

溶菌酶对海洋生物高分子壳聚糖的降解研究

周 桂 黄在银 谭学才 梁致源 周 萍

(广西民族学院化学化工系 南宁 530006)

提要 用粘度法和吸光度法,研究了溶菌酶非专一性降解壳聚糖过程中温度、pH、时间、酶浓度、底物浓度对溶菌酶降解壳聚糖反应速度的影响,确定了以壳聚糖为底物的溶菌酶的一些催化特性:温度为 60 ℃,pH 值为 4.0 时,达到最大酶反应速度。0.5~4.0 h 内酶反应速度恒定;酶浓度在 0.5~4 U/ml 范围内,酶反应速度与酶浓度成线性关系。米氏常数 K_m 为 9.03×10^{-4} mol/L。

关键词 壳聚糖,溶菌酶,降解,反应速度

壳聚糖是自然界中存在的唯一的一种带阳离子的能生物降解的高分子聚合物,广泛存在于虾壳、蟹壳及真菌中,在工业、农业、医学、食品及生物、环保等领域都具有重要的应用价值^[1~3]。但由于壳聚糖分子量很大,溶解性差,在人体内不易被吸收而使它的应用受到极大限制。研究表明,低分子量的壳聚糖不仅易吸收,而且具有更强的生物活性,特别是分子量低于 10 000 的低聚糖更展现出其独特的生理活性和功能性质^[4]。

目前,降解壳聚糖的方法有 NaNO_2 降解法、酸降解法、氧化降解法^[5]、酶降解法^[6]、 γ 射线降解法^[7] 和 1989 年王伟等报道的超声波降解法。 NaNO_2 降解法、酸降解法等要引入一些化学物质,如浓盐酸、氢氟酸、过氧化氢等,使反应剧烈,反应操作困难,而超声波降解虽取得了较好的结果,但要在很稀的溶液状态下进行, γ 射线辐射又容易引起一些交联和歧化反应,而酶法降解因为其降解反应温和,易控制,易分离处理,不污染环境等优点,成为今后研究的主要方向。降解壳聚糖的酶可分为专一性酶和非专一性酶,目前发现除了甲壳质酶、壳聚糖酶的专一性降解作用外,其他酶对壳聚糖也有不同程度的非专一性降解作用。作者用溶菌酶来非专一性地降解壳聚糖,探讨了在不同的温度、酶浓度、pH 值、时间、底物浓度等条件下的催化特性。

1 材料与方法

1.1 材料

溶菌酶:广东凯微生物科技公司产品,分子量

14 400,酶活力为 10 000 单位/mg。

壳聚糖:来自虾壳,浙江玉环生物技术公司产品,酸碱滴定法^[8]测得脱乙酰度为 95.31%,粘均分子量为 6.09×10^5 。

1.2 方法

1.2.1 溶菌酶降解壳聚糖实验 将壳聚糖溶解于 pH3.5 的 HAc-NaAc 缓冲溶液,配制成 1.592 g/L 的溶液,取 80 ml 加入 2 ml 浓度为 120 U/ml 的溶菌酶溶液,在 50 ℃下反应,每隔一定时间取样测定粘均分子量。

1.2.2 粘均分子量测定 参考陈鲁生等 1996 年报道的粘均分子量测定方法,以 pH 值为 3.5 的 HAc-NaAc 为溶剂,将待测壳聚糖配成 1.600 g/L 的溶液,用乌氏粘度计于 30 ± 1 ℃下测定特性粘度 η ,代入 Mark-Houwink 方程: $\eta = K M^\alpha$, $\alpha = 0.93$, $K = 1.81 \times 10^{-3}$,求得粘均分子量 M_v 。

1.2.3 还原糖浓度及酶反应速度的测定 用还原糖法,参考 Imoto T. 等 1971 年报道的测定方法,并改进如下:在具塞的试管中加入 7 ml 经溶菌酶降解后的壳聚糖溶液,塞好试管口,在沸水中加热 5 min 使酶失活,然后加入 0.5 ml 0.5 mol/L 的碱性铁氰化钾溶液,摇匀,在波长为 420 nm 处,以直径为 2 cm 的比色皿,

第一作者:周桂,出生于 1969 年,在职硕士研究生,讲师,目前主要从事再生资源的生物转化研究。E-mail: gzxhougui@263.net

收稿日期:2001-11-08;修回日期:2002-01-09

测光密度 A_{420} , 再测出 7 ml 蒸馏水加 0.5 ml 0.5 mol/L 的碱性铁氰化钾溶液的光密度 A_{420} , 算出 $\Delta A_{420} = A_{420} - A_{420}$, 用 A_{420} 表示溶菌酶的相对酶活性。以葡萄糖胺作标准曲线, 根据 ΔA_{420} , 由标准曲线上查出还原糖摩尔浓度, 以单位时间内还原糖摩尔浓度的变化表示酶反应速度。

1.2.4 反应时间对酶反应速度的影响实验

取 pH 值为 3.5、浓度为 1.600 g/L 的壳聚糖乙酸盐溶液 80 ml 与 2 ml 浓度为 120 U/ml 的溶菌酶溶液在 50 °C 下反应, 每隔一定时间取样, 测定还原糖浓度。

1.2.5 酶浓度对酶降解反应速度的影响实验

取 pH 值为 3.5 的壳聚糖乙酸盐溶液 10 ml, 分别加入不同量的溶菌酶, 使体系的酶浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 U/ml, 在 50 °C 下反应 0.5 h, 然后测定酶反应速度。

1.2.6 底物 (壳聚糖) 浓度对酶降解反应速度的影响实验 以 pH 3.5 的 HAc-NaAc 缓冲溶液配制浓度分别为 0.800, 0.960, 1.120, 1.280, 1.440, 1.600 g/L 的壳聚糖溶液 20 ml, 加入 1.0 ml 浓度为 40 U/ml 的溶菌酶溶液, 在 50 °C 下反应 0.5 h, 测定酶反应速度。

1.2.7 pH 对酶降解反应速度的影响实验 分别以 HAc-NaAc 缓冲溶液配制 pH 值为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 浓度均为 1.600 g/L 的壳聚糖乙酸盐溶液 20 ml, 加入 1 ml 浓度为 40 U/ml 的溶菌酶液, 在 50 °C 下反应 0.5 h, 然后测定酶反应速度。

1.2.8 温度对酶降解反应速度的影响实验 取 pH 值为 3.5, 浓度为 1.600 g/L 的壳聚糖乙酸盐溶液 15 ml, 加入 0.5 ml 浓度为 40 U/ml 的溶菌酶, 分别在 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C 下反应 0.5 h 后, 测定各温

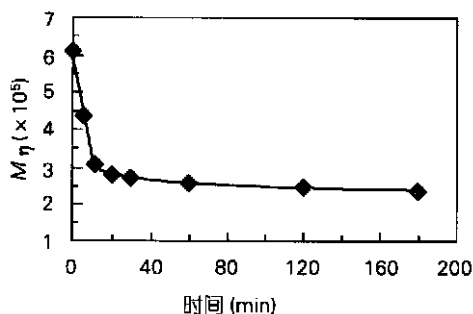


图1 溶菌酶对壳聚糖粘均分子量变化的影响

Fig.1 M_n changes of chitosan by treatment with lysozyme

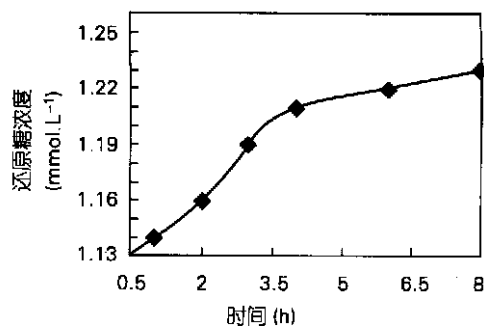


图2 反应时间对反应速度的影响

Fig.2 Effect of reaction time on reaction velocity

度下的酶反应速度。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖在溶菌酶作用下粘均分子量的变化

以溶菌酶对壳聚糖进行降解实验, 图1是壳聚

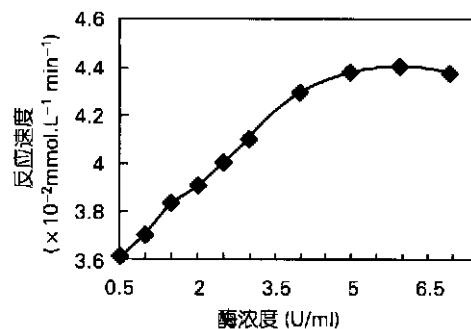


图3 酶浓度对反应速度的影响

Fig.3 Effect of enzyme concentration on reaction velocity

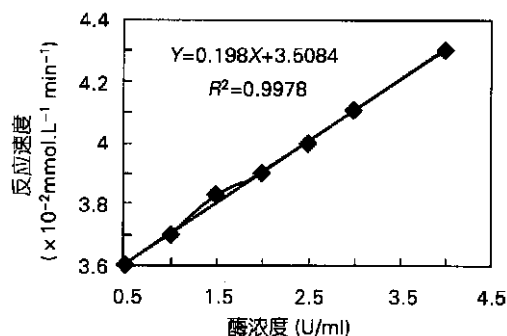


图4 酶浓度对反应速度的影响

Fig.4 Effect of enzyme concentration on reaction velocity

糖溶液在溶菌酶作用下的粘均分子量变化曲线。由图中可知,水解初期 10 min 内,分子量快速下降,60 min 后下降缓慢。说明溶菌酶催化壳聚糖降解可能是以内切方式作用于壳聚糖,断开糖链上的 β -1,4 糖苷键^[6]。

2.2 溶菌酶降解壳聚糖反应动力学

2.2.1 反应时间对酶降解反应速度的影响

反应时间对酶反应速度的影响结果如图 2 所示。由图得知,随着反应时间的延长,产物的还原糖含量增加,0.5~4.0 h 内呈线性关系 ($Y=1.1167+0.0234X$, $R=0.9973$),酶促反应速度保持恒定,此即为酶反应初速度。4 h 后还原糖浓度增加缓慢,说明酶反应速度逐渐降低,可能由于反应的进行使底物浓度降低,产物的生成而逐渐增大逆反应过程。

2.2.2 酶浓度对酶降解反应速度的影响 酶浓度对酶降解反应速度的影响结果如图 3 及图 4 所示,当壳聚糖浓度一定时,溶菌酶浓度在 0.5~4.0 U/ml 的范围内,随着酶量的增加,酶反应速度也随之增大,

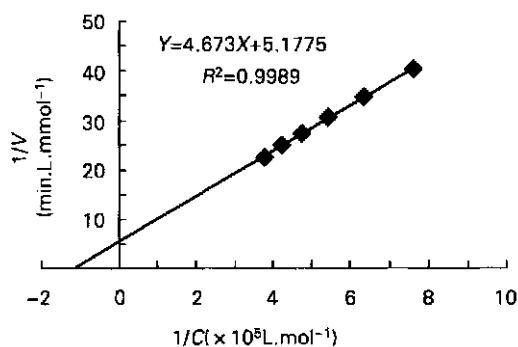


图 5 反应速度与壳聚糖浓度的双倒数曲线

Fig.5 Double reciprocal plot of reaction velocity versus chitosan concentration

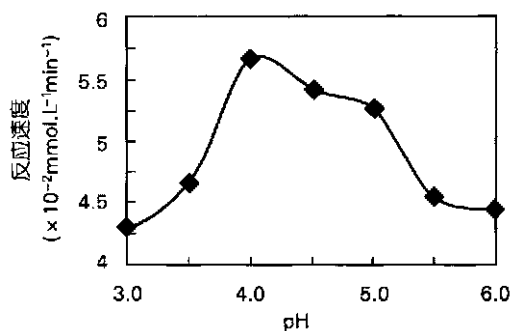


图 6 pH 对反应速度的影响

Fig.6 Effect of pH on reaction velocity

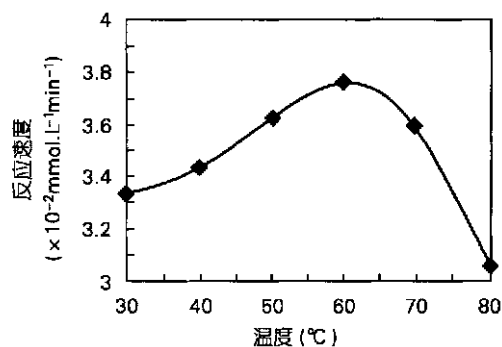


图 7 温度对反应速度的影响

Fig.7 Effect of temperature on reaction velocity

两者呈线性关系(图 4)。当溶菌酶浓度增加到 4.0 U/ml 以后,酶反应速度增加不多或稍有下降(图 3),说明酶与底物的结合逐渐达到饱和。

2.2.3 底物(壳聚糖)浓度对酶降解反应速度的影响 以壳聚糖浓度倒数为横坐标,反应速度的倒数为纵坐标作 Line Weaver-Burk 图(图 5),由双倒数图呈直线可得出,溶菌酶对壳聚糖的水解属米氏酶特征,符合米氏方程规律。米氏常数 K_m 为 $9.03 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。这一结果与前人研究的一些其他非专一性酶与壳聚糖的反应不同,1996 年夏文水报道,非专一性酶降解壳聚糖的反应不遵循普通的酶反应动力学模型方程。

2.2.4 pH 对酶降解反应速度的影响 pH 对酶降解反应速度的影响结果如图 6 所示。由图可知,溶菌酶降解壳聚糖的最适合 pH 值为 4.0,此时产物还原糖浓度最大,达到最大酶反应速度。

2.2.5 温度对酶降解反应速度的影响 温度对酶降解反应速度的影响结果如图 7 所示,30~60 °C 范围内,随着温度的升高,酶反应速度增大。温度超过 60 °C,由于酶部分变性失活,酶反应速度降低,60 °C 达到最大酶反应速度。前面在进行反应时间、酶浓度、底物浓度、pH 值对酶反应速度影响的单因子实验中,选择了比最大反应速度温度略低的温度(50 °C)作为反应温度,以确保酶活性不受温度的影响。

2.3 溶菌酶降解产物分子量的测定

在浓度为 3.000 g/L 的壳聚糖乙酸盐溶液(pH 4.0)中,加入一定量的溶菌酶,使体系中酶浓度为 2 U/ml,于 60 °C 下反应 12 h,然后取出,按实验方法 1.2.2 测定降解产物粘均分子量为 2.22×10^5 ,分子

量下降百分率为 63.6%。

3 结论

(1) 溶菌酶作为催化壳聚糖降解的非专一性酶,能有效地催化壳聚糖降解。本研究初步探讨了温度、pH 值、时间、酶浓度、底物浓度单因子对溶菌酶降解壳聚糖的影响;单因子优化条件下,壳聚糖分子量下降百分率为 63.6%。酶解反应符合米氏方程规律,米氏常数为 9.03×10^{-4} mol/L。

(2) 要使降解产物分子量降到 10 000 以下,还需进一步优化多因子的交互作用,寻求多种酶的协同作用。

主要参考文献

- 1 丁明、施建军、皇甫立霞等。壳聚糖微球的制备研究,化学世界,1998,12:36~640
- 2 赵国俊、姜涌明、胡健等。壳聚糖微囊的部分特性研究,功能高分子学报,1999,12(1):65~69
- 3 郭德春等。壳聚糖对药液絮凝作用的研究,功能高分子学报,1999,9(3):409~413

- 4 郑连英。甲壳低聚糖的研究进展,材料科学与工程,1999,17(3):97
- 5 覃彩芹、肖玲、杜予民等。过氧化氢氧化降解壳聚糖的可控性研究,武汉大学学报,2000,4:195~198
- 6 陈云、赵国俊、刘立军等。中性蛋白酶对壳聚糖的降解,功能高分子学报,1999,12(3):293~296
- 7 李治、刘晓非、徐怀玉等。壳聚糖的 γ 射线辐射降解研究,应用化学,2000,2:104~107
- 8 赵国俊、姜涌明、孙龙生等。不同来源壳聚糖的基本特性及红外光谱研究,功能高分子学报,1998,11:403~407

辅助参考文献

- 王伟、秦汶。脱乙酰基甲壳素的超声波降解,化学通报,1989,9:41~44
- 陈鲁生、周武、姜云生。壳聚糖粘均分子量的测定,化学通报,1996,4:57~58
- 夏文水。脂肪酶降解壳聚糖及其衍生物的研究,无锡轻工大学学报,1996,15(1):1~5
- Imoto T., Yagshita K.. A simple activity measurement of lysozyme, *Agri. Bio. Chem.*, 1971,35:1154~1156

HYDROLYSIS OF CHITOSAN BY LYSOZYME

ZHOU Gui HUANG Zai-yin TAN Xue-cai LIANG Zhi-yuan ZHOU Ping

(Chemical Department of Guangxi University for Nationalities, Nanning, 530006)

Received: Nov. 8, 2001

Key Words: Chitosan, Lysozyme, Hydrolysis, Reaction velocity

Abstract

The effects of reaction temperature, pH, time, substrate and enzyme concentration on the hydrolytic velocity of chitosan by lysozyme were investigated. The optimum temperature and optimum pH were 60 °C and 4.0 respectively. The reaction velocity in 0.5-4.0 hours is constant. Measurements taken in the lysozyme concentration range 0.5-4 U/ml showed a linear dependence of the reaction velocity on the enzyme concentration. The K_m value was 9.03×10^{-4} mol/L.

(本文编辑:张培新)