

综述与专论

DOI: 10.11949/0438-1157.

木质纤维素低聚糖:化学制备、分离纯化、结构表征及应用研究进展

朱明玉¹, 曾梅君², 刘启予³, 曹玉连¹, 陈彦君¹, 应汉杰¹, 朱晨杰¹

(¹ 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816; ² 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610016; ³ 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 木质纤维素低聚糖是指来源于木质纤维素中结构多糖(纤维素、半纤维素)的短链糖分子, 聚合度通常在2–20之间, 如低聚葡萄糖、低聚木糖、低聚甘露糖等, 在食品、农业、医药、化妆品等领域有极大的应用潜力和市场前景, 近年来成为生物质化工领域的研究热点。本综述总结了木质纤维素低聚糖的制备、分离、表征及应用方面的研究进展, 详细总结了自上而下法和自下而上法两类制备技术, 比较了制备效率、产物种类及结构、分子量分布等差异; 归纳了膜分离、色谱吸附分离等分离纯化策略; 总结了低聚糖组成、聚合度、糖苷键等化学结构的表征方法, 以及低聚糖的生物活性功能、应用领域及前景。

关键词: 木质纤维素; 低聚木糖; 低聚葡萄糖; 低聚甘露糖; 糖苷键

中图分类号: Q 53

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (XXXX) XX-0001-21

Lignocellulosic-based oligosaccharides: chemical preparation, separation, structural characterization, and functional applications

ZHU Mingyu¹, ZENG Meijun², LIU Qiyu³, CAO Yulian¹, CHEN Yanjun¹, YING Hanjie¹, ZHU Chenjie¹

(¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ² College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610016, Sichuan, China; ³ School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

Abstract: Lignocellulosic-derived oligosaccharides refer to short-chain sugar molecules derived from structural polysaccharides (cellulose, hemicellulose) in lignocellulose, with a degree of polymerization typically ranging from 2 to 20, such as gluco-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides, and manno-oligosaccharides. They possess significant application potential and market prospects in the fields of food, agriculture, medicine, and cosmetics, and have become a research hotspot in the field of biomass chemical engineering in recent years. This review summarized the research progress on the preparation, separation, structural characterization, and functional application of lignocellulose-derived oligosaccharides. Oligosaccharides preparation strategies, namely the top-down and bottom-up methods, were summarized in detail. Comparisons on preparation efficiency, product types and structures, and molecular weight distribution were made. Separation and purification strategies such as membrane separation and chromatographic adsorption separation were summarized. Characterization methods for the chemical

收稿日期: 2026-06-16 修回日期: 2026-08-07

通信作者: 朱晨杰(1985—), 男, 博士, 教授, zhucj@njtech.edu.cn; 曾梅君(1992—), 女, 助理研究员, zengmeijun@cdpu.edu.cn

第一作者: 朱明玉(2000—), 女, 博士研究生, 202361118043@njtech.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点支持项目(U25A20616)

引用本文: 朱明玉, 曾梅君, 刘启予, 曹玉连, 陈彦君, 应汉杰, 朱晨杰. 木质纤维素低聚糖: 化学制备、分离纯化、结构表征及应用研究进展[J]. 化工学报, XXXX, XX(XX): 1–21

Citation: ZHU Mingyu, ZENG Meijun, LIU Qiyu, CAO Yulian, CHEN Yanjun, YING Hanjie, ZHU Chenjie. Lignocellulosic-based oligosaccharides: chemical preparation, separation, structural characterization, and functional applications[J]. CIESC Journal, XXXX, XX(XX): 1–21

structure of oligosaccharides, including chemical composition, degree of polymerization, and glycosidic bonds were reviewed. Furthermore, the biological activities, application fields, and prospects of lignocellulose-derived oligosaccharides were introduced.

Keywords: lignocellulose; xylo-oligosaccharides; gluco-oligosaccharides; manno-oligosaccharides; glycosidic bond

引 言

木质纤维素是生物质的主要组成成分,由纤维素、半纤维素和木质素三大素通过复杂的交联结构构成^[1]。其中,纤维素和半纤维素作为结构多糖,占生物质干重的60%–75%,是自然界中最为丰富的糖类资源。纤维素和半纤维素的结构见表1。纤维素是由葡萄糖单元通过 β -(1 $\rightarrow$ 4)-糖苷键连接而成的均质高分子多糖,聚合度通常为数百至数万,分子

链间通过氢键和范德华力聚集形成高度有序的结晶区与无序的无定形区^[2]。半纤维素则是以 β -(1 $\rightarrow$ 4)-连接的戊糖为主链、带有多种短侧链取代基团的杂多糖,其单糖组成主要包括木糖、甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖等,聚合度较低(一般80–200),整体呈现无定形、高度分支的构象,可紧密附着于纤维素微纤丝表面,并与木质素形成交联网络^[3]。

表1 木质纤维素中结构多糖纤维素与半纤维素的化学结构^[4]

Table 1 Chemical structures of structural polysaccharides cellulose and hemicellulose in lignocellulose^[4]

组分	化学结构	糖苷键
纤维素		β -(1 $\rightarrow$ 4)
半纤维素		主链: β -(1 $\rightarrow$ 4) 侧链: α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3) α -(1 $\rightarrow$ 6) 乙酰基:酯键

通过化学法、酶法或物理法对木质纤维素中的结构多糖进行降解,可获得聚合度为2–20的低聚糖,如低聚木糖、纤维寡糖等^[5]。这类低聚糖因具有优良的益生元活性、抗氧化性能、提高免疫、保湿补

水等多种生理功能,在疾病诊断与防治、功能性食品、饲料添加剂、医药健康、植物生长及抗病、化妆品等领域展现出广阔的应用前景。近年来,以木质纤维素水解所得单糖(如葡萄糖、木糖)通过化学合

成法也实现了低聚糖的制备,其制备效率、所得产物结构及生物活性与降解法存在较大差异,成为新兴的研究热点。在众多低聚糖中,低聚葡萄糖、低聚木糖和低聚甘露糖三类最具代表性,它们分别来源于纤维素、半纤维素和甘露聚糖,在结构与功能方面各具特色。

本文系统综述了来源于木质纤维素的低聚糖,涵盖了其制备、分离纯化、结构表征与应用前景。首先,系统总结了木质纤维素低聚糖的制备技术,从“自上而下”与“自下而上”两个策略,全面涵盖了化学水解与合成法、酶催化法以及多种处理手段制备低聚糖的策略。在此基础上,进一步详细阐述了低聚糖的分离纯化方法及结构表征手段,重点分析了不同分离技术的用途及优缺点,总结了针对组成成分、聚合度和糖苷键的特异性表征方法。本文将作为木质纤维素向高附加值低聚糖产品的高效转化及应用提供理论指导,拓展了木质纤维素高值化利用的新途径。

1 木质纤维素低聚糖

1.1 低聚木糖

低聚木糖(xylo-oligosaccharides,XOS)通常是由2-20个木糖分子通过 β -(1 $\rightarrow$ 4)-糖苷键连接而成的功能性寡糖,其化学结构如图1所示,是最具代表性的益生元低聚糖之一^[6]。低聚木糖不仅具有促进双歧杆菌增殖、调节肠道菌群的功效,还具有降低血液胆固醇、抗氧化、增加钙吸收、降低结肠癌风险以及有益于糖尿病患者健康等多重功能^[7]。低聚木糖已被广泛用作功能食品添加剂、甜味剂、保健品等,另外也用于动物饲料添加剂以提高动物肠道健康及免疫功能。我国已建立低聚木糖食品质量标准,将低聚木糖按照产品形态分为糖浆(L)和糖粉(P),pH在3.5-6.0,灰分含量小于0.3%,且X2-X4含量(以干基算)需高于50%^[8]。目前,低聚木糖已实现规模化生产,例如山东龙力公司以玉米芯、甘蔗渣中木聚糖为底物通过酶法生产低聚木糖,年产量达6000吨,产品以糖粉(XOS-95P)、糖浆(XOS-75L)等形式销售^[9-10]。

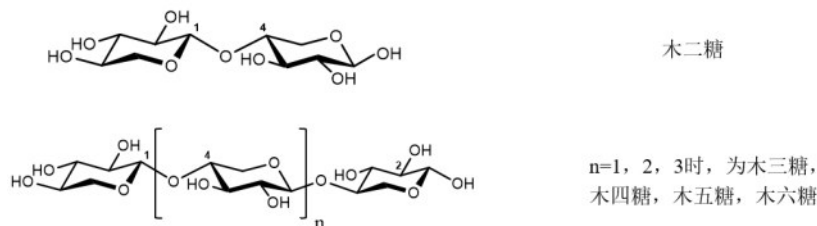


图1 低聚木糖结构

Fig.1 Chemical structure of xylooligosaccharides

1.2 低聚葡萄糖

低聚葡萄糖(gluco-oligosaccharides,GlcOS)通常指葡萄糖单元通过各种连接键连接而成的低聚糖。如图2所示,根据低聚葡萄糖的糖苷键类型不同,可分为 α -(1 $\rightarrow$ 6)型异麦芽寡糖、 β -(1 $\rightarrow$ 6)型龙胆低聚糖、 β -(1 $\rightarrow$ 4)型纤维寡糖、 α -(1 $\rightarrow$ 4)型麦芽寡糖、 α -(1 $\rightarrow$ 3)型黑曲霉低聚糖、 β -(1 $\rightarrow$ 3)型海带低聚糖、 α -(1 $\rightarrow$ 2)型曲寡糖、 β -(1 $\rightarrow$ 2)型槐糖低聚糖、 α , α / α , β / β , β -(1 $\rightarrow$ 1)型海藻低聚糖。其中, β -(1 $\rightarrow$ 4)型纤维寡糖主要是由纤维素水解制备得到,其他类型低聚糖一般是由淀粉或蔗糖通过糖苷转移酶制备而得。研究表明,不同类型连接键的低聚糖在益生元活性和免疫调节功能上各具特色。异麦芽低聚糖可有效促进双歧杆菌增殖,从而调节肠道菌群。 β -葡聚

糖能显著提高 α -葡萄糖苷酶抑制率(52.7%),其抑制效果比对照组提高了2.01倍,在糖尿病治疗方面展现出良好潜力^[10]。低聚葡萄糖因其低热量、非消化性及选择性促进有益菌生长等特性,在功能性食品和医药领域展现出广阔的应用前景^[11-12]。

1.3 低聚甘露糖

低聚甘露糖(manno-oligosaccharides,MOS)是由D-甘露糖通过不同糖苷键连接而成的寡糖,其聚合度在2-20之间,结构如图3所示。按照糖苷键类型又可分为 α -低聚甘露糖和 β -低聚甘露糖。 α -MOS是由酵母细胞中存在的 α -(1 $\rightarrow$ 6)-糖苷键连接的甘露聚糖水解得到^[13],而 β -MOS来源于通过 β -(1 $\rightarrow$ 4)-糖苷键连接的植物甘露聚糖。低聚甘露糖在肠道微生态调节、代谢性疾病干预、免疫调节、抗

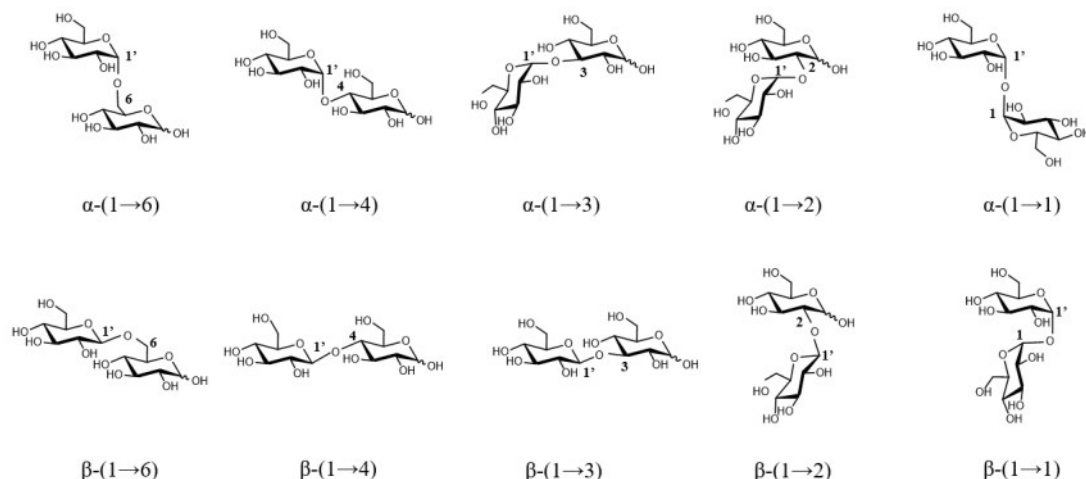


图2 低聚葡萄糖的糖苷键类型

Fig.2 Types of glycosidic bonds in gluco-oligosaccharides

氧化抗肿瘤等多个领域展现出显著的应用价值^[14]。此外低聚甘露糖作为抗生素替代品,在畜禽和水产养殖中能够改善生长性能、增强免疫应答、提高营养物质利用率,并改善肠道形态结构,为减少养殖业抗生素使用提供了绿色解决方案^[15]。

不均一,设备要求高,工业化放大易受限。化学法反应快速、成本较低,但产物聚合度分布宽。酶法条件温和、选择性高,产物聚合度相对集中,但酶成本较高。酶法原料来源广、易于工业放大,是目前低聚糖生产的主要途径,但对糖苷键的选择性有限(表2所示)。自下而上法一般通过化学或酶法从单体(单糖或二糖)出发,通过化学合成(糖基供体与受体的选择性偶联)或酶法合成(糖基转移酶、水解酶等)逐步构建目标低聚糖。化学法可精确控制糖苷键构型和连接位置,但步骤繁琐、产率低;酶法区域和立体选择性高,条件温和,但成本较高、规模化受限(表3所示)。

2.1 自上而下法

2.1.1 物理法制备低聚糖

物理法主要通过机械力或能量输入改变木质纤维的物理结构,其核心目标是破坏纤维素的结晶结构、增加比表面积、降低聚合度。物理法本身通常不直接生产高纯度低聚糖,而是作为预处理手段与其他方法联用。勇强教授^[16]团队通过水热法破坏笋壳半纤维素部分连接键,结合木聚糖酶进一步水解得到产率30.9%低聚木糖。机械预处理包括粉碎、研磨、球磨、微波辐射等。球磨处理可有效破坏木质素的物理屏障,使纤维表面出现碎片化和剥落,形成松散的纤维结构^[17]。微波预处理通过高频电磁波引起极性分子的剧烈振荡,破坏氢键网络。蒸汽爆破是一种成熟的商业化预处理技术,通过高温高压水蒸气渗入生物质内部,瞬间泄压使细胞壁结构破裂^[18]。Bhatia等^[19]采用蒸汽爆破预处理芒草,实现了72.7%的木聚糖提取

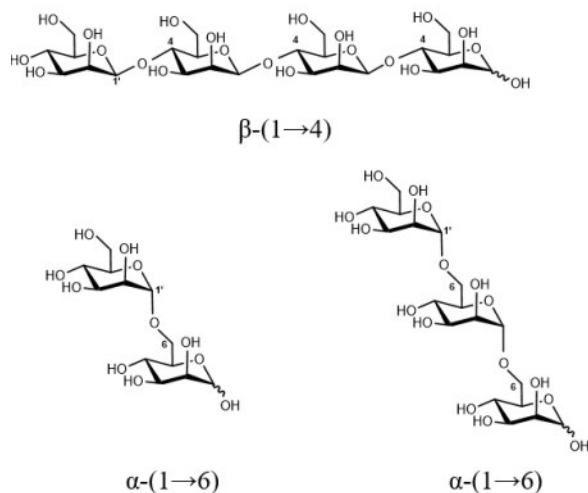


图3 低聚甘露糖结构

Fig.3 Chemical structure of manno-oligosaccharides

2 低聚糖的制备

低聚糖的制备分为自上而下的降解反应和自下而上合成反应两种策略。自上而下法是以多糖为原料,通过物理法(微波、水热、蒸汽爆破等),化学法(酸解、离子液体等)或酶法(糖苷水解酶、糖苷磷酸化酶等)断裂糖苷键,降解生成低聚糖。物理法操作简便,绿色环保且不引入其他杂质,但产物

和87.6%的葡聚糖回收,为后续XOS和GlcOS的制备创造了有利条件。蒸汽爆破兼具物理与化学协同效应,既符合物理作用中的爆破剪切力,又具备高温水蒸气诱导的自水解及原位酸催化效应,下章节将展开论述各类典型化学处理方法制备低聚糖。此外,广东工业大学邱学青教授^[20]团队通过浓硫酸和半乳糖预浸渍纤维素,随后球磨降解纤维素并通过接枝反应引入半乳糖侧链,从而高效制备了低聚半乳糖产品且显著提高了其水溶性和增殖益生菌的能力。

物理法的主要优势在于无化学试剂引入、环境污染小,且产物结构保持完整、不引入新官能团。其局限性在于能耗较高,单独使用难以实现组分的高选择性分离,产物得率通常较低。因此,物理法多作为辅助手段与化学法或生物法联合使用。

2.1.2 化学法制备低聚糖 化学法通过酸、绿色溶剂对木质纤维中的糖苷键进行选择性的断裂,是制备功能性低聚糖应用最广泛的方法。根据催化剂类型,可分为无机酸水解法、有机酸催化法和绿色溶剂处理法。

无机酸水解是制备低聚糖的传统方法,通过酸性溶液中氢质子释放进攻纤维素、半纤维素等连接键,从而促使聚糖链断裂水解为低聚糖。Guo等^[21]采用木糖酸催化四种木质纤维原料制备低聚木糖,玉米芯低聚木糖产率达54.16%,麦秸为39.19%,玉米秸秆为29.01%,杨树锯屑为30.23%。潘学军教授^[22]团队首先采用80%浓硫酸润胀溶解玉米秸秆中的纤维素和半纤维素(20℃,1h),随后在50℃下反应10分钟促进酸水解及同步糖苷化反应,制备得到低聚糖,产率达48.8%,其中包括33.9%低聚葡萄糖,12.6%低聚木糖及2.3%其他类型低聚糖,实现不同种类低聚糖同步高效合成且异构化形成各种非天然连接键低聚糖。然而,无机酸水解存在明显缺陷:强酸易导致低聚糖过度降解为单糖乃至糠醛等抑制物;设备腐蚀性强;中和过程产生大量含盐废水^[23]。值得注意的是,低聚糖的降解及抑制物的产生可通过反应条件的调控以控制。在浓硫酸催化体系中,精确控制酸浓、温度与反应时间,可以在促进糖苷键形成的同时有效抑制低聚糖的过度降解。有机酸催化法因酸性温和、选择性好、对设备腐蚀小,正逐步替代无机酸。张军华教授^[24]团队首次采用山梨酸水解柳枝稷制备低聚木糖,产率达50.8%,且山梨酸作为食品防腐剂可延长产品货架期。蒋

剑春院士^[25]团队采用乙酸-水热处理杨木,在4%乙酸、170℃、40min条件下实现70.85%的木聚糖提取和50.28%的低聚木糖产率,同时保留94.7%的纤维素。有机酸可通过电渗析回收回用,降低生产成本。然而,电渗析的工业应用受限于膜污染与能耗问题,其适用性高度依赖于处理对象。对高纯度有机酸体系效率较高,而在含多价金属离子或悬浮物的复杂料液中,膜污染加剧、电流效率显著下降。相比之下,蒸馏法能耗更高,且物料受热时间长,易造成有机酸热降解;纳滤虽能耗较低,但对小分子有机酸的截留率有限;反应萃取可实现选择性分离,但需引入有机溶剂并增加反萃步骤。

绿色溶剂处理是新兴方向,根据组分不同分为深共晶溶剂(DES)和离子液体。深共晶溶剂由氢键供体与氢键受体以适当的比例混合而成。DES具有低蒸气压、热稳定性、低毒性以及良好的生物降解性^[26]。DES的氢键相互作用会与木质纤维素中的化学键相互作用,从而实现木质纤维素成分的分离。如Xu等^[27]将乙酸预水解后的杨树锯屑用DES处理,分离71%木质素组分,从而得到易于水解的纤维素成分。熔盐水合物(molten salt hydrate,MSH)是一种特殊的无机盐溶剂,又称无机离子液体。溶剂中的阳离子均与水分子形成配位结构,无游离态水分子存在。水合阳离子和阴离子可以分别与纤维素或半纤维素羟基氧以及羟基氢配位,破坏其固有的羟基氢键配位结构,促进高结晶度纤维素及半纤维素在温和条件下溶解,暴露糖苷键。通过温和条件下对糖苷键进行定向裁剪,可以将纤维素和半纤维素选择性降解至低聚葡萄糖和低聚木糖。

王静教授^[28]团队通过筛选8种离子液体,发现1-烯丙基-3-甲基咪唑乙酸盐可使阿魏酰化低聚木糖提取率提升1.5倍。刘启予教授报道了采用60wt%的LiBr溶液,在不额外添加催化剂的情况下,仅依赖LiBr盐的弱酸性,在130℃的温和条件下将微晶纤维素^[29]、棉花秸秆^[30]定向水解至聚合度在4-11之间的链式低聚葡萄糖,收率分别达到90.3%和85.3%。在LiBr·3.2H₂O中,高电荷密度的Li⁺对水分子产生强配位作用,从而削弱水分子羟基,增强了体系的Brønsted酸度,使H⁺以高反应活性形式存在。同时Li⁺与纤维素羟基的配位作用及Br⁻的氢键受体效应协同破坏纤维素的结晶结构,促进纤维素溶解并降解成低聚葡萄糖。为避免水解反应过程中产生的乙酰丙酸、甲酸等高浓度酸性副产物造成的低

聚糖浓度低的瓶颈问题,进一步通过原位吸附生成的副产物,构建稳定的催化环境,实现了高浓度纤维素向高浓度低聚糖的定向转化,糖浓度由 54g/L 以下提升至 247g/L^[31]。

化学法的优势在于反应速率快、可大规模生产、工艺成熟。无机酸成本最低但选择性最差。有机酸选择性更好且可回收,绿色溶剂在组分选择性分离方面表现优异,但高粘度和回收能耗仍是工业化障碍。

2.1.3 生物法制备寡糖 生物法以酶催化为核心,通过木聚糖酶、纤维素酶、甘露聚糖酶等多糖底物进行特异性降解,是制备高纯度功能性低聚糖的理想途径。

低聚木糖酶类型包括内切- β -1,4-木聚糖酶、1,4- β -木糖苷酶、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶等,这些酶根据序列和结构特征按照 CAZy 系统分类法进行划分。Avila 等^[32]用 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(GH51),内切-1,4-木聚糖酶(GH11)和阿魏酸酯酶(CE1)协同处理甘蔗秸秆和咖啡壳中提取的木寡糖,在 50℃,pH 5.0,酶解反应 48h 反应后得到的水解液中木寡糖浓度高达 10.23g/L 和 8.45g/L,主要成分是木二糖至木四糖。

在低聚葡萄糖的酶法制备方面,关键策略是避免产物进一步水解为葡萄糖。如勇强教授^[33]团队开发了“吸附-分离”策略:利用 β -葡萄糖苷酶与内切葡聚糖酶等电点的差异(pI=8.7),在 pH 7.0、10℃下实现选择性分离,将分离后的酶系用于多级酶解,纤维寡糖总产率达 51.78%。Lin 等^[34]采用纤维素酶

和半纤维素酶协同水解碱性预处理后的乌龙茶废料,产物包含纤维二糖至纤维五糖。Bhatia 等^[35]采用内切葡聚糖酶水解预处理后的芒草纤维素浆,获得 40–50% 的低聚葡萄糖产率。

在低聚甘露糖的酶法制备方面,其制备效率与产物组成高度依赖于所用甘露聚糖酶的家族来源及底物结构特性。如黄遵锡教授^[36]团队将甘露糖水解酶 Man5HJ14 和 ManAJB1 处理刺槐豆胶,产物分别为甘露五糖和甘露六糖,而处理棕榈仁饼时产物中无明显差异。Woranuch 等^[37]利用重组甘露聚糖酶 rManS2 水解魔芋葡甘露聚糖,成功制备出聚合度为 2–5 的低聚甘露糖,其中甘露二糖含量最高(32.01%)。进一步证实了底物组成与酶特异性对产物分布的关键调控作用。此外,为提高酶法效率,研究者还尝试了多种策略。Jana 和 Kango^[38]指出碱预处理可有效破坏木质纤维结构,提高酶的可及性。江正强教授^[39]团队利用高温酸性甘露聚糖酶在蒸汽爆破预处理条件下高效生产甘露寡糖,展现了良好的工业应用潜力。

生物法的优势在于反应条件温和、底物特异性高、产物聚合度可控,副产物极少、产品纯度高。其局限性在于酶制剂成本较高,酶稳定性受 pH 和温度影响,木质素等抑制物会通过非生产性吸附降低酶活性。添加表面活性剂(如 Tween 80)或木质素磺酸钠可有效屏蔽木质素对酶的无效吸附,显著提高酶解得率。耐热酶的开发是重要方向,来源于嗜热微生物的酶可在 60–80℃下保持活性,具有反应速率快、污染风险低等优势^[40]。

表 2 自上而下法制备低聚糖的产率和糖苷键

Table 2 Yields and glycosidic linkages of oligosaccharides prepared by top-down methods

方法	底物	制备反应条件	产物	产率	糖苷键类型及聚合度	参考文献
物理法	笋壳	170℃水热处理 50min	低聚木糖	30.9%	β -(1→4) 2–6	[16]
	竹纤维素	球磨处理打破糖链间连接键	低聚葡萄糖 低聚木糖	21.6%	β -(1→4) —	[17]
	多种木质纤维素原料	热化学法预处理	低聚木糖	—	β -(1→4) 2–7	[19]
化学法	多种木质纤维素原料	利用自产木糖酸作催化剂进行酸解	低聚木糖	29.01%–54.16%	β -(1→4) —	[21]
	玉米秸秆	80% 浓硫酸, 20℃反应 1h 后 50℃反应 10min	低聚葡萄糖 低聚木糖	48.8%	α/β -(1→2) α/β -(1→3) α -(1→4) α/β -(1→6) 2–12	[22]

续表

方法	底物	制备反应条件	产物	产率	糖苷键类型及聚合度	参考文献
	柳枝稷(脱木质素)	3% 山梨酸, 170℃水解	低聚木糖	50.8%	β -(1→4) 2-6	[24]
	玉米麸皮	18.65%[Amim]Ac 离子液体, 143℃反应 19min	阿魏酰化低聚糖	74.76%	β -(1→4) 2-3	[28]
	玉米秸秆	85% H ₃ PO ₄ 中一步完成溶胀、水解和糖基化	低聚葡萄糖 低聚木糖	11%-17%	α/β -(1→2) α/β -(1→3) α -(1→4) α/β -(1→6) 2-9	[41]
	纤维素	溶解于含吸附剂的 MSH(60%LiBr-H ₂ O)溶液, 130℃反应 4h	纤维低聚糖	81%	β -(1→4) 2-20	[42]
	热凝胶	凝乳酶或酸法(TFA/H ₂ SO ₄ , 1M), 60℃降解 6-90h	β -(1→3)低聚葡萄糖	85%-93%	β -(1→3) 1-4	[43]
	Avicel	HCl/H ₂ SO ₄ 溶液中研磨 2.5-10h	纤维低聚糖	100%	β -(1→4) α -(1→6) 2-10	[44]
	微晶纤维素	0.26 - 1.27wt% 硫酸, 水解 160 - 250℃	葡萄糖二聚体	25%	α/β -(1→2) α/β -(1→3) α/β -(1→6) 2	[45]
	瓜尔胶	柠檬酸预处理(300mM, 130℃, 1h), 结合酶水解	甘露低聚糖	61.8%	β -(1→4) 2-6	[46]
生物法	麦芽糊精	葡萄糖基转移酶处理, 酶法重排糖苷键	低聚葡糖	100%	α -(1→6) α -(1→4) 3-12	[47]
	酵母 β -葡聚糖	新型 β -1,6 特异性内葡聚糖酶(Gly30z), pH 6.0, 40℃	功能低聚糖	21%	β -(1→3) β -(1→6) 2-10	[48]
	淀粉	α -淀粉酶, 70 - 90℃, pH 7	麦芽低聚糖	—	α -(1→4) 2-20	[49]
	—	酶膜反应器, pH 7, 40℃	龙胆二糖	70.34g/L	β -(1→6) 2	[50]
	碱提木聚糖	自水解+内切木聚糖酶水解	低聚木糖	41.22%	β -(1→4) 2-6	[51]
	稻壳	碱液高温蒸煮提取木聚糖, 内切木聚糖酶水解	低聚木糖	17.35mg/mL	β -(1→4) —	[52]
	—	工程化保留型木聚糖酶催化糖基合成	低聚木糖	—	β -(1→4) —	[53]
	半乳甘露聚糖	使用来源于肠道细菌 <i>Bacteroides ovatus</i> 的 GH26 家族 β -甘露聚糖酶(BoMan26B)进行水解反应	β -甘露低聚糖	30%	β -(1→4) 2-6	[54]

2.2 自下而上法

2.2.1 酶法制备技术 酶促糖基化根据酶类型分类为糖基转移酶、糖基磷酸化酶、糖基水解酶。糖基转移酶分为两类: Leloir 类型和非 Leloir 类型。Leloir 型糖基转移酶以糖核苷酸为供体, 在寡糖合成中具有严格的区域和立体选择性^[55]。Komatsu 等^[56]利用葡萄糖基转移酶 I 水解蔗糖, 通过逐步连接

反应聚合成 α -(1→3)-葡聚糖。糖基转移酶催化反应过程中, 会出现产物抑制现象而造成酶活性降低, 产率下降等问题。可通过持续性去除产物解决该问题, 例如利用产物捕获技术或将酶固定在固体载体上^[57], 这些方法有助于维持较低的产物浓度, 从而减轻其抑制作用, 并提高催化效率。

糖基磷酸化酶是一类参与糖基连接断裂和形

成碳水化合物活性酶,以糖 1-磷酸为供体,催化可逆的磷酸化反应,从而高效合成特定的寡糖。Ubiparip 等^[58]通过对纤维二糖磷酸酶和纤维素磷酸化酶进行工程化改造,优化了纤维三糖的选择性合成。顾国锋教授^[59]团队报道了一种结合多聚磷酸激酶的 ATP 再生系统,可高效驱动糖苷磷酸化酶催化的寡糖合成(β -(1 $\rightarrow$ 2/3/4)-甘露糖苷,产率 40-92%)。

糖基水解酶催化的转糖基化分为热力学控制的反向水解和动力学控制的转糖基化两种策略^[60]。1991 年, Kobayashi 和 Shoda^[61]课题组在低聚葡萄糖合成领域取得里程碑式突破,首次报道了利用纤维素酶催化 β -纤维二糖基氟化物在乙腈/乙酸缓冲液(5:1, pH5)中的缩聚反应,合成了聚合度 2-22 的低聚葡萄糖。后续,该课题组利用含有木聚糖酶活性的粗纤维素酶,合成了人工木聚糖^[62]。在低聚甘露糖合成中, β -甘露糖苷酶 Man2A 的 E519A 和 E519S 突变体能够构建 β -甘露糖苷键^[63]。酶活性部位丝氨酸突变体(E519S)的合成效率远高于丙氨酸突变体(E519A)。丝氨酸突变体在 α -甘露糖基氟化物与对硝基苯基 β -甘露糖苷反应中获得 74% 的总收率(21% 二糖、32% 三糖、19% 四糖和 1% 五糖),而丙氨酸突变体仅得到 8% 的二糖和三糖。

糖基水解酶显著缺点在于产物必然成为酶的底物,随后还会发生水解反应,因此产率较低。为解决上述问题, Mackenzie 等^[64]开发一种高效合成寡糖方法。利用特异性突变的糖合成酶(糖基水解酶突变体, β -糖苷酶),以天然底物相反异构构型的糖基氟化物如 α -葡萄糖基氟化物为供体,对硝基苯基葡萄糖苷和木糖苷为受体,最终合成产率 84% 纤维二糖和产率 81% β -(1 $\rightarrow$ 3)连接的低聚木糖。以此为受体可进一步合成 79% 产率的三糖和 64% 产率的四糖。Mori 等^[65]通过合成一种脂质类化合物包被糖基水解酶,从而抑制水解副反应,催化甘露低聚糖合成,收率接近 80%。

酶具有极高的区域选择性和立体选择性,可以在不需要保护基团的情况下进行精确的合成反应。虽然酶法合成寡糖应用效率较高,但需要确定合适的体外酶促反应条件以克服热力学障碍。因此,供体糖的过量比例需要达到 10 倍/摩尔以上,才能达到较高的产率。供体糖的合成过程中需要通过化学合成硝基苯酚糖苷产生合适的离去基团。这些技术在大规模合成中的应用成本相对较高^[66]。

2.2.2 化学法制备技术 化学法制备寡糖方法包括传统糖化学合成技术、酸催化聚合反应以及近期的熔盐合物体系技术。糖化学合成需要多步反应路径及合适的分离纯化方法,而且合成过程中需要保护基团掩盖羟基固有的亲核反应性,从而仅使特定位置的羟基暴露,作为亲核试剂与另一受体糖单元发生区域选择性加成反应^[67]。常用的催化剂或保护策略包括二丁基氧化锌、二芳基硼酸、苄基醚、三氯乙酰亚胺等,实现以可控的方式精确合成理想寡糖结构^[68]。然而,当使用溶剂添加剂 N,N-二甲基甲酰胺或乙腈时,可在非参与性保护基条件下生成 α -1,2-顺式糖苷。化学合成的立体选择性受多种因素影响,其中保护基团最为关键。具有电子吸引特性的保护基团如苄基醚可稳定 S_N2 型反应和 S_N1 型反应的电子缺陷跃迁态^[69]。Singh 等^[70]通过在糖供体 2 位羟基引入 2-O-乙基醚保护基团合成产率 60% 以上且仅为 α -1,2 构型的葡二糖化合物。Crich 等^[68]将合成的硫代甘露糖苷为供体,合成产率 80% 以上且 β : α 比例 20:1 的二糖化合物。

与需要多步保护基操作的传统化学合成法不同,浓无机酸直接糖基化法制备寡糖更为便捷。浓硫酸或浓磷酸可作为兼具溶剂与脱水剂功能的反应介质,催化单糖直接发生糖基化反应生成寡聚糖。美国威斯康星大学潘学军教授团队系统研究了在浓硫酸体系中葡萄糖的糖基化行为,发现通过调控酸浓度(72 - 84wt%)和反应温度(50 - 70 $^{\circ}$ C),可在抑制葡萄糖过度脱水生成 5-羟甲基糠醛的同时,获得产率可观的低聚葡萄糖^[71]。

熔盐合物体的弱 Brønsted 酸性不仅能自上而下催化木质纤维素类降解为低聚糖,而且能自下而上催化葡萄糖或二糖直接糖基化为低聚糖。未酸化的 LiBr $\cdot$ 3.2H₂O 中 Li⁺对原位生成的水分子具有强吸附能力,抑制寡聚体的再水解,显著提高了产物选择性与收率^[72]。以麦芽糖为底物时,MSH 体系能保留其初始的 α (1 $\rightarrow$ 4)糖苷键,合成出以 α (1 $\rightarrow$ 4)和 α (1 $\rightarrow$ 6)为主的 α -型寡聚糖,实现了糖苷键类型的可控构建^[73]。在纤维素与葡萄糖共反应体系中,MSH 可诱导形成含 α (1 $\rightarrow$ 3)分支结构的寡聚糖,分支结构有效削弱纤维素链间氢键作用,降低链间黏附力,促进纤维素剥离与水解^[74]。

表3 自下而上法合成低聚糖的产率和糖苷键

Table 3 Yields and glycosidic linkages of oligosaccharides synthesized via bottom-up approaches

方法	底物	制备反应条件	产物	产率	糖苷键类型及聚合度	参考文献
酶法	甘露糖	β -1,2-甘露糖苷磷酸化酶催化,在1当量ATP中聚合	甘露低聚糖	40%	β -(1 $\rightarrow$ 2) 3	[59]
酶法	纤维二糖氟化物	纤维素酶为催化剂	低聚葡萄糖	71%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 6	[61]
酶法	β -木二糖基氟化物	木聚糖酶活性的粗纤维素酶催化聚合	低聚木糖	72%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 23	[62]
酶法	α -葡萄糖基氟化物	突变糖合成酶催化	低聚葡萄糖	84%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 2	[64]
化学法	全武装糖基供体	2-O-(三甲氧基苯硫醇)乙基醚作保护基团	α -葡萄糖苷	60%	α 型 3	[70]
化学法	纤维素/玉米芯	100mg原料溶酸化MSH中,110℃加热2h	低聚葡萄糖	87.5%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 2-6	[72]
化学法	葡萄糖/纤维二糖/麦芽糖	在0-160mM HCl的MSH中,130℃反应3h	低聚葡萄糖	66.6%	α -(1 $\rightarrow$ 4), α -(1 $\rightarrow$ 6), β -(1 $\rightarrow$ 4), α -(1 $\rightarrow$ 2), 2-12	[73]
化学法	DGP聚合新戊酰基-葡萄糖	去保护基团,聚合	低聚葡萄糖	62%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 20	[75]
化学法	苯基1-硫代糖吡喃糖苷	苯硼酸作葡萄糖临时基团	低聚葡萄糖	79-94%	β -(1 $\rightarrow$ 6) 2	[76]
化学法	硫代糖苷或硫代亚胺酸酯	[bmim][OTf]作促进剂,活化硫代糖苷和三氯乙酰亚胺糖基供体	葡萄糖苷	78%	β 型 2	[77]
化学法	纤维素	3g纤维素溶解在MSH中,130℃,5h,活性炭和沸石分离低聚糖	低聚葡萄糖	90.4%	β -(1 $\rightarrow$ 4) 4-11	[29]
化学法	纤维素	溶解在MSH中130℃反应4h,合成吸附剂实现分离	低聚葡萄糖	78.4%	β -(1 $\rightarrow$ 4) —	[31]
酶法	α -葡萄糖基氟化物	以 α -葡萄糖基氟化物为供体,4-硝基苯基葡萄糖苷为受体,35℃反应15h	海带二糖	61%	β -(1 $\rightarrow$ 3) 2	[78]
酶法	葡萄糖	TsBglI酶催化葡萄糖糖基转移反应	龙胆低聚糖	144.3 g·L ⁻¹	β -(1 $\rightarrow$ 6) 2	[79]
酶法	葡萄糖/ β -D-葡萄糖-1-磷酸	曲二糖磷酸酶为催化剂	曲糖低聚糖	—	α -(1 $\rightarrow$ 2) 2-7	[80]

3 低聚糖的分离纯化

低聚糖的纯度直接影响其生物活性及市场应用价值。通常,高纯度的低聚糖产品($\geq 90\%$)常直接用作食品营养强化剂添加到保健品、婴幼儿配方奶粉中,而中低纯度产品(35-70%)常用作食品配料用于饮料、烘焙食品、乳制品中。例如,国家标准《低聚糖质量要求 第3部分:低聚木糖》^[8]中规定了3种不同纯度的低聚木糖,即XOS-95型、XOS-70型和XOS-35型,其XOS含量分别应 $\geq 95\%$,70%,35%;对于糖粉型(P型)的XOS-95,除了XOS总含量 $\geq 95\%$ 之外,其有效成分木二糖至木四糖的含量不低于65%。

在低聚糖制备反应结束后,反应体系中通常存在未反应的糖底物(如单糖、二糖或多糖)、反应所用的酶催化剂、化学催化剂以及无机盐等杂质,需要通过分离纯化以提高低聚糖产品的纯度。实验室中常用的分离方法包含低压制备型凝胶渗透色谱、低压制备型液相色谱及制备型薄层色谱。工业上用于分离纯化低聚糖的技术主要包括膜分离、吸附色谱分离、微生物发酵分离等(如表4所示)。本小节对低聚糖的分离纯化方法进行介绍,包括各方法的原理、分离性能及优缺点。

3.1 膜分离

膜分离技术具有绿色环保、操作简单、能耗低、易于放大等优点,目前已广泛用于工业化分离纯化

表4 低聚糖的分离纯化方法汇总

Table 4 Summary of separation and purification methods for oligosaccharides

分离方法	分离效果	优点与缺点	参考文献
膜分离	(1)微滤与超滤:分离淀粉、蛋白质、酶、菌体等大分子杂质,负责预处理和澄清; (2)纳滤:通过不同孔径的纳滤膜,精确分离低聚糖与单糖、无机盐;低聚糖的分级精制、浓缩。	绿色环保、操作简单、易放大;易产生膜污染,需清洗再生	[81-84]
色谱分离	(1)活性炭吸附色谱:去除酚类色素、美拉德反应色素等非糖杂质;组分分级分离; (2)离子交换树脂色谱:脱盐,脱色,组分精制分离。可利用模拟移动床色谱实现连续化工业生产	成本较低、操作简便,脱色效果显著;分离精度有限 分离精度高、脱盐效果好,可连续化;设备成本高、需预处理、废液多	[85-88]
有机溶剂沉淀	利用低聚糖在不同溶剂(如丙酮、甲醇)中的溶解度区别,进行沉淀	操作简便;溶剂使用多、需回收再用	[29-30,72]

和浓缩低聚糖^[41]。通常,截留分子量(Molecular weight cut-off, MWCO)较高的超滤膜(如数百kDa)可用于分离低聚糖与大分子杂质,包括多糖、酶、微生物等,主要用于低聚糖粗产品的预处理及酶回收^[83];而截留分子量在200-1000Da内的纳滤膜可高效分离低聚糖中的无机盐、单糖、二糖等小分子杂质,实现低聚糖的脱盐、纯化、分离和浓缩,而不同孔径的纳滤膜液可用于低聚糖的分级精制。

美国威斯康星大学潘学军教授团队报导了纳滤技术对纤维素硫酸水解液中分离提纯纤维寡糖并按聚合度分级精制^[81],结果表明,耐酸性的纳滤膜XN45(MWCO 300-500)适用于纤维寡糖的初级纯化以除去硫酸和葡萄糖(去除率≥95%),耐酸性的纳滤膜NFG(MWCO600-800)适用于纤维寡糖的分级以富集DP2-8组分,质量回收率达80%。Goldbeck教授团队研究了串联纳滤膜对甘蔗渣中酶法提取的低聚木糖和纤维寡糖进行分级纯化^[82]。结果表明,第一级膜NP030(MWCO 500-600 Da)能截留DP4-DP6的低聚糖(截留率达76%),渗出液中主要是DP2-DP3(截留率24-34%);第二级膜DK(MWCO 150-300Da)主要用于进一步分离第一渗出液中的单糖(截留率<20%),且分级后的短链低聚糖(DP2-3)对益生菌的增殖效果显著提高。

研究表明,膜分离性能和效率受多种因素影响,包括操作模式(死端和错流)、操作参数(膜材料、温度、压力、进料浓度和pH)以及低聚糖底物的物理性质(如溶解度和黏度)^[83]。由于低聚糖的多组分性质及高溶质浓度,其在膜中的传质相当复杂,需要通过AI与机器学习用于膜材料筛选、操作条件优化和性能预测;此外,通过酶膜偶联反应器、多级纳滤等连续膜系统,可以提高膜分离效率、产品纯

度和工艺经济性;通过研究新型膜材料以提升其选择性和抗污染性,也是未来研究发展的重点方向^[84]。

3.2 活性炭吸附色谱分离

活性炭吸附色谱常用于低聚糖益生元的脱色,以除去酚类色素、美拉德反应色素等非糖杂质,这些色素杂质会直接影响低聚糖的感官性能、纯度及生物活性。活性炭是一种廉价的吸附剂,具有较大的比表面积和孔容,吸附容量高、吸附能力强,因此常被用作填料对低聚糖粗产品进行脱色精制。例如,南京林业大学勇强教授团队利用颗粒活性炭对半乳甘露低聚糖进行脱色精制,发现最佳条件下酚类色素和美拉德色素的脱除率达到91.08%和66.52%,同时半乳甘露低聚糖的回收率达93.53%^[89]。低聚木糖在温度80℃、pH5.0、4%活性炭用量、处理1.5小时的条件下,脱色率可达81.40%^[90]。

此外,利用活性炭对不同分子量低聚糖组分的吸附能力差异性,通过吸附色谱分离技术能实现低聚糖不同聚合度组分的分级^[91]。研究表明,低聚糖在活性炭表面的吸附强度和最大吸附量,随着碳链的增长而明显提升。平均聚合度为8左右的短链低聚糖在活性炭上的吸附强度约为葡萄糖单糖的22倍^[29]。机理研究表明,糖类分子在活性炭上的吸附是由范德华力驱动的可逆物理过程,由于活性炭表面为疏水性,分子量大的低聚糖由于累积的轴向C-H基团而更疏水,相比于单糖会更容易被吸附在活性炭上,因此单糖会优先被洗脱下来,而低聚糖需要更高浓度的洗脱剂(如乙醇)才能解吸,实现分离。

3.3 离子交换色谱分离

离子交换树脂,如强酸性阳离子交换树脂和强

碱性阴离子交换树脂,已被广泛用于分离纯化低聚糖益生元,具有交换容量大、再生简单、操作便捷等优点^[92]。最常用于低聚糖分离纯化的是阳离子交换树脂,即磺酸基团功能化的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物(PS-DVB)。糖分子中的羟基能与磺化PS-DVB树脂中的反离子(如 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 等阳离子)通过静电作用形成络合物,根据络合物作用力的强弱差别实现糖组分的分离。例如,Raita教授团队通过Aminex HPX-87H阳离子交换柱分离低聚木糖中的木糖,结果表明,糖出峰顺序为: $X4-X6 < X3 < X2 < \text{葡萄糖} < \text{木糖}$,分离所得低聚木糖的纯度可达97.5%^[85]。Nobre教授团队通过UBK535钙型阳离子交换树脂实现了低聚果糖的高效分离,回收率达92%,纯度达90%^[87]。类似地,强碱性阴离子交换树脂(如季铵功能化乳胶等)能用于低聚糖的分离纯化,其分离效果取决于低聚糖的尺寸、糖苷键连接方式等因素。例如,早期研究表明,CarboPac PA-1阴离子交换色谱柱能成功分离1 $\rightarrow$ 3、1 $\rightarrow$ 4、1 $\rightarrow$ 6糖苷键异构体,且分子量较大的低聚糖的保留时间更长^[88]。目前阴离子交换色谱搭载脉冲安培检测器(HPAEC-PAD)成为适用于低聚糖分析检测的高分辨、高灵敏度且无需衍生化的方法。

目前,模拟移动床色谱(simulated moving bed chromatography)是一种连续色谱分离工艺。通过模拟固定相的逆向移动,可实现低聚糖组分的高效分离,大幅提高吸附剂的效率、减少洗脱剂消耗,尤其适用于工业化生产。例如,Xu等人采用Dowex Monosphere99/310(K^+ 型)吸附剂,通过模拟移动床色谱连续分离低聚木糖中的木糖和阿拉伯糖,其回收率 $\geq 90\%$ 、纯度 $\geq 90\%$ ^[86]。Ray等人研究了低聚木糖X2-X7在模拟移动床色谱分离中各组分的吸附平衡与动力学差异,结果表明,各组分的吸附强弱顺序为:阿拉伯糖>木糖>低聚木糖,且聚合度较低的低聚木糖在树脂上的保留更强,实测低聚木糖的纯度为83.2%,回收率85.7%^[93]。

3.4 有机溶剂沉淀法

有机溶剂沉淀法是一种简单便捷从溶剂中分离低聚糖的方法。通过向低聚糖溶液中加入小分子醇等低聚糖的不良溶剂,形成醇-溶剂配位,剥离溶剂分子与低聚糖分子固有的配位,降低低聚糖在溶剂中的溶解度,促进低聚糖以固体形式析出,小分子醇溶剂可以通过简单经济的减压蒸馏回收循环,适合工业化生产。通过向溶液中加入甲醇^[29]、正

丁醇^[72]等小分子醇溶剂,降低了低聚葡萄糖和熔盐之间的吸附作用力,实现了低聚糖的沉降分离,低聚糖收率分别达到90.4%和84.3%。由于正丁醇沸点较高,通过萃取搅拌法实现正丁醇与低聚糖的分离。之后,经过净化的正丁醇可以通过分液漏斗与水分离,实现溶剂的循环回收利用。

4 低聚糖的组分及结构表征

低聚糖通常是不同聚合度、不同糖苷键型异构体的复杂混合物,对低聚糖的组成成分和化学结构的准确表征,对其生物活性研究及后续高值化应用至关重要。按照糖苷键型的数量,低聚糖可分为均质低聚糖(同种糖苷键型, homogeneous oligosaccharides)和异质低聚糖(两种或以上的糖苷键型, heterogeneous oligosaccharides)。例如,由纤维素、半纤维素通过自上而下法水解而得的纤维寡糖、低聚木糖是不同聚合度的均质低聚糖混合物;由葡萄糖底物通过自下而上法合成的低聚葡萄糖则是不同聚合度的异质低聚糖混合物,其糖苷键型与聚合度的组合具有多样性,对其组分的表征更具有挑战性。因此,本节针对低聚糖的组分和结构表征方法进行介绍,主要包括色谱法、质谱法等现代表征技术。

4.1 组分分析

目前,高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)是分析低聚糖组成成分的最常用方法,具有无需衍生化处理、灵敏度高等优点。南京林业大学徐勇教授团队采用HPAEC-PAD(CarboPac PA200分析柱)成功分析了4种木质纤维素水解液中的低聚糖组分,实现了一步法同时分离和定量多种线性低聚糖混合物,包括低聚木糖(XOS, X2-X6)和纤维寡糖(COS, C2-C5),其出峰时间通常随着聚合度的增大而增大^[94]。此外,HPAEC-PAD也能高效分离含有不同糖苷键的低聚糖混合物,例如酶法合成的低聚异麦芽糖(IMO)中含有 α -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键、 α -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键连接的低聚糖共50余种,包括异麦芽二糖、异麦芽三糖、麦芽三糖、潘糖(panose)等等,聚合度分布从2到10不等,此外还检测到葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、赤藓糖醇等杂质^[95]。低聚糖组分的定量分析依赖于外标物,但对于聚合度较大且糖苷键种类多的低聚糖,难以购买到市售的分析纯外标,无法直接定量,只

能以类似结构(如相同聚合度、不同糖苷键)的化合物作为外标物实现间接定量。

4.2 聚合度表征

低聚糖的聚合度表征方法包含色谱法与质谱法。色谱法是分析低聚糖聚合度最常用的方法,具体包括薄层色谱法(TLC)、高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)、高效液相色谱法(HPLC)、凝胶渗透色谱法(GPC/SEC)(图4)。TLC是一种快速、经济的半定量分析方法,通过硅胶板或纤维素板分离和显色剂显色,依靠斑点位置可初步判断低聚糖的聚合度组成,通常聚合度小的组分迁移位移更大^[71]。TLC适用于工艺开发时快速检测低聚糖的聚合度分布,其精度和分辨率较有限。HPAEC-PAD和HPLC是分析低聚糖聚合度的常用色谱法,此二法能够高效分离不同聚合度的低聚糖组分,通过外标法实现对聚合度分布和相对含量的定量分析。通常HPAEC-PAD和HPLC适用于测定聚合度在2-10之间的低聚糖,而GPC/SEC更适用于测定聚合度更大、分布更广的低聚糖。GPC/SEC主要用于测定低聚糖的平均分子量和分子量分布,由于水相GPC/SEC通常对低聚糖的分离程度有限,因此通常需要对低聚糖(通常分子量较大、水溶性差)进行衍生化处理,再进行有机相GPC分析。例如,低聚葡萄糖与异氰酸苯酯进行衍生化反应后转化为具有紫外吸收的三苯基氨基甲酸酯(VWD 270nm),通过有机相GPC(四氢呋喃溶剂)和聚苯乙烯标准品可测得低聚糖的聚合度,通过峰面积计算可得出聚合度的相对分布^[96](图4(d))。

质谱法是分析低聚糖分子量和化学结构的重要工具,常用的质谱技术包括基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-TOF MS)、电喷雾质谱(ESI-MS)等。中性的低聚糖,如低聚木糖、低聚葡萄糖等,可在不衍生化的条件下通过正离子模式的MALDI-TOF MS或ESI-MS进行分子量和聚合度的表征。如图,通过MALDI-TOF MS表征由葡萄糖自下而上合成的低聚葡萄糖混合物,其图谱中存在DP 2-9的组分(G_nNa^+ , m/z 365.3-1500.3, 间隔162.1)^[96]。类似地,通过MALDI-TOF MS表征由玉米秸秆制备的低聚糖混合物,结果显示除了低聚葡萄糖之外,还存在线性的低聚木糖(X_nNa^+ , m/z 305.2-1230.1, DP 2-9, 间隔132.1Da)和同时含有葡萄糖和木糖单元的异质低聚糖($G_mX_nNa^+$)^[22]。目前,研究者开发了半定量MALDI-TOF MS表征方法,通过加入内标物

(如麦芽七糖、 β -环糊精等)并比较内标物与待测低聚糖分子中各组分峰高的比值,成功对低聚糖的聚合度分布和相对含量进行了半定量^[22,71,96-97]。

4.3 糖苷键表征

4.3.1 核磁共振波谱法表征糖苷键 核磁共振波谱(NMR)是解析低聚糖中糖苷键连接方式的强有力工具,尤其是二维核磁共振技术,包括COSY、HSQC、TOCSY和NOESY。NMR解析糖苷键型的核心是识别“结构报告基团”(structure-reporter group)的特定氢质子,这些氢质子通常位于 δ 4.0 - 3.5的氢质子密集区之外,对于区分不同的糖苷键型至关重要^[100]。通过系统的信号归属策略,研究者可以首先利用 1H - 1H COSY和 1H - 1H TOCSY谱归属吡喃葡萄糖单元中的氢质子,再通过 1H - ^{13}C HSQC谱归属相应的碳原子,接着利用NOESY、ROESY和HMBC谱分析短距离的原子间相互作用,最终构建出完整的连接模型。如图5所示,在2D 1H - ^{13}C HSQC谱图中, α -糖苷键的端基碳-氢相关信号通常出现在 $\delta^1H/\delta^{13}C$ 4.9 - 5.1/98 - 100ppm范围内,而 β -糖苷键的信号则出现在 $\delta^1H/\delta^{13}C$ 4.3 - 4.6/103 - 104ppm。不同连接位置也会导致端基信号产生可区分的位移,例如, α -(1 $\rightarrow$ 6)、 β -(1 $\rightarrow$ 6)、 α -(1 $\rightarrow$ 4)、 β -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键对应的端基信号的化学位移均存在明显差异(图5(a)-(d))。除了定性的结构鉴定,NMR还可用于糖苷键组成的半定量分析。通过对HSQC谱图中不同端基异构信号的积分面积进行比较,可以估算出各类糖苷键的相对含量^[71,96]。如图5(e)所示,针对化学法自下而上合成的低聚葡萄糖,通过该方法计算得出(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键最为丰富,约占51%,其次是(1 $\rightarrow$ 3)、(1 $\rightarrow$ 1)、(1 $\rightarrow$ 4)和(1 $\rightarrow$ 2)键。这种半定量分析为研究不同合成条件下糖苷键的分布规律提供了重要手段。NMR技术的优点在于样品无需衍生化处理、用量极少即可完成检测,尤其适合分析结构复杂的低聚糖混合物。然而,该技术对样品的纯度要求较高,样品必须充分溶解于氘代溶剂中,以避免信号重叠导致的归属错误。

4.3.2 质谱法表征糖苷键 负离子模式的质谱技术,通过断裂低聚糖分子中的糖苷键或跨糖环裂解以及碎片的质子峰信号,能够识别糖苷键和糖单元序列信息。如图6(a)所示,低聚糖跨糖环裂解可以产生不同的A型离子,主要用于解析糖苷键序列,而源自糖苷键断裂的B型和C型离子主要用于糖单元序列和支化解析。例如,利用负离子模式的

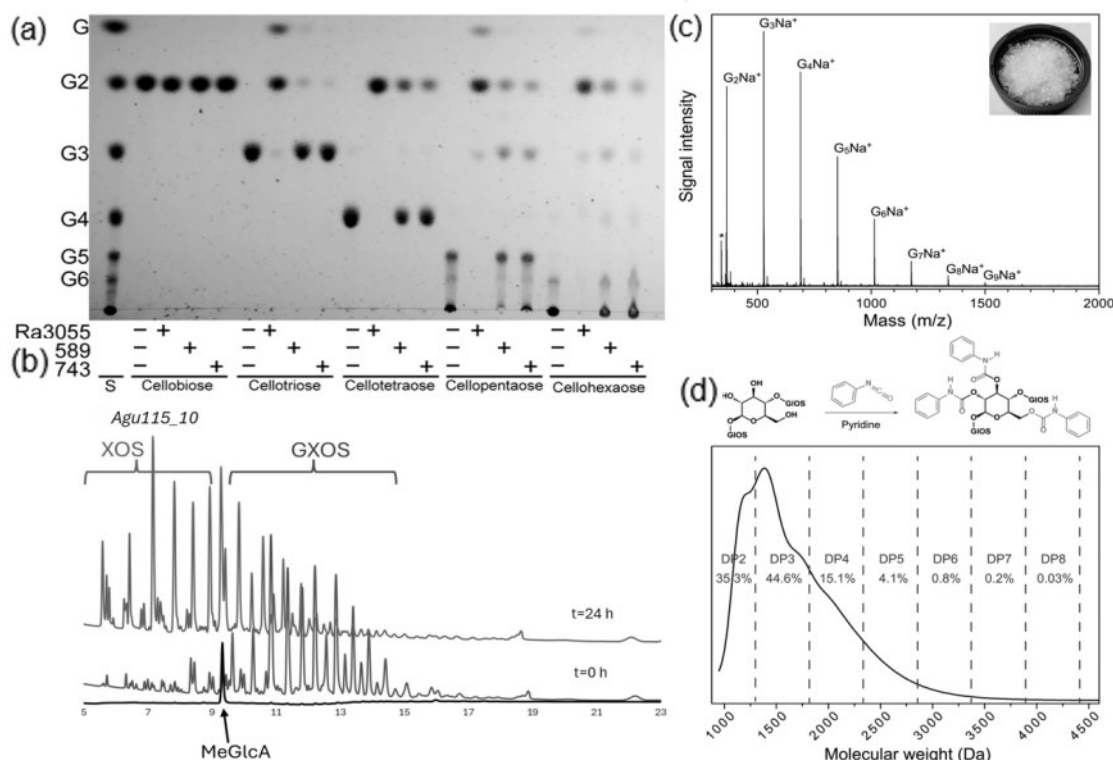


图4 低聚糖的聚合度表征方法:(a)纤维寡糖的薄层色谱图^[98];(b)低聚木糖及衍生物的HPAEC-PAD色谱图^[99];(c)低聚葡萄糖的MALDI-TOF MS图^[96];(d)低聚葡萄糖的衍生化反应及GPC色谱图^[96]

Fig.4 Characterization methods for the degree of polymerization of oligosaccharides: (a) TLC of cellobiosaccharides^[98]; (b) HPAEC-PAD of xylooligosaccharides and their derivatives^[99]; (c) MALDI-TOF MS of glucooligosaccharides^[96]; (d) GPC of glucooligosaccharides^[96]

MALDI-TOF MS/MS 表征并区分(1→3)、(1→4)和(1→6)糖苷键的低聚葡萄糖(分别缩写为Lam-7、Malto-7和Dex-7),结果表明,Lam-7仅产生C型离子,而Malto-7和Dex-7主要形成A型离子并伴有微量C型离子,且(1→4)和(1→6)键可以通过其特征碎片进行区分^[101-102]。

另一种解析糖苷键的质谱方法是甲基化分析^[103-104]。如图6(b)所示,以潘糖为例,首先将潘糖完全甲基化,将所有羟基转化为甲氧基。其次,将全甲基化的潘糖通过酸水解转化为部分甲基化的葡萄糖,然后将其还原为相应的糖醇。第三,将糖醇中新生成的羟基乙酰化,然后通过GC-MS鉴定部分甲基化糖醇中的乙酸酯。最后,根据糖醇乙酸酯中乙酰基的位置(例如,对于单体I、II和III,分别位于C1、C1和C6、以及C4),确定原始低聚糖中的糖苷键。甲基化方法不仅能提供关于糖苷键的明确信息,还有助于阐明单糖组成和分支位置。该方法的主要限制在于多步衍生化过程,耗时费力。

5 低聚糖的生物活性功能及应用

目前,低聚葡萄糖、低聚木糖和低聚甘露糖作为重要的生物质低聚糖,在食品、农业及化妆品等领域展现出独特的应用价值与市场潜力。

5.1 低聚糖在食品领域的应用

在食品领域,这三类低聚糖均被视为优质的益生元,能够靶向调节宿主肠道微生态,改善肠道健康^[105]。低聚葡萄糖具有抗消化性,难以被人体上消化道酶系降解,可完整到达结肠并被肠道菌群发酵利用,从而选择性促进双歧杆菌、乳酸菌等有益菌群的增殖,抑制病原菌生长,进而改善宿主肠道健康并增强免疫功能^[106-107]。Avila等^[108]从通过多阶段酶解甘蔗渣和咖啡壳提取低聚葡萄糖并模拟体外消化过程,发现在胃液环境中,甘蔗渣低聚葡萄糖中葡二糖和葡三糖出现了约9%的降解率,而咖啡壳低聚糖中葡三糖和葡四糖出现了约8%的降解率。此外,在体外消化性测试后,发现葡二糖和葡三糖是最易发酵的寡糖,能够显著促进嗜酸乳杆菌和短乳杆菌的生长。这些寡糖能够分泌短链脂肪

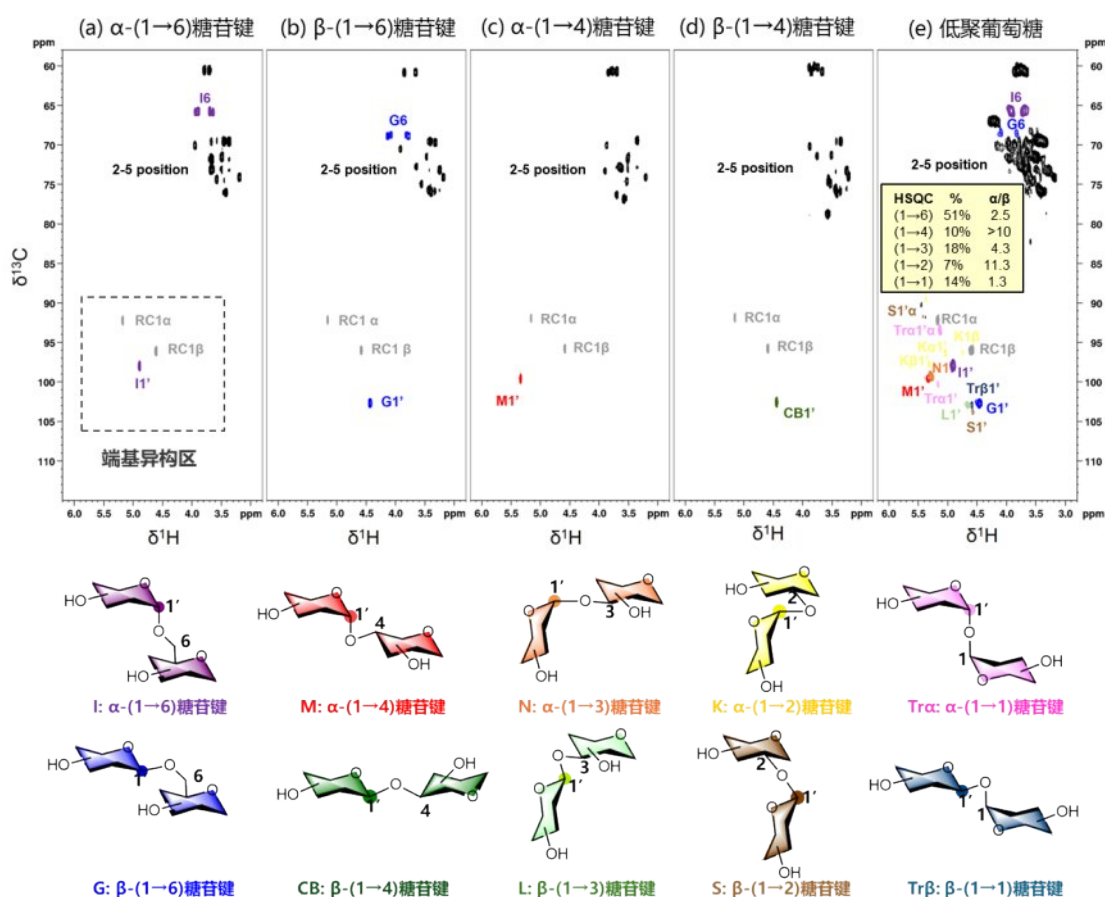


图5 低聚葡萄糖分子中不同糖苷键型的定性与定量表征: 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR图谱及相应糖苷键的化学结构^[71]

Fig.5 Qualitative and quantitative characterization of different glycosidic linkage types in glucooligosaccharides: 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectra and the chemical structures of the corresponding glycosidic linkages^[71]

酸,如乳酸、乙酸、丙酸和丁酸,降低下肠段的pH值,通过增加免疫调节性细胞因子的产生来促进结肠上皮细胞的生长。低聚葡萄糖的长度与其潜在性能和不同应用之间存在直接关系。短链低聚葡萄糖具有更强的益生元特性,而长链葡聚糖则具有更强的功能特性,可以作为多相系统中的结构剂或稳定剂使用^[109]。

低聚木糖以高益生元活性、低有效用量和优良的加工稳定性,在功能食品、低热量甜味剂和膳食补充剂的开发,以及维持血糖和促进矿物质吸收方面有积极作用^[110]。在婴儿奶粉、果汁、酸奶和碳酸饮料中添加低聚木糖时,能够刺激肠道双歧杆菌的生长,还能对整个肠道产生协同效应,促进人体肠道屏障的成熟。低聚木糖还具有抗炎的作用。Lecerf等^[111]研究发现低聚木糖能够有效抑制多种关键促炎因子的产生,例如白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-12p70(IL-

12p70)的分泌。能够抑制由脂多糖诱导的巨噬细胞NF- κ B信号通路的激活,从而在源头上抑制促炎因子的合成与释放。

低聚甘露糖同样具有有效调节肠道微生态,可通过影响肠道菌群代谢产物(如短链脂肪酸水平),增强机体免疫应答,并在调节脂质代谢、缓解炎症方面表现出巨大潜力。基于此,其在食品领域应用日益广泛。低聚甘露糖主要作为功能性益生元添入乳制品、烘焙食品及饮料中,以改善肠道健康。同时低聚甘露糖凭借其低热量、高保湿性及优良的加工稳定性,也用作膳食纤维强化剂和脂肪替代品。

5.2 低聚糖在农业领域的应用

在农业领域,低聚木糖,低聚葡萄糖和低聚甘露糖可作为动物饲料添加剂,通过优化动物肠道菌群结构、促进营养物质消化吸收以及增强抗病能力,显著改善养殖动物的生长性能和饲料转化效率,为减少抗生素使用提供可行替代方案^[112]。

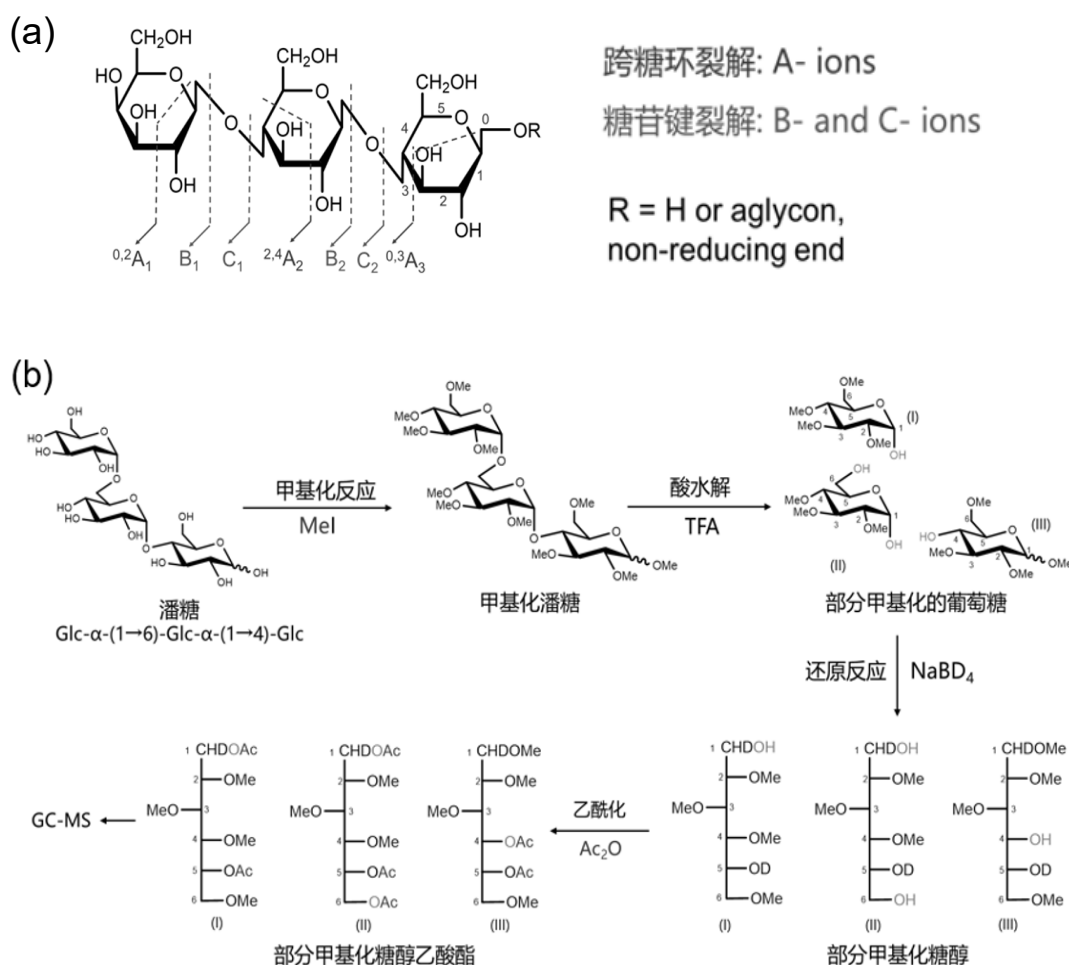


图6 (a)低聚糖分子在质谱分析时裂解模式;(b)低聚糖甲基化流程图

Fig 6 (a) Fragmentation patterns of oligosaccharide molecules during mass spectrometry analysis; (b) Flowchart of oligosaccharide methylation

低聚葡萄糖在断奶前的犊牛饮食中有助于营造更好的瘤胃环境,帮助犊牛发展消化纤维素能力^[113]。当雌激素浓度较低时,比如在更年期及以后时期,可以将低聚葡萄糖与异黄酮一起作为有效的饲料补充剂,以减少骨骼脆弱性^[114]。此外,在免疫调剂方面, β -葡聚糖通过刺激粒细胞、树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞和成纤维细胞来发挥免疫作用^[115]。 β -低聚葡萄糖作为一种历史悠久的免疫刺激剂,能够刺激包括蚯蚓、蜜蜂、虾、鱼、鸡、老鼠、兔子等多种生物的免疫反应。同时,低聚葡萄糖能被植物细胞表面受体识别,触发防御信号转导网络,激发与抗病相关的酶系和次生代谢产物合成网络,从而增强植株对病原菌侵染的抗性,在绿色农业和可持续植保方面具有重要应用前景^[116]。

低聚木糖同样能改善动物肠道菌群平衡、增强

免疫力。单独使用低聚木糖或与菊粉混合使用时,具有明显的益生元效应。例如, Samanta 等^[117]研究了低聚木糖对肉鸡血液生化特性的影响,发现在肉鸡饲料中添加 0.5% 的木糖寡糖后,血液生化指标发生了相应变化。Ding 等^[118]研究发现在产蛋鸡的饲料中添加低聚木糖能够改善其肠道健康,从而增加产蛋鸡肠道中双歧杆菌的数量以及盲肠中丁酸的含量。Wang 等^[119]发现在雏鸡饲料中添加低聚木糖能改善小肠绒毛高度与隐窝深度比值,增强肠道物理屏障功能。且血浆中免疫球蛋白(如 IgG、IgM)和细胞因子水平呈正向变化,从而使机体炎症状态减轻、体液免疫增强。

在基础饲料中添加低聚甘露糖可以有效提升动物的体重增长。在绵羊中,低聚甘露糖的添加提升了饲料的消化率与养分保留能力,改善了瘤胃发酵效果,增强了免疫调节功能,并提升了抗氧化能

力。此外,低聚甘露糖可以改善动物肠黏膜形态,调节紧密连接蛋白的分布,抑制与炎症反应和细胞凋亡相关的基因表达,同时促进了抗氧化相关基因的表达。

5.3 低聚糖在化妆品领域的应用

在化妆品领域,将低聚糖添加到化妆品中能够显著改善皮肤的水分保持能力,提高皮肤保水功能,减少皮肤表面的水分流失。此外,在局部应用低聚糖时还具有抗衰老和防晒作用,如低聚葡萄糖,低聚木糖等。

β -型低聚葡萄糖具有保湿与皮肤屏障调节功能,主要作用是促进皮肤共生菌生长和抑制引发皮炎的细菌,如葡萄球菌和绿脓杆菌。具体机制为低聚糖作为皮肤共生菌的直接碳源,会产生发酵代谢物,如乳酸和短链脂肪酸,从而调节皮肤的pH值,创造有利于共生菌生长的环境^[120]。而且,能够代谢低聚糖的皮肤微生物,也可以为那些不代谢低聚糖的微生物提供生长基质,从而通过共养方式加强共生菌群,防止病原体过度生长。此外,低聚葡萄糖和低聚木糖具有抗氧化活性,能够清除活性氧,如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基(OH)以及非自由基物质,包括过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧(1O_2)^[121]。具体机制为低聚糖代谢产生的短链脂肪酸能够诱导如谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)关键抗氧化酶的产生,从而减少在消化和结肠发酵过程中氧化产物的生成^[122]。

纤维寡糖与低聚木糖凭借其良好的生物相容性、低细胞刺激性和潜在抗氧化活性,正逐步成为敏感肤质适用型护肤产品的开发热点^[123]。这类低聚糖不仅能够通过清除自由基延缓皮肤老化,还可能通过调节皮肤表面微生态平衡,改善皮肤健康状态,满足消费者对温和、高效、天然来源护肤成分的日益增长需求。

综上,低聚葡萄糖、低聚木糖和低聚甘露糖作为绿色、可再生的生物质功能成分,在食品、农业及化妆品行业具有广阔的应用前景与市场价值。

6 结语

木质纤维素低聚糖因其来源广泛、具备益生元效益、绿色经济特性,在农业、食品、化妆品等领域应用广泛。本文系统总结了木质纤维素低聚糖,主要是低聚葡萄糖、低聚木糖和低聚甘露糖的制备技

术,分为自上而下水解法得均质低聚糖,以及自下而上定向合成新型糖苷键低聚糖两类策略。梳理了实验室及工业上不同分离技术对低聚糖纯化收率的影响,以及概括低聚糖结构表征和相应的功能应用领域,旨在为其未来发展提供参考。尽管当前的低聚糖研发生产,应用已取得显著成就,但以下三项关键问题仍需重点关注。

(1)低聚糖的制备效率与结构均一性之间难以实现平衡。当前自上而下法虽可实现规模化生产,但产物聚合度分布宽、功能组分占比低。自下而上法结构可控性强,但酶/菌株成本高、催化效率受限。因此,可发展多酶级联与工程菌株协同体系,结合固定化酶技术与代谢通路优化,在保障选择性的前提下提升时空产率。

(2)低聚糖结构相似度高造成分离效率低下。低聚糖各组分之间聚合度相近、糖苷键构型相似、理化性质差异微小(如溶解性、极性、电荷密度等),导致传统分离方法存在分辨率不足、产物回收率不理想等问题。需进一步发展基于分子尺寸、特异性识别的高效、连续化分离工艺。

(3)功能构效关系不清阻碍精准应用开发。不同聚合度、糖苷键连接方式及分支结构对益生元活性、免疫调节等功能的贡献机制尚未系统阐明。后期研究需建立标准化低聚糖结构库与高通量活性筛选平台,并且结合机器学习模型关联结构特征与生物活性,为特定功能导向的低聚糖理性设计与应用匹配提供依据。

参考文献

- [1] 王艺,张翔龙,汪庭宇,等. 推动绿色转型:木质纤维素生物质增值的未来展望与挑战[J]. 环境化学, 2026, **45**(1): 14-32.
Wang Y, Zhang X L, Wang T Y, et al. Driving the green transition: Future prospects and challenges for adding value to lignocellulosic biomass[J]. Environmental Chemistry, 2026, **45**(1): 14-32.
- [2] Cosgrove D J, Dupree P, Gomez E D, et al. How many glucan chains form plant cellulose microfibrils? a mini review[J]. Biomacromolecules, 2024, **25**(10): 6357-6366.
- [3] Rao J, Lv Z W, Chen G G, et al. Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application[J]. Progress in Polymer Science, 2023, **140**: 101675.
- [4] Zhu J Y, Pan X J. Efficient sugar production from plant biomass: Current status, challenges, and future directions[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2022, **164**: 112583.
- [5] Singh R D, Banerjee J, Arora A. Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, **5**(1): 19-30.

- [6] Ali K, Niaz N, Waseem M, et al. Xylooligosaccharides: a comprehensive review of production, purification, characterization, and quantification[J]. Food Research International, 2025, **201**: 115631.
- [7] Yan B W, Huang C X, Lai C H, et al. Production of prebiotic xylooligosaccharides from industrial-derived xylan residue by organic acid treatment[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, **292**: 119641.
- [8] GB/T 23528.3—2025 低聚糖质量要求 第3部分: 低聚木糖[S]. GB/T 23528.3—2025 Quality requirements for oligosaccharides: Part 3: Xylo-oligosaccharides[S].
- [9] 程少博,肖林,李莹,等. 一种低聚合度低聚木糖及其制备方法和应用: CN201611237155.2[P]. 2017-05-10.
Cheng S B, Xiao L, Li Y, et al. Xylooligosaccharide with low DP (degree of polymerization) as well as preparation method and application of xylooligosaccharide: CN201611237155.2[P]. 2017-05-10.
- [10] 程少博,肖林,孔令军,等. 一种高纯度低聚木糖制备工艺: CN201611235027.4[P]. 2017-05-10.
Cheng S B, Xiao L, Kong L J, et al. Process for preparing high-purity xylooligosaccharide: CN201611235027.4[P]. 2017-05-10.
- [11] Yan F, Lu X H, Tong S S, et al. Influence of different bond types and polymerization degrees of glucose polymers on the fermentation of *Inonotus obliquus* for the production of hypoglycemic activity polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, **309**: 142885.
- [12] Wiater A, Waśko A, Adamczyk P, et al. Prebiotic potential of oligosaccharides obtained by acid hydrolysis of α -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan from *laetiporus sulphureus*: a pilot study[J]. Molecules, 2020, **25** (23): 5542.
- [13] Jana U K, Suryawanshi R K, Prajapati B P, et al. Prebiotic mannoooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties[J]. Food Chemistry, 2021, **342**: 128328.
- [14] 徐鹤洋,夏彭奎,李斌,等. 甘露聚糖对肠道微生物的调控及其对糖脂代谢疾病的干预[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, **16**(7): 136-147.
Xu H Y, Xia P K, Li B, et al. Regulation of gut microbiota by mannans and their intervention in glucose and lipid metabolic diseases[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2025, **16**(7): 136-147.
- [15] Pongsapipatana N, Haltrich D, Keawsompong S. β -mannanase and its application in prebiotic (mannooligosaccharides) preparation[J]. Food Bioscience, 2025, **74**: 107840.
- [16] 王启尧. 水热预处理笋壳联产葡萄糖和低聚木糖[D]. 南京:南京林业大学, 2023.
Wang Q Y. Co-production of glucose and xylo-oligosaccharide from bamboo shoot shell via hydrothermal pretreatment[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2023.
- [17] Zhao J Y, Bian B, Wang X K, et al. Integrating ball milling assisted enzymatic hydrolysis of bamboo cellulose for controllable production of xylo-oligosaccharides, monosaccharides and cellulose nanofibrils[J]. Industrial Crops and Products, 2024, **209**: 118024.
- [18] Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros I, et al. Efficient utilization of hydrolysates from steam-exploded gardening residues for lactic acid production by optimization of enzyme addition and pH control[J]. Waste Management, 2020, **107**: 235-243.
- [19] Bhatia L, Sharma A, Bachheti R K, et al. Lignocellulose derived functional oligosaccharides: production, properties, and health benefits[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, **49** (8): 744-758.
- [20] Zeng M J, Cui X Y, Tang R, et al. Solvent-free synthesis of novel galactose-branched oligosaccharides from cellulose for potential prebiotics[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2026, **14** (18): 8821-8832.
- [21] Guo J M, Cao R, Huang K X, et al. Comparison of selective acidolysis of xylan and enzymatic hydrolysability of cellulose in various lignocellulosic materials by a novel xylonic acid catalysis method[J]. Bioresource Technology, 2020, **304**: 122943.
- [22] Zeng M J, Oh J H, van Pijkeren J P, et al. Synthesis of potential prebiotic oligosaccharides with diverse glycosidic linkages from corn stover via simultaneous hydrolysis and glycosylation[J]. Bioresource Technology, 2025, **429**: 132486.
- [23] Lv Y, Zhang Y F, Xu Y. Understanding and technological approach of acid hydrolysis processing for lignocellulose biorefinery: Panorama and perspectives[J]. Biomass and Bioenergy, 2024, **183**: 107133.
- [24] Gao K K, Wang H X, Chen Y, et al. Delignification of switchgrass for xylo-oligosaccharides production using sorbic acid hydrolysis [J]. Bioresource Technology, 2023, **385**: 129390.
- [25] Xie J C, Zhao J, Xu H, et al. A coupling strategy combined with acid-hydrothermal and novel DES pretreatment: Enhancing biomethane yield under solid-state anaerobic digestion and efficiently producing xylo-oligosaccharides and recovered lignin from poplar waste[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, **274**: 133443.
- [26] Mankar A R, Pandey A, Modak A, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass: a review on recent advances[J]. Bioresource Technology, 2021, **334**: 125235.
- [27] Xu X J, Gai J M, Li Y R, et al. Integrated acetic acid and deep eutectic solvent pretreatment on poplar for co-production of xylo-oligosaccharides, fermentable sugars and lignin antioxidants/adsorbents[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, **259**: 129138.
- [28] Gong L X, Feng D N, Liu J, et al. Ionic liquid depolymerize the lignocellulose for the enzymatic extraction of feruloylated oligosaccharide from corn bran[J]. Food Chemistry, 2022, **15**: 100381.
- [29] Liu Q Y, Ma Q Z, Sabnis S, et al. Production of high-yield short-chain oligomers from cellulose via selective hydrolysis in molten salt hydrates and separation[J]. Green Chemistry, 2019, **21**(18): 5030-5038.
- [30] Liu Q Y, Luo S, Fan W, et al. Separation of short-chain glucan oligomers from molten salt hydrate and hydrolysis to glucose[J]. Green Chemistry, 2021, **23**(11): 4114-4124.
- [31] Liu Q Y, Zhou L, Fan D, et al. Adsorption-enhanced glucan oligomer production from cellulose hydrolysis over hyper-cross-linked polymer in molten salt hydrate[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, **13**(44): 52082-52091.
- [32] Ávila P F, Goldbeck R. Fractionating process of lignocellulosic biomass for the enzymatic production of short chain cello-oligosaccharides[J]. Industrial Crops and Products, 2022, **178**: 114671.

- [33] Chu Q L, Li X, Xu Y, et al. Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture[J]. Process Biochemistry, 2014, **49**(8): 1217–1222.
- [34] Lin Y T, Huang P H, Wu J Y, et al. Valorization of brewed tea waste into functional cello-oligosaccharides via alkaline pretreatment and enzymatic – high-pressure processing[J]. Food Research International, 2026, **237**:119357.
- [35] Bhatia R, Lad J B, Bosch M, et al. Production of oligosaccharides and biofuels from Miscanthus using combinatorial steam explosion and ionic liquid pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2021, **323**:124625.
- [36] Zhang R, Li X Y, Cen X L, et al. Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm kernel cake, and investigations into its prebiotic activity[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, **49**: 64–71.
- [37] Woranuch K, Sankasa N, Sakamoto T, et al. Evaluation of mannooligosaccharide production from konjac by using recombinant mannanase of *Bacillus* sp. SWU60 as a prebiotic in vitro and in vivo[J]. Science, Engineering and Health Studies, 2021, **15**: 21030010.
- [38] Jana U K, Kango N, Pletschke B. Hemicellulose-derived oligosaccharides: emerging prebiotics in disease alleviation[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, **8**: 670817.
- [39] Li Y X, Yi P, Liu J, et al. High-level expression of an engineered β -mannanase (mRmMan5A) in *Pichia pastoris* for manno-oligosaccharide production using steam explosion pretreated palm kernel cake[J]. Bioresource Technology, 2018, **256**: 30–37.
- [40] Bhalla A, Bansal N, Kumar S, et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes[J]. Bioresource Technology, 2013, **128**: 751–759.
- [41] Zeng M J, van Pijkeren J P, PAN X J. Gluco-oligosaccharides as potential prebiotics: Synthesis, purification, structural characterization, and evaluation of prebiotic effect[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, **22**(4): 2611–2651.
- [42] Ma Q Z, Lin J Y, Guan M Z, et al. Enhanced cello-oligosaccharides production from cellulose hydrolysis in molten salt hydrate over lignin-based hyper-cross-linked polymer (LHCP) adsorption[J]. Applied Catalysis A: General, 2022, **644**: 118808.
- [43] Grandpierre C, Janssen H G, Laroche C, et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1 $\rightarrow$ 3) oligoglucans[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, **71**(2): 277–286.
- [44] Shrotri A, Lambert L K, Tanksale A, et al. Mechanical depolymerisation of acidulated cellulose: understanding the solubility of high molecular weight oligomers[J]. Green Chemistry, 2013, **15**(10): 2761–2768.
- [45] Helm R F, Young R A, Conner A H. The reversion reactions of d-glucose during the hydrolysis of cellulose with dilute sulfuric acid [J]. Carbohydrate Research, 1989, **185**(2): 249–260.
- [46] Xin D L, Yin H, Ran G Q. Efficient production of High-Purity manno-oligosaccharides from guar gum by citric acid and enzymatic hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2024, **401**: 130719.
- [47] Yang Y Q, Sun Y J, Zhang T, et al. Biofabrication, structure, and functional characteristics of a reuteran-like glucan with low digestibility[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, **305**: 120447.
- [48] Wei G Z, Shang W Q, Zhao G H, et al. Microwave-enzymatic cascade depolymerization of brewer's spent yeast β -glucan: From branch-on-branch structural insights to functional oligosaccharides production[J]. Food Research International, 2025, **221**: 117332.
- [49] de Souza P M, de Oliveira e Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry – A review[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, **41**(4): 850–861.
- [50] Padhan B, Ray M, Patel M, et al. Production and bioconversion efficiency of enzyme membrane bioreactors in the synthesis of valuable products [J]. Membranes, 2023, **13**(7): 673.
- [51] Lian Z N, Wang Y N, Luo J, et al. An integrated process to produce prebiotic xylooligosaccharides by autohydrolysis, nanofiltration and endo-xylanase from alkali-extracted xylan[J]. Bioresource Technology, 2020, **314**: 123685.
- [52] Khat-udomkiri N, Sivamaruthi B S, Sirilun S, et al. Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis for the extraction of xylooligosaccharide from rice husk[J]. AMB Express, 2018, **8**(1): 115.
- [53] Kim Y W, Fox D T, Hekmat O, et al. Glycosynthase-based synthesis of xylo-oligosaccharides using an engineered retaining xylanase from *Cellulomonas fimi*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2006, **4**(10): 2025–2032.
- [54] Bhattacharya A, Wiemann M, Stålbrand H. β -Mannanase BoMan26B from *Bacteroides ovatus* produces mannan-oligosaccharides with prebiotic potential from galactomannan and softwood β -mannans[J]. LWT, 2021, **151**: 112215.
- [55] Lairson L L, Henrissat B, Davies G J, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, **77**: 521–555.
- [56] Komatsu H, Abe Y, Eguchi K, et al. Kinetics of dextran-independent α -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan synthesis by *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase I[J]. The FEBS Journal, 2011, **278**(3): 531–540.
- [57] Dwevedi A. Basics of enzyme immobilization[M]//Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. Cham: Springer International Publishing, 2016: 21–44.
- [58] Ubiparip Z, Moreno D S, Beerens K, et al. Engineering of cellobiose phosphorylase for the defined synthesis of cellotriose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, **104**(19): 8327–8337.
- [59] Wu X C, Xing S, Ma D, et al. ATP regeneration by polyphosphate kinase powers efficient oligosaccharide synthesis catalyzed by glycoside phosphorylases[J]. ACS Chemical Biology, 2025, **20**(9): 2343–2349.
- [60] Planas A, Faijes M S. Glycosidases and glycosynthases in enzymatic synthesis of oligosaccharides. An overview[J]. Afinidad, 2002, **59**(500): 295–313.
- [61] Kobayashi S, Kashiwa K, Kawasaki T, et al. Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first in vitro synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst[J]. Journal of the American Chemical Society, 1991, **113**(8): 3079–3084.
- [62] Kobayashi S, Wen X, Shoda S I. Specific preparation of artificial xylan: a new approach to polysaccharide synthesis by using

- cellulase as catalyst [J]. *Macromolecules*, 1996, **29**(7): 2698–2700.
- [63] Nashiru O, Zechel D L, Stoll D, et al. β -mannosynthase: synthesis of β -mannosides with a mutant β -mannosidase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**(2): 417–420.
- [64] MacKenzie L F, Wang Q P, Warren R A J, et al. Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**(22): 5583–5584.
- [65] Mori T, Okahata Y. A variety of lipid-coated glycoside hydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents[J]. *Tetrahedron Letters*, 1997, **38**(11): 1971–1974.
- [66] Chen R. Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: an update[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, **102**(7): 3017–3026.
- [67] Codée J D C, Litjens R E J N, van den Bos L J, et al. Thioglycosides in sequential glycosylation strategies[J]. *Chemical Society Reviews*, 2005, **34**(9): 769.
- [68] Crich D, Sun S X. Direct formation of β -mannopyranosides and other hindered glycosides from thioglycosides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**(2): 435–436.
- [69] Fraser-Reid B, Wu Z F, Udodong U E, et al. Armed/disarmed effects in glycosyl donors: rationalization and sidetracking[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1990, **55**(25): 6068–6070.
- [70] Singh G P, Watson A J A, Fairbanks A J. Achiral 2-hydroxy protecting group for the stereocontrolled synthesis of 1, 2-*cis*- α -glycosides by six-ring neighboring group participation[J]. *Organic Letters*, 2015, **17**(17): 4376–4379.
- [71] Zeng M J, Li N, Astmann T, et al. Facile and efficient chemical synthesis of gluco-oligosaccharides (GlcOS) with diverse glycosidic linkages as potential prebiotics to promote the growth of probiotic bacteria[J]. *Food Research International*, 2023, **165**: 112436.
- [72] Zhou L, Liu Q Y, Ma Q Z, et al. Production of water-soluble sugar from cellulose and corn stover via molten salt hydrate impregnation and separation[J]. *Cellulose*, 2022, **29**(2): 879–891.
- [73] Wang M Z, Liu Q Y, Qiu X Q, et al. Structure-tunable glucan oligomer production from glucose and disaccharide glycosylation in an unacidified $\text{LiBr} \cdot 3.2\text{H}_2\text{O}$ molten salt hydrate [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2024, **12**(11): 4743–4753.
- [74] Tang R, Wang M Z, Zhang Z H, et al. Mitigating cellulose interchain forces to produce water-soluble glucan oligomers *via* forming branched glucan chains in molten salt hydrates[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, **13**(35): 14652–14662.
- [75] Nakatsubo F, Kamitakahara H, Hori M. Cationic ring-opening polymerization of 3, 6-di-O-benzyl- α -D-glucose 1, 2, 4-orthopivalate and the first chemical synthesis of cellulose[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**(7): 1677–1681.
- [76] Kaji E, Yamamoto D, Shirai Y, et al. Thermodynamically controlled regioselective glycosylation of fully unprotected sugars through bis(boronate) intermediates[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014, **2014**(17): 3536–3539.
- [77] Galan M C, Jones R A, Tran A T. Recent developments of ionic liquids in oligosaccharide synthesis: the sweet side of ionic liquids [J]. *Carbohydrate Research*, 2013, **375**: 35–46.
- [78] Pozzo T, Plaza M, Romero-García J, et al. Glycosynthases from *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase 1A: a comparison of α -glucosyl fluoride and *in situ*-generated α -glycosyl formate donors[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, **107**: 132–139.
- [79] Xia W, Sheng L L, Mu W M, et al. Enzymatic preparation of gentiooligosaccharides by a thermophilic and thermostable β -glucosidase at a high substrate concentration[J]. *Foods*, 2022, **11**(3): 357.
- [80] Chaen H, Nishimoto T, Nakada T, et al. Enzymatic synthesis of kojioligosaccharides using kojibiose phosphorylase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **92**(2): 177–182.
- [81] Zeng M J, Pan X J. Purification and fractionation of cellooligosaccharides synthesized from controlled cellulose hydrolysis by sulfuric acid using nanofiltration[J]. *Separation and Purification Technology*, 2024, **348**: 127800.
- [82] Ávila P F, de Mello A H F, Forte M B S, et al. Fractionation of functional oligosaccharides produced from sugarcane straw using serial nanofiltration membranes and their influence on prebiotic potential[J]. *Food Research International*, 2023, **172**: 113175.
- [83] Córdova A, Astudillo C, Illanes A. Membrane technology for the purification of enzymatically produced oligosaccharides[M]// *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 113–153.
- [84] Yuan X Y, Chen Z Y, Yao Z, et al. Efficient separation and purification of oligosaccharides: a systematic review on principles and applications of membrane separation technology[J]. *Food Bioengineering*, 2026, **5**(2): 290–313.
- [85] Preechakun T, Pongchaiphon S, Champreda V, et al. Separation of xylose and xylooligosaccharides from sugarcane trash extracted from hydrothermal process and followed by ion-exchange resin technique[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2025, **197**: 107826.
- [86] Li Y, Xu J, Yu W F, et al. Multi-objective optimization of sequential simulated moving bed for the purification of xylo-oligosaccharides[J]. *Chemical Engineering Science*, 2020, **211**: 115279.
- [87] Nobre C, Suvarov P, De Weireld G. Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation[J]. *New Biotechnology*, 2014, **31**(1): 55–63.
- [88] Hardy M R, Townsend R R. Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, **85**(10): 3289–3293.
- [89] 黄曹兴,陶昱恒,廖吉丽,等. 活性炭对半乳糖甘露低聚糖的脱色研究[J]. *林业工程学报*, 2022, **7**(1): 87–93.
- Huang C X, Tao Y H, Liao J L, et al. Investigation of decolorization of galactomanno-oligosaccharides by activated carbon[J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2022, **7**(1): 87–93.
- [90] 滕子涵,何婉蓉,张宁,等. 低聚木糖高效分离及其功能化修饰的研究进展[J]. *生物加工过程*, 1–14.
- Teng Z H, He W R, Zhang N, et al. Research progress on efficient separation and functional modification of xylo-oligosaccharides [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 1–14.
- [91] 徐建,李宏强,王悦海. 一种活性炭吸附乙醇解吸附同步生产不同品质低聚木糖的方法: CN201610878650.5[P]. 2017–02–15.
- Xu J, Li H Q, Wang Y H. Method using activated carbon absorption and ethanol desorption to synchronously produce

- different-quality xylooligosaccharide: CN201610878650.5[P]. 2017-02-15.
- [92] 乔威杰, 孙延平, 王雨, 等. 树脂在功能性低聚糖分离纯化中的应用进展[J]. 化学工程师, 2022, **36**(7): 59-62.
- Qiao W J, Sun Y P, Wang Y, et al. Application progress of resins in separation and purification of functional oligosaccharides[J]. Chemical Engineer, 2022, **36**(7): 59-62.
- [93] Li Y, Yu W F, Ding Z Y, et al. Equilibrium and kinetic differences of XOS2-XOS7 in xylo-oligosaccharides and their effects on the design of simulated moving bed purification process[J]. Separation and Purification Technology, 2019, **215**: 360-367.
- [94] Xu Y, Fan L, Wang X, et al. Simultaneous separation and quantification of linear xylo- and cello-oligosaccharides mixtures in lignocellulosics processing products on high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection[J]. BioResources, 2013, **8**(3): 3247-3259.
- [95] Madsen L R II, Stanley S, Swann P, et al. A survey of commercially available isomaltooligosaccharide-based food ingredients[J]. Journal of Food Science, 2017, **82**(2): 401-408.
- [96] Li N, Wang Z N, Qu T J, et al. High-yield synthesis of glucooligosaccharides (GIOS) as potential prebiotics from glucose via non-enzymatic glycosylation[J]. Green Chemistry, 2019, **21**(10): 2686-2698.
- [97] Seipert R R, Barboza M, Niñonuevo M R, et al. Analysis and quantitation of fructooligosaccharides using matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2008, **80**(1): 159-165.
- [98] Devendran S, Abdel-Hamid A M, Evans A F, et al. Multiple cellobiohydrolases and cellobiose phosphorylases cooperate in the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 8 to degrade cellooligosaccharides[J]. Scientific Reports, 2016, **6**: 35342.
- [99] Leontakianakou S, Le S B, Sundin A, et al. Novel GH115 xylan α -1, 2-glucuronidases with distinct preferences for xylan-derived oligomers and polymers[J]. Protein Science, 2026, **35**(5): e70571.
- [100] van Leeuwen S S, Leeftang B R, Gerwig G J, et al. Development of a ¹H NMR structural-reporter-group concept for the primary structural characterisation of α -D-glucans[J]. Carbohydrate Research, 2008, **343**(6): 1114-1119.
- [101] Huang C C, Yan J Y, Zhan L P, et al. Linkage and sequence analysis of neutral oligosaccharides by negative-ion MALDI tandem mass spectrometry with laser-induced dissociation[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, **1071**: 25-35.
- [102] Wang J Q, Zhao J, Nie S P, et al. Matrix assisted laser desorption ionization - tandem time-of-flight - mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) characterization of oligosaccharides: structural identification and differentiation[J]. Analytical Letters, 2023, **56**(13): 2152-2171.
- [103] Xu L P, Sha D D, Ren R F, et al. Methylation in ambient ion source enables direct isomer differentiation of oligosaccharides by tandem mass spectrometry[J]. Carbohydrate Polymers, 2026, **373**: 124493.
- [104] Fernando L D, Yang X, Archer-Hartmann S, et al. Mass spectrometric determination of site-specific *O*-acetylation in rhamnogalacturonan I oligomers[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2026, **37**(5): 1160-1172.
- [105] da Silva M F, Batista J J, Colunga A, et al. Effect of Xylo-oligosaccharides and cello-oligosaccharides obtained from Agro-industrial wastes on the modulation of the human gut microbiota in vitro[J]. Food Research International, 2026, **223**: 117908.
- [106] da Silva M F, Bueno D, Goldbeck R. Challenges and trends in the industrial production and application of cellooligosaccharides[J]. Current Opinion in Food Science, 2025, **63**: 101308.
- [107] Liu X Q, Hu K K Y, Haritos V S. Enzymatic production of cello-oligosaccharides with potential human prebiotic activity and release of polyphenols from grape Marc[J]. Food Chemistry, 2024, **435**: 137562.
- [108] Ávila P F, de Melo A H F, Goldbeck R. Cello-oligosaccharides production from multi-stage enzymatic hydrolysis by lignocellulosic biomass and evaluation of prebiotic potential[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, **85**: 103335.
- [109] Ávila P F, Silva M F, Martins M, et al. Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, **37**(5): 73.
- [110] Sabanci K, Gulec S, Buyukkileci A O. An ex vivo model for evaluation of prebiotic activity of xylan and xylooligosaccharides[J]. Food Research International, 2025, **211**: 116461.
- [111] Lecerf J M, Dépeint F, Clerc E, et al. Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties[J]. British Journal of Nutrition, 2012, **108**(10): 1847-1858.
- [112] Rao Z Y, Li Y, Yang X P, et al. Diet xylo-oligosaccharide supplementation improves growth performance, immune function, and intestinal health of broilers[J]. Animal Nutrition, 2024, **17**: 165-176.
- [113] Kido K, Tejima S, Haramiishi M, et al. Provision of beta-glucan prebiotics (cellooligosaccharides and kraft pulp) to calves from pre- to post-weaning period on pasture[J]. Animal Science Journal, 2019, **90**(12): 1537-1543.
- [114] Fujii S, Takahashi N, Inoue H, et al. A combination of soy isoflavones and cello-oligosaccharides changes equol/*O*-desmethylangolensin production ratio and attenuates bone fragility in ovariectomized mice[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2016, **80**(8): 1632-1635.
- [115] Novak, M, Vetvicka V. β -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action[J]. Journal of Immunotoxicology, 2008, **5**(1): 47-57.
- [116] Sun G Z, Xiao Y, Yin H, et al. Oligosaccharide elicitors in plant immunity: Molecular mechanisms and disease resistance strategies[J]. Plant Communications, 2025, **6**(12): 101469.
- [117] Ribeiro T, Cardoso V, Ferreira L M A, et al. Xylo-oligosaccharides display a prebiotic activity when used to supplement wheat or corn-based diets for broilers[J]. Poultry Science, 2018, **97**(12): 4330-4341.
- [118] Ding X M, Li D D, Bai S P, et al. Effect of dietary xylooligosaccharides on intestinal characteristics, gut microbiota, cecal short-chain fatty acids, and plasma immune parameters of laying hens[J]. Poultry Science, 2018, **97**(3): 874-881.
- [119] Wang Q, Wang X F, Xing T, et al. The combined impact of xylo-oligosaccharides and gamma-irradiated Astragalus polysaccharides on growth performance and intestinal mucosal

- barrier function of broilers[J]. Poultry Science, 2021, **100**(3): 100909.
- [120] Liu-Walsh F, Tierney N K, Hauschild J, et al. Prebiotic colloidal oat supports the growth of cutaneous commensal bacteria including *S. epidermidis* and enhances the production of lactic acid[J]. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 2021, **14**: 73-82.
- [121] Vieira T F, Corrêa R C G, Peralta R A, et al. An overview of structural aspects and health beneficial effects of antioxidant oligosaccharides[J]. Current Pharmaceutical Design, 2020, **26**(16): 1759-1777.
- [122] Cao R Q, Wang B X, Bai T, et al. Structural and functional impacts of glycosylation-induced modifications in rabbit myofibrillar proteins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, **283**: 137583.
- [123] Zeng M J, Li Y, Cheng J, et al. Prebiotic oligosaccharides in skin health: benefits, mechanisms, and cosmetic applications[J]. Antioxidants, 2025, **14**(6): 754.