

文章编号: 1674-5566(2013)04-0634-07

盐酸法降解壳聚糖制备特定聚合度壳寡糖(DP=5-7)的研究

季 者^{1,2}, 蒋霞云^{1,2}, 李小倩¹, 李源林¹, 陈舜胜^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海市水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘 要: 将壳聚糖置于不同盐酸浓度的反应体系中进行降解反应, 制备得到不同聚合度的壳寡糖混合物; 采用凝胶过滤法分离混合物, 旨在获得特定聚合度(DP=5-6)的壳寡糖。实验表明: 在不同温度(40℃、60℃、80℃)和不同盐酸浓度(6 mol/L、9 mol/L、11 mol/L)下, 壳聚糖均能被有效的降解; 不同降解液中各种聚合度壳寡糖组成不一; 其中, 在9 mol/L 盐酸和60℃的反应条件下, 降解液中壳五糖和壳六糖含量最高, 达到16.2%。采用以葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 为介质的层析法, 实现了对降解液中壳低聚糖混合物的初步分离, 获得主要含壳五糖和壳六糖的组分。该组分经高效液相色谱法鉴定, 除预期的壳五糖和壳六糖外, 还含有另一未知化合物。通过¹³C 和¹H 核磁共振分析, 并结合专一性壳聚糖酶的酶解实验, 对其进行表征和鉴定, 结果表明: 该化合物为聚合度为7的壳七糖。

研究亮点: 采用盐酸法水解壳聚糖, 以期制备壳寡糖, 通过凝胶过滤法分离得到特定聚合度的壳寡糖(DP=5-7); 首次结合核磁共振技术和壳聚糖酶酶解实验, 鉴定了壳七糖, 为稍高聚合度壳寡糖的分离及鉴定提供了参考。

关键词: 壳聚糖; 壳寡糖; 酸水解; 聚合度

中图分类号: S 968.1

文献标志码: A

壳聚糖, 学名为聚氨基葡萄糖, 是自然界最丰富的三大天然多糖之一。目前商品化的壳聚糖主要来源于虾蟹壳^[1-3]。由于壳聚糖的分子量大、聚合度高, 仅溶解于少数酸性溶液体系, 在很大程度上限制了其应用范围^[4-5]。因此, 将壳聚糖降解为寡糖后再对其加以应用是目前该领域研究的热点之一。壳寡糖的聚合度一般为2-10, 其水溶性好、易被机体吸收利用, 具有抑菌和抗肿瘤等生物学活性, 在医药、食品、农业和环保等各领域具有广阔的应用前景^[6]。

目前, 降解壳聚糖制备壳寡糖的方法主要有酶降解法、物理和化学降解法^[4,7-10]。酶降解法因专一性强、反应条件温和、过程易控制及环境污染少等特点而广受关注, 但是, 专一性的壳聚糖酶往往价格不菲, 且相比于酸水解法, 酶解法得到的产物片段较短, 聚合度(DP)往往不超过4^[1,4,11-18]。已有的研究表明: 稍高聚合度的壳寡糖(DP>5)具有更高的抗菌、抑制肿瘤活

性^[5,11,14,19-20]。因此, 通过控制酸水解的条件制备特定聚合度(5-6)的壳寡糖仍不失为壳寡糖研究中有效的策略之一^[19]。

本研究聚焦于壳聚糖的酸水解过程, 旨在获得高比例的特定聚合度壳寡糖, 并建立不同聚合度壳寡糖的分离及鉴定方法, 以期为中、高聚合度壳寡糖(DP>6)的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

壳聚糖(脱乙酰度>90%)购自国药集团化学试剂有限公司, 氨基葡萄糖(壳一糖)、壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖和壳六糖来源于连云港海康生物科技有限公司, 链霉菌属壳聚糖酶为本实验室通过微生物发酵、分离和纯化制得^[18], 其他化学试剂均为分析纯或分析纯以上纯度。

1.2 盐酸降解壳聚糖

壳聚糖粉末溶解于1.2%乙酸溶液, 室温下

收稿日期: 2013-03-04 修回日期: 2013-05-04

基金项目: 上海市科学技术委员会工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 季 者(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: jstzjzhe@126.com

通信作者: 蒋霞云, E-mail: jiangxy@shou.edu.cn

搅拌至形成凝胶状,加入一定体积的浓盐酸至盐酸终浓度分别为 6 mol/L、9 mol/L 和 11 mol/L 的含 2% 壳聚糖悬浮液。将悬浮液分别置于 40 °C、60 °C 和 80 °C,在 150 r/min 条件下恒温水浴反应一定时间。

定期取出少量反应液,迅速置于冰浴中停止反应。通过旋转蒸发仪尽可能去除样品中的盐酸,加适量去离子水重新溶解,上述步骤重复两次。终产物溶解于适量去离子水,滴加 2 mol/L NaOH 调 pH 至 6.5,10 000 r/min 离心 10 min,通过二硝基水杨酸法测定上清液的还原糖含量^[21],以 D-氨基葡萄糖作标准曲线。

1.3 壳寡糖的薄层分析

将 1.2 节所述上清液在 HSGF254 硅胶板(上海盛亚化工有限公司)上点样、展开,展层剂为 V(异丙醇):V(水):V(氨水)=15:1:7.5,用 W(香草醛):V(硫酸):V(水)=1:12:88 溶液作显色剂,浸润硅胶板后,在 175 °C 下加热 10 min 显色。通过凝胶成像仪 Geldoc XR(美国 Bio-Rad)记录数据,采用 Quantity One 1-D 软件进行定量分析。

1.4 壳寡糖的分子筛层析

1.2 节所述上清液经真空冷冻干燥后,得到壳寡糖粉末,取一定量壳寡糖粉末溶解于去离子水中,上样至葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 层析柱(内径 1.4 cm,装填高度为 100 cm),用去离子水、以 3.6 mL/h 的流速进行洗脱,每 0.9 mL 收集为一管,通过薄层层析法分析收集液的组成;合并相同的组分,冷冻干燥,得到壳寡糖粉末。

1.5 壳寡糖的高效液相色谱分析

取样品适量,通过高效液相色谱法分析壳寡糖的组成,色谱柱为 Asahipak NH₂P-50 4E(Shodex,内径 4.6 mm,长 250 mm),柱温 30 °C,流动相为 V(乙腈):V(水)=70:30,流速为 1 mL/min,用 Waters 2414 折光示差检测器在 30 °C 下进行监测,进样体积为 20 μL,以氨基葡萄糖(壳一糖)、壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖和壳六糖为标准品。

1.6 壳寡糖的核磁共振分析

收集高效液相色谱洗脱得到的相应组分,真空干燥后,将产物重新溶解于重水,使用德国 Bruker Avance(400 MHz)进行 ¹H 和 ¹³C 共振光谱学检测,对其进行结构鉴定。

1.7 壳聚糖酶降解壳寡糖

将实验室自制的壳聚糖酶粗酶粉(15 U/mg,约 1 mg)^[18]与壳寡糖(约 1 mg)样品在醋酸钠缓冲溶液(50 mmol/L,pH 6.0)中,37 °C 下保温反应 1 h,以薄层层析法检测水解产物,分析并推测其原聚合度,对照组加入煮沸的壳聚糖酶粗酶液,其余相同。

2 结果

2.1 壳聚糖的酸水解

壳聚糖在不同的温度和盐酸浓度条件下进行降解,以反应体系中还原糖浓度的变化追踪水解反应的进程,结果见图 1。11 mol/L 与 9 mol/L 盐酸浓度下,水解程度相差不大,而两者与 6 mol/L 之间有明显差异。例如,在 80 °C 下,11 mol/L HCl 与 9 mol/L HCl 的反应,水解 24 h 后还原糖浓度即达到 45 μmol/mL 以上(图 1(a),图 1(b),而 6 mol/L HCl 水解 50 h 后还原糖浓度却不超过 16 μmol/mL(图 1c)。

还原糖浓度与时间的关系可用下述函数关系拟合^[10,20,22]:

$$y = \frac{ax}{b+x} \quad (1)$$

式中:y 为还原糖浓度;x 为反应时间;a 和 b 为常数。

在开始阶段,反应液中还原糖浓度变化很快,即壳聚糖降解反应遵循一级反应规律;随着反应的进行,体系中反应物浓度下降、产物浓度逐渐增大,还原糖浓度增加趋缓,呈混合级反应;最后,反应体系中还原糖含量逐渐趋于稳定,即达到平衡态。这与其他研究者从糖类(如甲壳素、淀粉和纤维素等)的酸水解过程得到的结果相一致^[19]。对比不同盐酸浓度和不同温度下实验数据的极差发现:温度对于降解反应的影响稍显著。此外,据文献报道:不同反应时期的反应液,其中各聚合度壳寡糖组分的分布也不尽相同^[19],考虑到实验的稳定性和可重复性,以下的壳寡糖研究结果均针对平衡反应液体系。

2.2 壳聚糖的酸水解产物组成

分别取以上各降解体系反应液,采用薄层分析法定性和定量分析壳寡糖组分及组成,结果见表 1。壳一糖通常不属于壳寡糖的范畴,壳二糖、

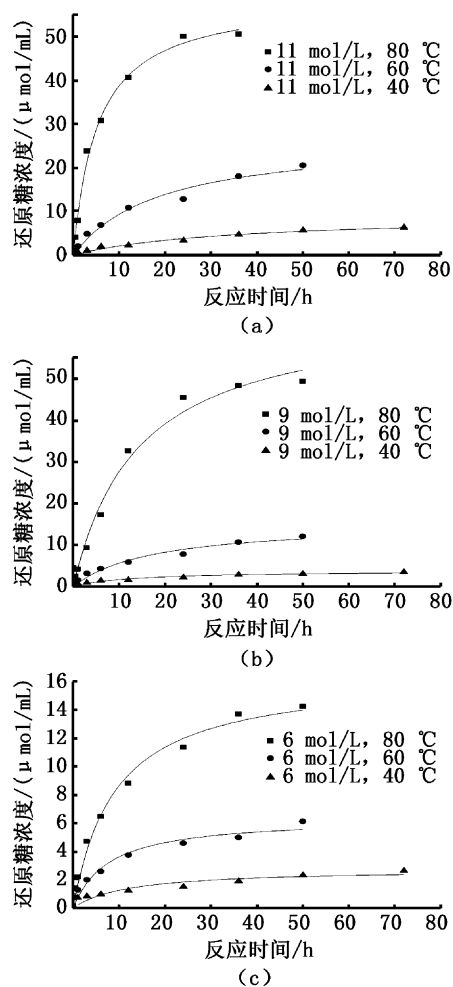


图1 壳聚糖降解反应的还原糖浓度随时间的变化
Fig.1 Changes of reducing sugar amount with time in chitosan-degraded reactions

壳三糖和壳四糖为多种壳聚糖酶酶解作用的产物,壳五糖及壳六糖是本实验的目标产物,更高聚合度壳寡糖分离度不佳,据此,按聚合度将产物分为4组,DP = 1、2-4、5-6、6和>6。如表1

表1 壳聚糖的盐酸降解产物中各聚合度壳寡糖的分布

Tab.1 Distribution of chitosan oligomers for acid hydrolysates in degradation of chitosan

水解反应条件		各壳寡糖含量/%			
HCl	温度/°C	DP = 1	DP = 2-4	DP = 5-6	DP > 6
11 mol/L	80	71.2	18.9	-	9.9
	60	16.3	31.7	14.2	37.8
	40	12.4	33.3	15.2	39.1
9 mol/L	80	68.4	20.3	-	11.3
	60	10.1	31.2	16.2	42.5
	40	9.4	28.9	14.1	47.6
6 mol/L	80	24.3	37.0	9.9	28.8
	60	9.5	30.8	15.9	43.8
	40	7.8	20.8	12.0	59.4

注: - 表示未检测出。

所示,在80 °C下,采用11 mol/L和9 mol/L的盐酸进行壳聚糖的降解,产生了大量的氨基葡萄糖(>65%),与文献[19]及图1(a),图1(b)中所示的高水平还原糖含量(约50 μmol/mL)相吻合;而在较低的温度(40 °C)下,壳聚糖的降解产物多为聚合度>6的壳寡糖(>39%)。已有的研究表明,聚合度为5-6的壳寡糖具有较高的抑菌或抗肿瘤活性,因此,本实验主要考虑聚合度为5和6两种壳寡糖的含量。在60 °C条件下,含9 mol/L和6 mol/L盐酸的壳聚糖降解体系均为较优的选择,前者的壳五糖和壳六糖总含量达到16.2%,高于以往文献报道[19]。因此,酸降解壳聚糖的最适反应条件确定为9 mol/L盐酸体系,反应温度为60 °C。

2.3 不同聚合度壳寡糖的分离和鉴定

采用Sephadex G-15为介质的凝胶过滤法进一步分离壳寡糖反应液,旨在获得DP = 5-6的壳寡糖组分。薄层层析法分析部分收集液,结果见图2(a)所示。反应液经分子筛层析后,不同聚合度的壳寡糖成分基本实现分离,按分子量从大到小、即聚合度从高到低的顺序依次流出,收集各部分便可得到各种具有较窄聚合度分布的壳寡糖产物。F-10收集液主要含有壳五糖和壳六糖组分,对其进行进一步的HPLC检测(图2b),结果显示:与标准品对照,反应液中检测到了预期的主成分:壳寡糖五聚体(保留时间10.7 min)和六聚体(保留时间13.3 min)。值得注意的是,HPLC图谱中还出现了另一化合物X(保留时间16.6 min),推测其极可能为七聚物,但由于目前尚无商品化的壳七糖标准品,此结论还有待进一步的实验验证。

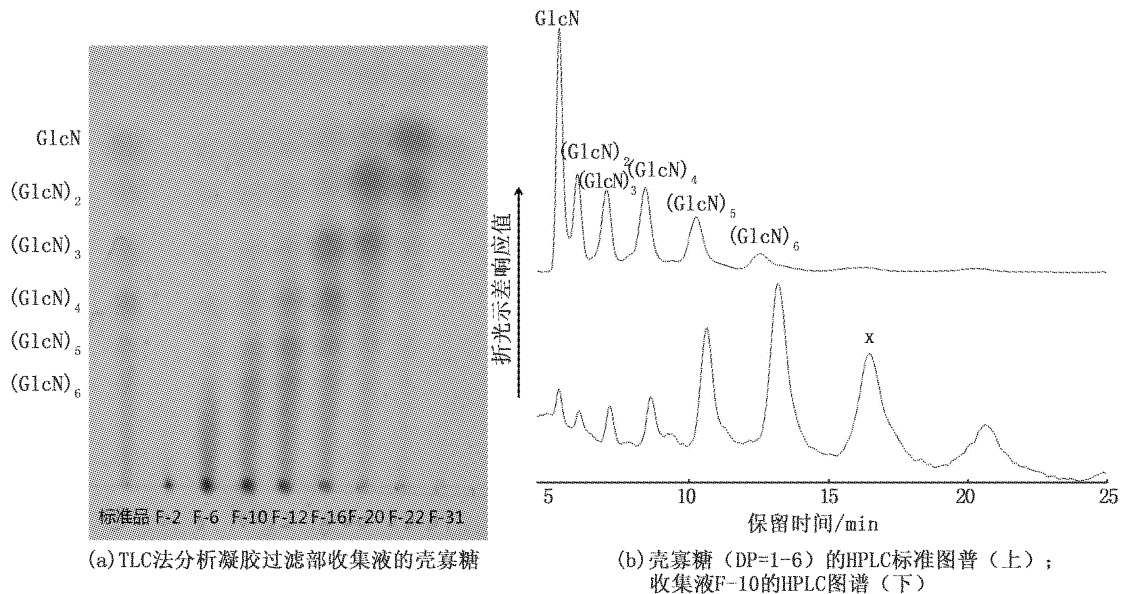


图 2 壳寡糖的分离

Fig. 2 Fractionation of chitosan oligomers

2.4 化合物 X 的表征和鉴定

将收集、合并所得化合物 X 组分,采用 ^{13}C -和 ^1H -核磁共振图谱表征其化学组成,结合壳聚糖酶的酶解作用结果,以期鉴定该化合物,结果见图 3。

图 3(b) 显示的是化合物 X 的 ^{13}C -核磁共振图谱,糖环上的 β -异头物 C1 (图 3a 标示) 引起 101.22 ppm 处的共振,由于聚合成寡糖的缘故, C₁ 的信号已向高值处偏移,而 56.5, 62.5, 69.6, 75.1 和 77.9 ppm 处的信号分别源于糖环的 C₂, C₆, C₃, C₅ 和 C₄, 此结果与已有的文献一致^[10,13,20,23]。图 3c 表示化合物 X 的 ^1H -核磁共振图谱, C₁ 上的 α -氢 (C₁-H) 产生了 4.41 ppm 处的共振信号, C₂-C₆ 上相连的氢 (C₂-C₆)-H 引起的共振则跨越 3.3 ~ 3.8 ppm 的范围。C₂ 上氨基氢 (C₂-NH₂-H) 的信号在 2.6 ppm 处,但是代表乙酰氨基 (CH₃CO-NH-) 上甲基的氢信号却未出现,与其一致的是,乙酰氨基中乙酰基碳信号 (约 175 ppm) 也未出现,这表明:作为壳寡糖,化合物 X 具有很高的脱乙酰度。

壳聚糖酶对化合物 X 的分解实验可用来确定其聚合度。实验采用的壳聚糖酶来源于链霉菌属,其作用模式已知,即该酶不能作用于聚合度 ≤ 4 的壳低聚糖链,但能以内切的方式水解壳五糖和壳六糖中的糖苷键,产物分别为壳二糖:壳三糖 (1:1) 和壳三糖:壳三糖 (1:1)^[18]。如图 3

(d) 显示,壳聚糖酶能够作用于化合物 X,其水解液中产生了大量的三聚物和四聚物,故可判定原化合物 X 的聚合度为 7,即壳七糖。

3 讨论

3.1 壳聚糖的降解方法

目前,壳寡糖的制备主要通过降解高分子的壳聚糖获得。作为高聚物,壳聚糖分子结构致密,需要严苛的条件对其降解。目前降解壳聚糖的方法主要有酶法、物理和化学法。酶解法被普遍认为是最佳选择,但实际上专一性强的壳聚糖酶来源少且价格昂贵,故限制了其在商业化上的应用;非专一性的酶(如纤维素酶、溶菌酶、蛋白酶及脂肪酶等)催化活力有限。况且,已有的研究表明:酶解法得到的产物多为均一的、更短的壳寡糖,即二聚、三聚和四聚 D-氨基葡萄糖^[11-18],具有更高生理活性的、稍高聚合度壳寡糖 (DP > 5) 的得率非常低。所以,开展与酶法互补的其他降解方法研究显得尤为必要。物理法(如超声波、微波等)降解存在着作用不充分,产物不稳定等缺点。化学法降解壳寡糖时使用的酸主要有盐酸、硝酸和硫酸等,后者往往伴随许多副反应,引起褐变、副产物多且复杂等系列问题,故研究报道较多的是采用盐酸降解体系^[4,11,14]。本实验通过研究盐酸浓度与降解产物的聚合度之间关系,选择相对温和的水解条件,

制备并获得了目的壳寡糖,为生产特定聚合度的壳寡糖提供了一种有效、易操作的新方法,亦为

高聚合度壳寡糖的制备提供了有益的参考。

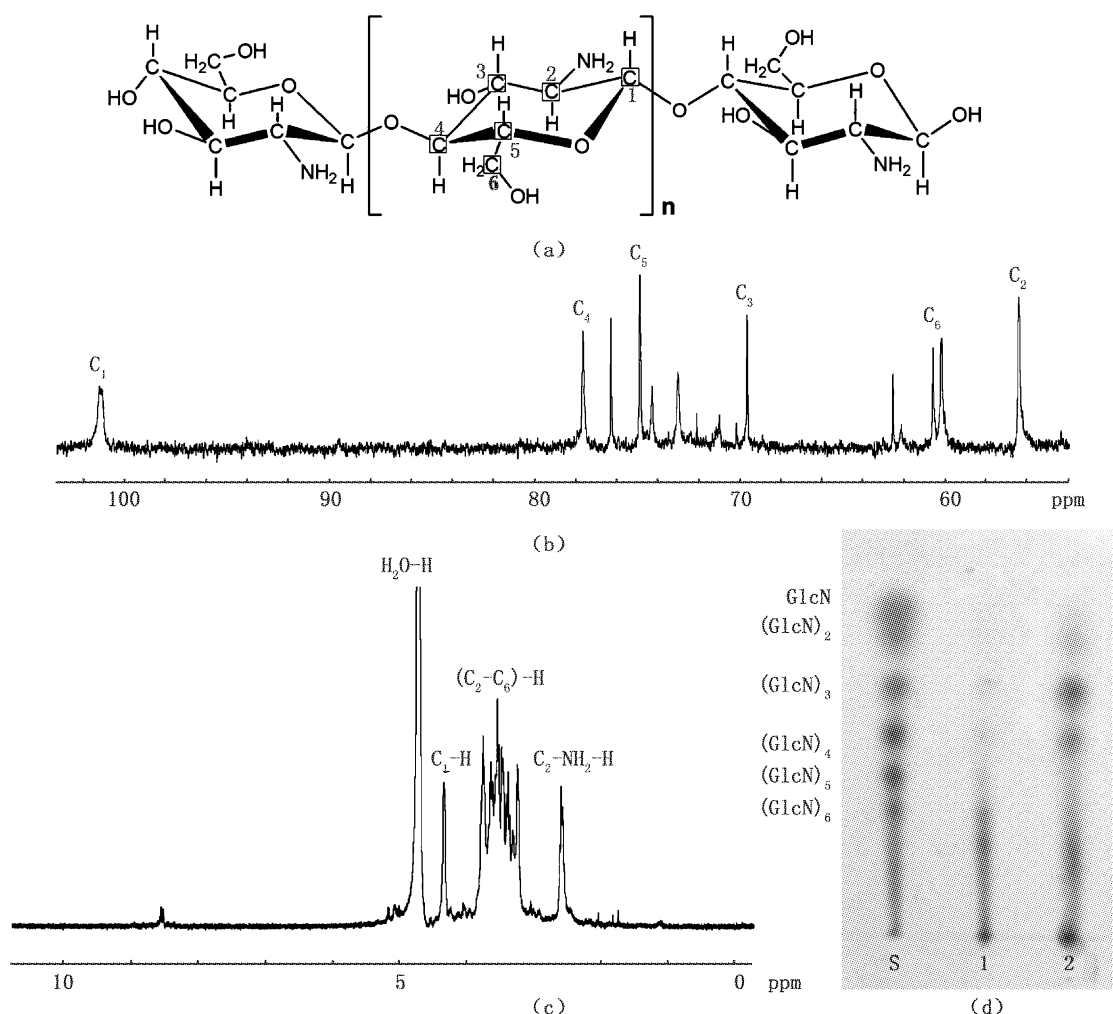


图3 化合物 X 的表征和鉴定

Fig. 3 Characterization and identification of compound X

3.2 不同聚合度壳寡糖的分离

壳寡糖是指聚合度在 2 - 10 的聚氨基葡萄糖,各聚合物的化学组成及官能团均极其相似,所以,壳寡糖的分离和鉴定(尤其是聚合度的确定)一直是个难题。目前可商品化供应的壳寡糖标准品仅限于聚合度 = 1 - 6,其中壳六糖被认为具有最高的细胞防御效力。随着聚合度的继续增加,是否能伴随生理活性的增加?这个问题目前仍无法回答。特定聚合度壳寡糖分离、鉴定与制备相关技术的限制,使我们不能经济可行地获得足够量的所需单一聚合度 > 6 的壳寡糖纯品,用于深入的功能研究,有些研究不得已使用了较为模糊的方法估算壳寡糖的平均聚合度,如从壳

聚糖溶液的平均分子量推测。所以,建立壳寡糖的精细分离和分析方法是势在必行的,其中之一思路便是:对目前常用的层析方法(包括薄层层析、离子交换层析、分子筛层析及高效液相色谱)进行优化,提高其分辨力。本实验探索了将常用的、易实施的凝胶过滤法用于分离壳寡糖混合物,获得了系列聚合度分布较窄的壳寡糖产物,为不同聚合度壳寡糖的研究做了有益的探索。

3.3 壳寡糖的结构鉴定

对化合物进行结构鉴定的常规思路是结合使用核磁共振、质谱、光谱等波谱分析手段,由于不同壳寡糖化合物的相似性,要得到能够分辨细

微差别的波谱,对样品纯度则要求非常高。本研究提出了将壳聚糖酶应用于壳寡糖鉴定的新思路,通过联合使用核磁共振图谱、酶解产物分析的方法,首次成功地表征并鉴定了壳七糖,为更高聚合度壳寡糖的分离和鉴定提供了重要的参考。

参考文献:

- [1] LEE H W, PARK Y S, JUNG J S, et al. Chitosan oligosaccharides, dp 2 - 8, have prebiotic effects on the *Bifidobacterium bifidium* and *Lactobacillus* sp [J]. *Anaerobe*, 2002, 8: 319 - 324.
- [2] NGO D H, WIJESSEKARA I, VO T, et al. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview [J]. *Food Research International*, 2011, 44: 523 - 529.
- [3] MUZZARELLI R A A, BOUDRANT J, MEYER D, et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: a tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87: 995 - 1012.
- [4] CHOI W S, AHN K J, LEE D W, et al. Preparation of chitosan oligomers by irradiation [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2002, 78: 533 - 538.
- [5] TIKHONOV E V, STEPNOVA A E, BABAK G V, et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2-(3-(dodec-2-enyl)succinoyl)-derivatives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64: 66 - 72.
- [6] XIA W S, LIU P, ZHANG J L, et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25: 170 - 179.
- [7] JEON Y J, KIM S K. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35: 623 - 632.
- [8] LIN H, WANG H Y, XUE C H, et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31: 588 - 592.
- [9] KIM S K, RAJAPAKSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62: 357 - 368.
- [10] TIAN M, CHEN F, REN D W, et al. Preparation of a series of chitooligomers and their effect on hepatocytes [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79: 137 - 144.
- [11] CABRERA C J, CUTSEM V P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25: 165 - 172.
- [12] DENNHART N, FUKAMIZO T, BRZEZINSKI R, et al. Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by real-time electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134: 253 - 260.
- [13] QIN C Q, WANG W, PENG H, et al. Preparation and properties of reduced chitooligomers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72: 701 - 706.
- [14] XIE Y, HU J G, WEI Y, et al. Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 94: 1895 - 1899.
- [15] SOMASHEKAR D, JOSEPH R. Chitosanases properties and applications: a review [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 55: 35 - 45.
- [16] FUKAMIZO T, YOSHIKAWA T, KATSUMI T, et al. Substrate-binding mode of bacterial chitosanase [J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2005, 52: 183 - 189.
- [17] GAO X A, JUNG W J, KUK J H, et al. Reaction pattern of *Bacillus cereus* D-11 chitosanase on chitooligosaccharide alcohols [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19: 358 - 361.
- [18] JIANG X Y, CHEN D C, CHEN L H, et al. Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin [J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 355: 40 - 44.
- [19] LEE M Y, VAR F, SHINY Y, et al. Optimum conditions for the precipitation of chitosan oligomers with DP 5-7 in concentrated hydrochloric acid at low temperature [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 493 - 500.
- [20] QIN C Q, DU Y M, XIAO L, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 31: 111 - 117.
- [21] IMOTO T, YAGISHITA K. A simple activity measurement of lysozyme [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1971, 35: 1154 - 1156.
- [22] RUPLEY J A. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme [J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 1964, 83: 245 - 255.
- [23] 王骏,李英霞,宋妮,等. 壳寡糖及其全乙酰化衍生物的制备及结构表征 [J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(6): 994 - 1000.

Preparation of pentamer-to-heptamer chitooligosaccharides by hydrochloric acidic degradation of chitosan

JI Zhe^{1,2}, JIANG Xia-yun^{1,2}, LI Xiao-qian¹, LI Yuan-lin¹, CHEN Shun-shen^{1,2}

(1. *College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing and Preservation, Shanghai 201306, China*)

Abstract: This study outlines a method to prepare chitooligosaccharides with a specific degree of polymerization (5–6). It was carried out by hydrochloric acid hydrolysis in a chitosan-degraded system and a following procedure by gel filtration chromatography to fractionate chitosan oligomers. The degradation of chitosan over a range of temperatures (40 °C, 60 °C and 80 °C) and hydrochloric acid concentrations (6 mol/L, 9 mol/L and 11 mol/L) was investigated. The results showed that chitosan was degraded effectively and various chitooligosaccharide mixtures with different oligomer constitutions were obtained. Among them, the optimum conditions were 9 mol/L HCl at 60 °C and the yield of chitopentaose and chitohexose reached 16.2%. A procedure using Sephadex G-15 onto size-exclusion column was further developed to narrow the range of oligomers and obtain expected fraction containing mainly chitosan pentamer and hexamer detected by thin layer chromatography. Furthermore, it was identified by high performance liquid chromatography. Alongside peaks for chitopentaose and chitohexaose, a new peak designating an unknown compound occurred. It was identified as chitooligosaccharide by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance. Enzymatic depolymerization by chitosanase produced mainly trimer and tetramer, further confirming the presence of a heptamer.

Key words: chitosan; chitooligosaccharides; acid hydrolysis; degree of polymerization