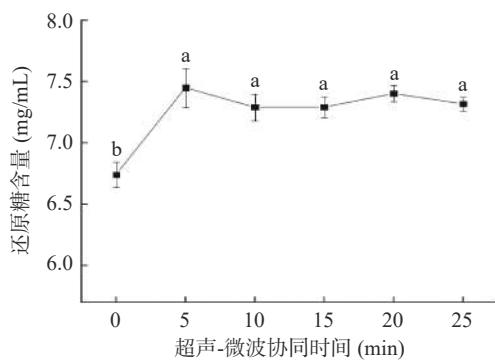


图 4 超声-微波预处理时间对还原糖含量的影响

Fig.4 Effect of pre-ultrasound-microwave time on reducing sugar content

2.2.4 酶解温度对还原糖含量的影响 从图 5 中可见, 在 45~55 °C 范围内还原糖含量随着温度升高而

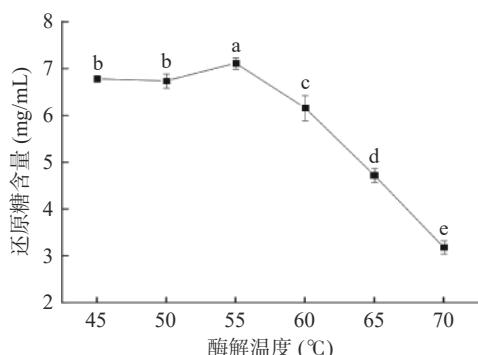


图 5 酶解温度对还原糖含量的影响

Fig.5 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on reducing sugar content

增加, 当温度为 55 °C 时, 还原糖含量达到最大值 7.12 mg/mL, 当超过 55 °C 后, 还原糖含量则随着温度的升高显著降低($P<0.05$)。这是由于适宜的温度有利于增加单位时间内的有效撞击次数, 使酶可以更好地与底物结合, 从而提高酶解效率^[36]。但当温度超过 55 °C 后, 酶活性逐渐变低甚至失活, 酶解速率降低, 进而导致还原糖含量随着温度升高显著降低。因此确定 55 °C 为最佳酶解温度。

2.2.5 pH 对还原糖含量的影响 pH 对还原糖含量的影响表现在两方面: 一是 pH 会影响酶活性中心基团解离, 改变活性中心点位的结构导致酶与底物的结合受限^[37]; 二是 pH 决定了底物氨基的形式是 R-NH₂ 还是 R-NH₃⁺^[38]。

从图 6 中可见, 当 pH 在 3.8~5.8 时, 壳聚糖溶液中还原糖含量随着 pH 的升高而升高。当 pH 为 5.8 时还原糖含量最高, 达 7.39 mg/mL, 当 pH 在 5.4~5.8 时, 还原糖含量变化并不显著($P>0.05$), 这可能是由于复合酶具有较为宽泛的 pH 最适范围, 使复合酶在此 pH 范围能发挥良好的酶解效果; pH 大于 5.8 后, 还原糖含量显著降低($P<0.05$)。这是由于壳聚糖在 pH 6 以上的溶液中氨基开始去质子化并失去正电荷从而导致溶解不充分^[39], 影响了底物浓度, 致使酶解效率低下, 还原糖浓度降低^[40]。因此确定 pH 为 5.8 为最佳酶解 pH。

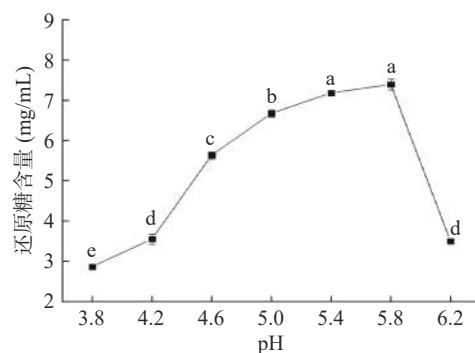


图 6 pH 对还原糖含量的影响

Fig.6 Effect of pH on reducing sugar content

2.2.6 复合酶添加量对还原糖含量的影响 当溶液中底物浓度足够大时, 酶促反应速度与酶添加量呈正比。但当底物浓度一定时, 随着反应进行, 底物浓度不断降低, 此时酶添加量的增加并不会引起还原糖含量升高^[41]。

从图 7 可见, 当酶添加量为 0.09%~0.21% 时, 还原糖含量随着酶添加量的增加而显著增加($P<0.05$), 当加酶量为 0.24% 时, 还原糖含量达到最大, 为 7.12 mg/mL; 当加酶量超过 0.24% 时, 还原糖含量基本保持不变, 因此选择复合酶最佳添加量 0.24%。

2.2.7 酶解时间对还原糖含量的影响 从图 8 可知, 当在 1~5 h 酶解时间范围内, 随着时间的延长, 还原糖的含量显著升高($P<0.05$)。当酶解时间超过 5 h 后, 随着时间的延长, 由于底物含量减少以及部分酶

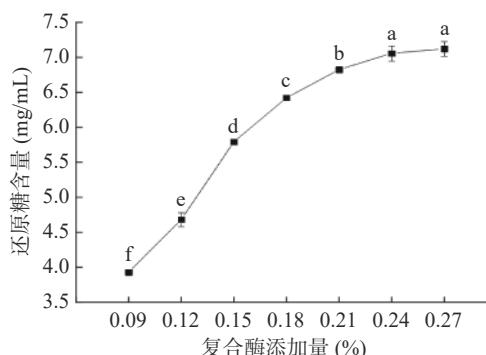


图 7 复合酶添加量对还原糖含量的影响

Fig.7 Effect of composite enzyme addition on reducing sugar content

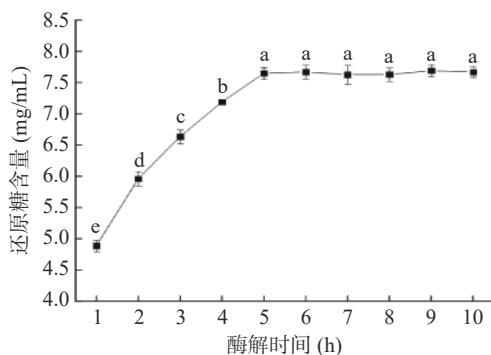


图 8 酶解时间对还原糖含量的影响

Fig.8 Effect of enzymatic hydrolysis time on reducing sugar content

活性降低, 还原糖含量变化无显著性差异($P>0.05$)。因此确定酶解壳聚糖的最佳时间为 5 h。

2.3 响应面法优化壳聚糖酶解工艺

2.3.1 响应面试验结果与方差分析 在单因素实验基础上, 通过 Design-Expert 软件的 Box-Behnken 设计优化壳聚糖酶解工艺。选取对酶解效率影响较大的酶解温度、复合酶添加量和酶解时间为自变量(X), 以还原糖含量(Y)为响应值, 采用三因素三水平的响应面法优化分析, 试验设计与结果见表 3。

通过 Design Expert 统计分析软件对表 3 数据进行多元二次回归拟合, 得到的多元二次回归方程:

$$Y=8.03-0.1100A+0.1550B+0.1900C-0.0325AB+0.0575AC-0.1025BC-0.6228A^2-0.3927B^2-0.0878C^2$$
 Box-Behnken 响应面模型的方差分析结果见表 4。

由表 4 可知, 该模型 $P<0.0001$, 极显著($P<0.01$), 失拟项不显著($P=0.3116>0.05$), 模型决定系数 R^2 为 0.9951, 校正后模型的决定系数 R^2_{adj} 为 0.9888, 变异系数(CV)为 0.6253%, 信噪比为 34.6581, 表明模型与实际操作拟合良好, 试验误差小、可靠性高。在该模型中一次项 A、B、C, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 , 以及交互项 AC、BC 对还原糖含量影响显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 各因素对还原糖含量的影响大小依次为酶解时间(C)>复合酶添加量(B)>酶解温度(A)。

2.3.2 响应面分析与优化 由图 9 可知, 各因素间交

表 3 响应面试验设计与结果
Table 3 Design and results of the response surface test

试验号	酶解温度(℃)	复合酶添加量(%)	酶解时间(h)	还原糖含量(mg/mL)
1	50	0.21	5	6.89
2	60	0.21	5	6.78
3	50	0.27	5	7.31
4	60	0.27	5	7.07
5	50	0.24	4	7.31
6	60	0.24	4	6.93
7	50	0.24	6	7.59
8	60	0.24	6	7.44
9	55	0.21	4	7.13
10	55	0.27	4	7.6
11	55	0.21	6	7.7
12	55	0.27	6	7.76
13	55	0.24	5	8.03
14	55	0.24	5	8.08
15	55	0.24	5	7.97
16	55	0.24	5	8.01
17	55	0.24	5	8.05

表 4 Box-Behnken 响应面模型的方差分析
Table 4 ANOVA for response surface model of Box-Behnken

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	3.120	9	0.3470	157.41	<0.0001	**
A-温度	0.097	1	0.0968	43.91	0.0003	**
B-复合酶添加量	0.192	1	0.1922	87.19	<0.0001	**
C-时间	0.289	1	0.2888	131.02	<0.0001	**
AB	0.004	1	0.0042	1.92	0.2087	
AC	0.013	1	0.0132	6.00	0.0441	*
BC	0.042	1	0.0420	19.07	0.0033	**
A^2	1.630	1	1.63	740.79	<0.0001	**
B^2	0.649	1	0.6495	294.65	<0.0001	**
C^2	0.032	1	0.0324	14.71	0.0064	**
残差	0.015	7	0.0022			
失拟项	0.009	3	0.0029	1.66	0.3116	
误差项	0.007	4	0.0017			
纯误差	3.14	16				

注: **为极显著 $P<0.01$; *为显著 $P<0.05$ 。

互作用对壳聚糖酶解效果有较大影响, 任何两个互作用响应面都存在最高点, 酶解温度(A)与酶解时间(C)、复合酶添加量(B)与酶解时间(C)两因素间的响应面曲面坡度陡峭, 表明其互作用对酶解液中还原糖含量的影响显著。这与模型方程的各项方差分析结果一致。

通过响应面分析法制备壳寡糖的最优酶解工艺条件为: 复配酶添加量 0.2382%、酶解温度 53.54 ℃、酶解时间 5.74 h, 此条件下还原糖含量理论值为 8.08 mg/mL。考虑实际操作的可行性和准确性, 将上述条件修正为: 复合酶添加量 0.24%、酶解温度 53.5 ℃、酶解时间 5.7 h, 此条件下进行 3 次重复性验证实验, 测得还原糖含量为 8.10 mg/mL, 相对标准偏差为 3.89%, 与理论值 8.08 mg/mL 无显著性差异, 说明该模型可用于壳寡糖制备过程中还原糖含量的分析预测。

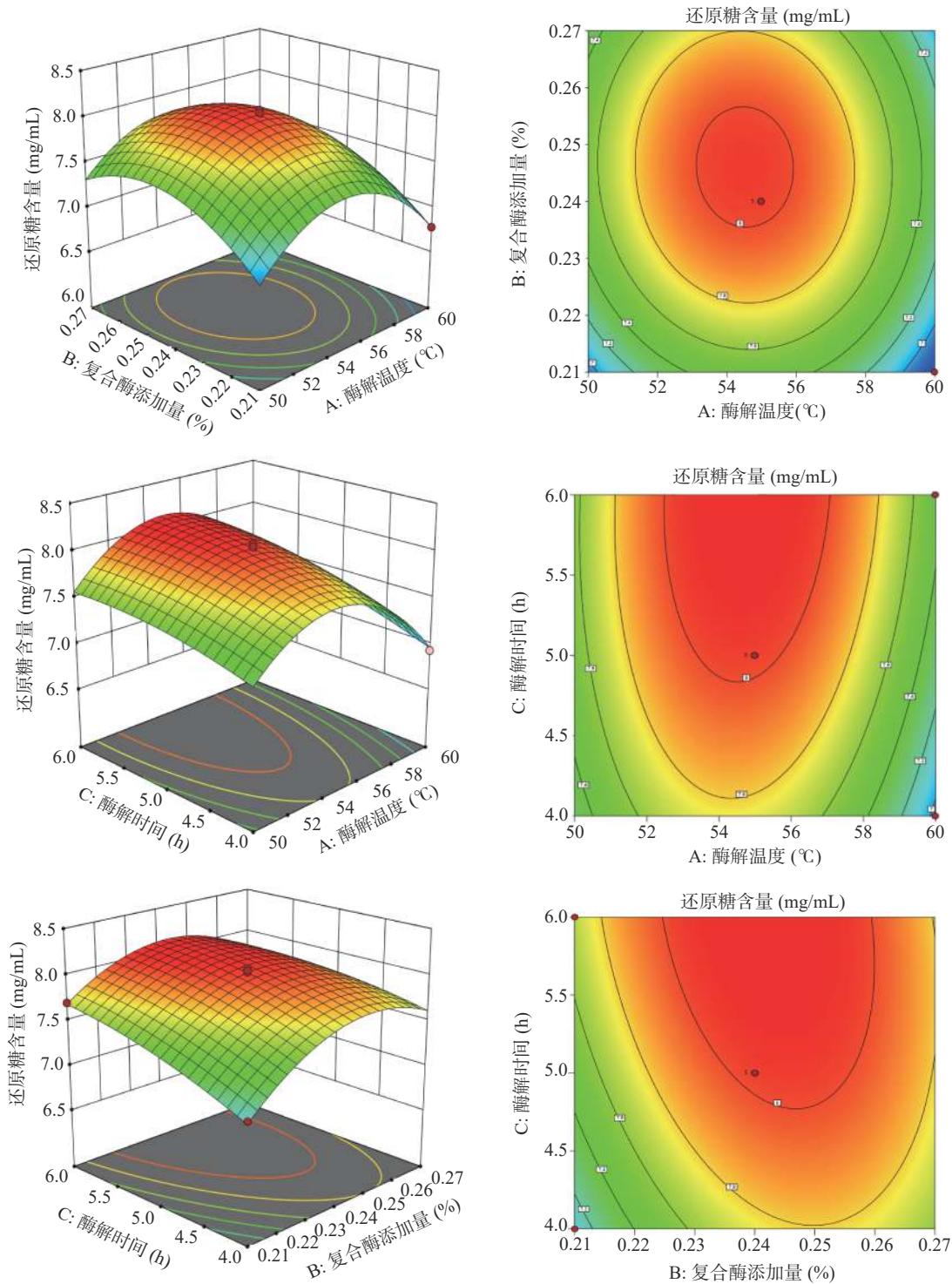


图 9 响应面交互作用和等高线图

Fig.9 Response surface interactions and contour plots

2.4 壳寡糖不同制备工艺比较分析

以还原糖含量为指标, 比较分析壳寡糖不同制备工艺的差异。如图 10 所示, 超声-微波预处理协同复合酶法制备壳寡糖效果最佳, 其酶解液还原糖含量较水浴酶解、超声协同酶解、微波协同酶解分别提高了 27.36%、20.06%、14.99%。因此, 与其他 3 种方法相比, 采用超声-微波预处理协同复合酶解制备壳寡糖具有明显的优越性。

2.5 壳聚糖酶解产物分析

通过 TLC 和 HPLC 分析壳聚糖酶解产物中各

种糖的组分, 由图 11A 可见, 七糖以下的组分在展开体系中可以展开, 比移值适中, 无拖尾现象, 分离效果较好。图 11B 和图 11C 为壳寡糖标准品与样品 HPLC 图, 根据保留时间可知壳聚糖酶解产物中存在的寡糖主要为壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖和壳六糖。即经过超声-微波预处理协同复合酶法制备得到的壳寡糖主要成分为 2~6 糖, 为低聚合度壳寡糖。乙酰丙酮法测定其平均分子量为 993.5 Da。

2.6 壳寡糖体外抗氧化活性

IC_{50} 是评价生物活性物质抗氧化能力的重要指

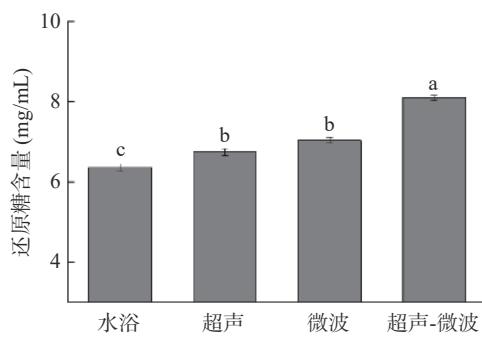


图 10 壳寡糖不同制备工艺比较

Fig.10 Comparison of different preparation processes for chitosan oligosaccharide

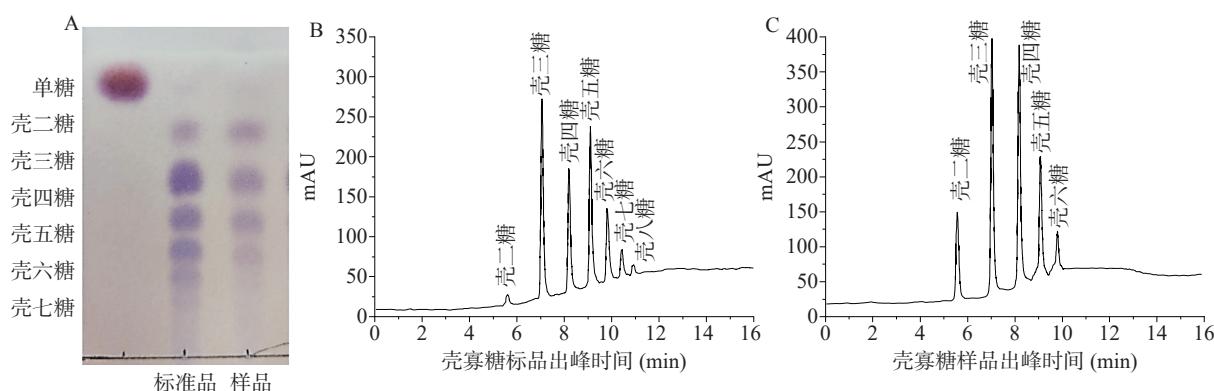


图 11 壳聚糖酶解产物与标准品的 TLC(A)及 HPLC 图(B~C)

Fig.11 TLC (A) and HPLC (B~C) graphs of chitosan enzymatic products and standards

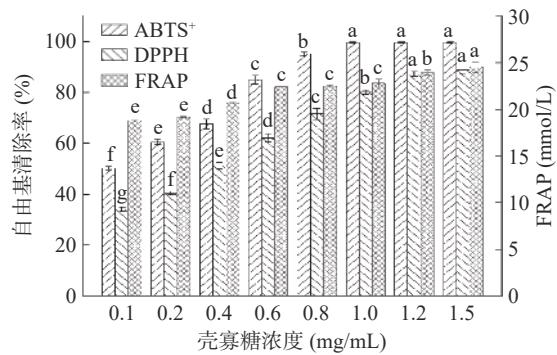


图 12 壳寡糖体外抗氧化活性

Fig.12 *In vitro* antioxidant activity of chitosan oligosaccharide

3 结论

超声波、微波处理技术可有效破碎动植物细胞壁, 加速细胞内溶物的溶出速率、且操作简便、绿色高效, 因而被广泛应用于生物活性物质制备。本研究以壳聚糖为原料, 采用超声-微波预处理协同复合酶法制备低聚壳寡糖, 在单因素实验的基础上, 通过响应面法优化酶解工艺参数, 确定了制备壳寡糖的适宜生物酶为 α -淀粉酶和壳聚糖酶(1:1)组成的复合酶, 最佳工艺参数为微波功率 200 W、超声功率 200 W、超声-微波预处理时间 5 min、底物浓度 1%、pH5.8、温度 53.5 °C、复合酶添加量 0.24%, 在此条件下酶解 5.7 h, 还原糖含量达到最大值, 为 8.10 mg/mL, 与

标, IC_{50} 越低, 表明该物质抗氧化活性越强^[42]。由图 12 可知, 随着壳寡糖浓度的增加, 其 ABTS⁺、DPPH 自由基清除能力以及铁离子还原能力均逐步提高, 当壳寡糖浓度为 1.5 mg/mL 时, 对 ABTS⁺、DPPH 自由基的清除率达 99.73%、88.89%, 其 IC_{50} 分别为 0.127、0.274 mg/mL, 远低于罗威等^[27]制备的壳寡糖产品(COS50)的 IC_{50} 值(0.90 mg/mL)。可能的原因是通过超声-微波预处理协同复合酶处理, 得到的壳寡糖主要为壳三糖、壳四糖、壳五糖等活性较高的寡糖且产物达到了较高抗氧化活性壳寡糖的分子质量^[43~44]。铁离子还原能力在 1.5 mg/mL 时也达到最大值, 为 24.56 mmol/L。证明所制备的壳寡糖具有较高的抗氧化活性。

理论值基本一致。较水浴酶解法、超声辅助酶解法、微波辅助酶解法分别提高了 27.36%、20.06%、14.99%, 缩短了生产时间, 提高了生产效率, 因此有着明显成本优势。所制备壳寡糖的聚合度为 2~6, 平均分子量 993.5 Da。体外抗氧化实验表明此壳寡糖具有较强的抗氧化活性, 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除率分别高达 88.89%、99.73%, 其 IC_{50} 分别为 0.274、0.127 mg/mL。铁离子还原能力在 1.5 mg/mL 时达到最大值为 24.56 mmol/L。本研究可以为大规模生产具有抗氧化活性的低聚壳寡糖提供技术参数。酶解产物作为海洋源产品安全性更高, 可用于解决食品因氧化产生的褐变、哈喇味等问题。可以为壳寡糖的理论研究及实际应用提供指导。考虑到壳寡糖的生物活性与其聚合度密切相关, 因此对于单一聚合度壳寡糖的分离纯化及其功能评价仍需深入研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 郭汉忠, 李永莎, 李永成, 等. 壳寡糖的制备、纯化及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 412~422. [GUO H Z, LI

- Y S, LI Y C, et al. Research progress on the preparation, purification and application of chitooligosaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(10): 412–422.]
- [2] 姜雅杰, 何博韬, 王畅, 等. 壳寡糖复合固体饮料对2型糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的调节作用分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(5): 268–273,327. [JIANG Y J, HE B T, WANG C, et al. Studies on the regulation effects of chitooligosaccharides compound solid beverage on glycolipid metabolism disorder of type 2 diabetes mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(5): 268–273,327.]
- [3] WANG Y, JI X G, ZHAO M Y, et al. Modulation of tryptophan metabolism via AHR-IL22 pathway mediates the alleviation of DSS-induced colitis by chitooligosaccharides with different degrees of polymerization[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 319.
- [4] KANNAN M, KARTHICK D R, RAMU A G, et al. Chitin, chitosan and chitooligosaccharides as potential growth promoters and immunostimulants in aquaculture: A comprehensive review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 251.
- [5] NAVEED M, PHIL L, SOHAIL M, et al. Chitosan oligosaccharide (cos): An overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827–843.
- [6] XUE B, WANG Y H, TIAN J L, et al. Effects of chitooligosaccharide-functionalized graphene oxide on stability, simulated digestion, and antioxidant activity of blueberry anthocyanins [J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130648.
- [7] 郭蔓, 赵华, 张朝正. 壳寡糖的制备及应用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(10): 267–271. [GUO M, ZHAO HUA, ZHANG C Z. Preparation and application of chitosan oligosaccharides[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(10): 267–271.]
- [8] HU G X, LUO F, HAN J, et al. EGCG/HP- β -CD inclusion complexes integrated into PCL/chitosan oligosaccharide nanofiber membranes developed by ELS for fruit packaging[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 144: 108992.
- [9] XIE P W, LIU P. Formulation of DOX-dimer with bi-functionalized chitooligosaccharide for tumor-specific self-boosted drug release and synergistic chemo/chemodynamic therapy[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 320: 121210.
- [10] YIN S L, LIU J, ZHAO X Z, et al. Chitosan oligosaccharide attenuates acute kidney injury and renal interstitial fibrosis induced by ischemia-reperfusion[J]. *Renal Failure*, 2023, 45(1): 2238831.
- [11] ASHWINI K, AWANISH K. Loading and release of insulin from chitosan oligosaccharide biopolymeric patch for oromucosal delivery[J]. *Chemical Papers*, 2023, 78(4): 2687–2693.
- [12] PARDESHI S R, MORE M P, PARDESHI C V, et al. Novel crosslinked nanoparticles of chitosan oligosaccharide and dextran sulfate for ocular administration of dorzolamide against glaucoma[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023, 86: 104719.
- [13] 于宇璇, 李惊霆, 张晴晴, 等. 应用蛋白组学技术研究壳寡糖对水稻幼苗抗寒性能的诱导机理[J]. *质谱学报*, 2023, 44(6): 832–844. [YU Y X, LI J T, ZHANG Q Q, et al. Exploring the induction mechanism of chitosan oligosaccharide on the cold resistance of rice seedlings by proteomic technology[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023, 44(6): 832–844.]
- [14] 刘喆佳, 梁高洋, 张涛, 等. 苹果酸和壳寡糖对奶山羊体外瘤胃发酵特性及甲烷排放的影响[J]. *家畜生态学报*, 2023, 44(6): 32–37. [LIU Z J, LIANG G F, ZHANG T, et al. Effects of malic acid and chitosan oligosaccharides on rumen fermentation characteristics and methane emission of dairy goats *in vitro*[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2023, 44(6): 32–37.]
- [15] WU S J, PAN S K, WANG H B, et al. Preparation of chitooligosaccharides from cicada slough and their antibacterial activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62: 348–351.
- [16] 季者, 蒋霞云, 李小倩, 等. 盐酸法降解壳聚糖制备特定聚合度壳寡糖(DP=5-7)的研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(4): 634–640. [JI Z, JAING X Y, LI X Q, et al. Preparation of pentamer-to-heptamer chitooligosaccharides by hydrochloric acidic degradation of chitosan[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(4): 634–640.]
- [17] 窦勇, 胡佩红. 超声协同CDA酶法制备龙虾壳聚糖[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 127–131. [DOU Y, HU P H. Ultra-sound-assisted CDA enzymatic method for preparation of freshwater crayfish shell chitosan[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(11): 127–131.]
- [18] SAFINA V R, MELENTIEV A I, GALIMZIANOVA N F, et al. Efficiency of chitosan depolymerization by microbial chitinases and chitosanases with respect to the antimicrobial activity of generated chitooligomers[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2021, 57: 626–635.
- [19] 吴健锋, 张立彦. 高浓度壳聚糖溶液酶解条件优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(7): 126–131. [WU J F, ZHANG L Y. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of high concentration solution of chitosan[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(7): 126–131.]
- [20] 丁利君, 周燕芳, 张琳琳. 复合果胶酶法加工番荔枝果汁的工艺及技术参数研究[J]. *食品科学*, 2004(11): 126–131. [DING L J, ZHOU Y F, ZHANG LL. Study on the processing and its technique parameters of custard apple juice with compound pectinase[J]. *Food Science*, 2004(11): 126–131.]
- [21] 阎贺静, 胡志平, 韩晓红, 等. 用于壳聚糖降解的复合酶制剂产生菌的筛选[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(5): 172–176. [YAN H J, HU Z P, HAN X H, et al. Screening of complex enzymes production strain for chitosan degradation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(5): 172–176.]
- [22] 何新益, 夏文水. 复合酶对壳聚糖的降解作用研究[J]. *食品与机械*, 2007(3): 32–35. [HE X Y, XIA W S. Studies on enzymatic hydrolysis of chitosan[J]. *Food & Machinery*, 2007(3): 32–35.]
- [23] 李丹丹, 马英, 柏韵, 等. 响应面法优化微波辅助果胶酶制备壳寡糖的工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 146–150. [MA D D, MA Y, BAI Y, et al. Optimization of microwave assisted enzymatic preparation process of chitooligosaccharides by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 146–150.]
- [24] XU X Y, DENG G F, LI X, et al. Extraction, structural, and antioxidant properties of oligosaccharides hydrolyzed from panax notoginseng by ultrasonic-assisted fenton degradation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4506.
- [25] 张红芳, 吴次虎, 陈晔. 超声-微波协同提取庐山石耳多糖条件优化及其功能活性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38,(21): 229–232. [ZHANG H F, WU C H, CHEN Y. Study on the functional activity and optimization of ultrasonic microwave assisted extraction technology of polysaccharides from *Umbilicaria esculenta*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38,(21): 229–232.]
- [26] 朱玉霞, 李恒, 陈列欢, 等. 低聚合度壳寡糖制备及其组分的色谱行为分析[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(15): 281–283,288. [ZHU Y X, LI H, CHEN L H, et al. Preparation and the chromatographic behavior analysis of low-molecular-weight chitosan[J]. *Food Industrial Technology*, 2013, 34(15): 281–283,288.]

- graphic behavior analysis of low degree polymerization of chitooligosaccharides components[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(15): 281–283,288.]
- [27] 罗威, 黄晓月, 钟萍, 等. 不同分子质量虾源壳寡糖的抗菌抗氧化活性差异研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(24): 193–197.]
- [LUO W, HUANG X Y, ZHONG P, et al. Study on the antibacterial and antioxidant activities of shrimp-derived chitosan oligosaccharides with different molecular weights[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(24): 193–197.]
- [28] 杨国宁, 陈列欢, 曾毅伟, 等. 壳寡糖和壳聚糖酶水解特性的薄层色谱分析[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(2): 23–27.]
- [YANG G N, CHEN L H, ZENG Y W, et al. Characterization of chitooligosaccharides and chitosan hydrolysates with thin layer chromatography[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2013, 43(2): 23–27.]
- [29] 李鹏, 马剑, 张宏志, 等. 超高压辅助提取桑葚花色苷及其抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(2): 109–115.]
- [LI P, MA J, ZHANG H Z, et al. Study on ultra-high pressure-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and its antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(2): 109–115.]
- [30] JENSON G, DAVID E, SHARON P, et al. Evaluation of antioxidant capacity (abts and cuprac) and total phenolic content (folin-ciocalteu) assays of selected fruit, vegetables, and spices[J]. *International Journal of Food Science*, 2022, 2022: 2581470.
- [31] 马剑, 路高勇, 陈智玲, 等. 复合酶法制备杨梅汁工艺优化及品质分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(7): 82–88.]
- [MA J, LU G Y, CHEN Z L, et al. Optimization of enzymatic preparation technology for bayberry juice production[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(7): 82–88.]
- [32] 谢华飞, 张翠荣, 贾振宇, 等. 低聚壳聚糖的复合酶法制备研究[J]. *化学试剂*, 2012, 34(2): 125–128,136.]
- [XIE H F, ZHANG C R, JIA Z Y, et al. Study on the preparation of oligomeric chitosan by complex enzyme method[J]. *Chemical Reagents*, 2012, 34(2): 125–128,136.]
- [33] 张峰, 殷佳敏, 丁丽娟. 超声波辅助降解壳聚糖的研究[J]. *高分子材料科学与工程*, 2004(1): 221–223.]
- [ZHANG F, YIN J M, DING L J. Study on the degradation of chitosan with H_2O_2 under the ultrasonic[J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2004(1): 221–223.]
- [34] 张丽芬. 果胶多糖超声波定向降解途径及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.]
- [ZHANG L F. The study on path and mechanism of orientation degradation of pectin polysaccharide with ultrasound[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.]
- [35] 陈加敏. 酶浓度和底物浓度对酶活性影响因素的教学探讨[J]. *生物学教学*, 2020, 45(9): 78–80.]
- [CHEN J M. Teaching and discussion on the influencing factors of enzyme concentration and substrate concentration on enzyme activity[J]. *Biology Teaching*, 2020, 45(9): 78–80.]
- [36] 吴淑华, 张皓浩, 范玉艳, 等. 酶水解豌豆纤维粉制备低聚糖工艺优化[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 287–294.]
- [WU S H, ZHANG Z H, FAN Y Y, et al. Optimization of preparation of oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of pea fiber powder[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 287–294.]
- [37] 孙竹萍, 张莉力, 王玉田. 副干酪乳酸菌 L1 产淀粉酶条件优化及温度、pH 对淀粉酶活力的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(1): 144–149.]
- [SUN Z P, ZHANG L L, WANG Y T. Amylase from *Lactobacillus paracasei* L1: Optimization of its fermentation condition and reaction temperature and pH[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(1): 144–149.]
- [38] 蔡广志, 王欣龙, 韩鸣啸, 等. 木瓜蛋白酶-双氧水制备低分子量壳聚糖[J]. *中国酿造*, 2012, 31(2): 150–152.]
- [CAI G Z, WANG X L, HAN M X, et al. Preparation of low molecular weight chitosans by papain- H_2O_2 [J]. *China Brewing*, 2012, 31(2): 150–152.]
- [39] 杨俊杰, 胡广敏, 相恒学, 等. 壳聚糖的溶解行为及其纤维研究进展[J]. *中国材料进展*, 2014, 33(11): 641–648,689.]
- [YANG J J, HU G M, XIANG H X, et al. Progress in the research of chitosan dissolution behavior and its fibers[J]. *Progress in Chinese Materials Sciences*, 2014, 33(11): 641–648,689.]
- [40] 胡瑞. 酶解法制备特定重均分子量及窄分布壳寡糖的工艺研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.]
- [HU R. Study on production process of chitosan oligosaccharides with specific weight-average and narrow MWD by enzymatic hydrolysis[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2012.]
- [41] 罗兰心, 姜青, 李翔, 等. 生物酶法提取铁观音茶梗中茶多酚工艺技术研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(24): 79–85.]
- [LUO L X, JAING Q, LI X, et al. Study on technique of compound enzyme extraction of tea polyphenols from tieguanyin tea stalks[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(24): 79–85.]
- [42] BOATH A S, STEWART D, MCDOUGALL G J. Berry components inhibit alpha-glucosidase *in vitro*: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 929–936.
- [43] 黄晓月, 毕思远, 区家豪, 等. 木瓜蛋白酶法制备抗氧化活性壳寡糖的工艺优化[J]. *生物学杂志*, 2022, 39(1): 104–109.]
- [HUANG X Y, BI S Y, QU J H, et al. Process optimization of preparation of antioxidant chitooligosaccharides by papain[J]. *Journal of Biology*, 2022, 39(1): 104–109.]
- [44] 刘瑶, 钟志梅, 赵智宏. 低聚壳寡糖(DP=6-8)的制备及其体外抗氧化活性研究[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 44(1): 87–92.]
- [LIU Y, ZHONG Z M, ZHAO Z H. Preparation of chito-oligosaccharides (DP=6-8) and its antioxidant activities *in vitro*[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2023, 44(1): 87–92.]