

酶促反应制备壳寡糖及壳寡糖分析

杨菊林, 韩宝芹, 刘万顺

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:用壳聚糖酶降解法对壳聚糖进行降解制备壳低聚糖,研究了温度、pH、底物浓度、脱乙酰度、反应时间对酶促反应的影响。对酶解产物进行 HPLC 分析,用 Bio-Gel P-4 柱对酶解产物进行初步分离。结果表明,壳聚糖酶降解壳聚糖的最适温度为 45 ℃,pH 为 6.0,最适底物质量分数为 6%,脱乙酰度越高酶解反应所得产物的数均相对分子质量越小,24 h 后酶解反应达到平衡,酶解产物壳寡糖水溶性极好。P-4 柱分离得到聚合度 20 以上,10~20,10 以下 3 种壳寡糖。

关键词:壳聚糖酶;壳寡糖;分析

中图分类号:Q814.9;Q556.2

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)06-0005-04

壳聚糖是由乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和氨基葡萄糖 (GlcN) 通过 β -1,4 键连接而成的天然线性高聚物,由于其相对分子质量大,水溶性差,在人体内不易被吸收,从而使其应用受到限制。壳聚糖的低聚物有优越的水溶性、保湿性,同时具有抗细菌、真菌,调节机体免疫及抗癌等功能^[1-3],越来越受到关注。目前制备可溶性壳寡糖主要有 4 种方法:酸解法、酶解法、碱解法和氧化降解法。其中,酸、碱降解法存在酸碱性过强、降解速度慢、降解产物聚合度小、产物纯化难等缺点,而酶解法以条件温和、产率高、反应易控制及所得低聚物聚合度适中等优点而倍受青睐^[4,5]。本实验室通过发酵得到高酶活壳聚糖酶,利用此酶降解壳聚糖,对降解条件进行探索,并对酶解产物进行初步分离纯化分析。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

壳聚糖(脱乙酰度 90%,购于青岛海汇生物工程公司),壳聚糖酶(本实验室发酵制备),色谱柱(KS-801 柱),层析树脂(Bio-Gel P-4, Bio-Red 公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解得到壳寡糖

壳聚糖溶液加入壳聚糖酶于 40 ℃ 搅拌反应 12 h,加入三氯乙酸(TCA)调节溶液 pH 至 3,放入 4 ℃ 冰箱中过夜,6 000 r/min 离心 30 min 去除变性的酶蛋白等,上清液用 KOH 调节 pH 至 8 后减压浓缩,缓慢加入 10 倍体积的无水乙醇中,沉淀寡糖,离心取沉淀,用无水乙醇重复洗涤 3 次,将得到的寡糖置于真空干燥器内干燥,得到酶解后的壳寡糖样品。

1.2.2 还原糖浓度及壳寡糖分子量测定

DNS 法测定^[6],分别取出 0.2 mL 酶解液加入 1.8 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS,沸水浴反应 5 min 显色,定容至 25 mL,于 520 nm 测吸光度 A_{520} 值,还原糖浓度与光密度值成正比。

将酶解后的壳寡糖样品充分干燥后采用乙酰丙酮法进行分子量测定^[7]。

1.2.3 最适酶反应温度的测定

分别将壳聚糖酶液 0.1 mL (9.08 U/mL) 与 5% 的壳聚糖醋酸溶液 5 mL 于 35,40,45,50,55,60 ℃ 保温 3 h 后,分别测定各温度下的还原糖浓度。

1.2.4 最适酶反应 pH 的测定

在 pH 分别为 4.6,5.0,5.4,5.6,6.0,6.4 的 0.2 mol/L HAc-NaAc 缓冲液中,将壳聚糖酶液与底物按 1.2.3 中比混合,45 ℃ 下反应 3 h,分别测定各 pH 下的还原糖浓度。

1.2.5 最适酶反应底物浓度的测定

分别将壳聚糖用醋酸溶液配成质量分数为 2%,4%,6%,8%,10% 的溶液,调 pH 为 6.0,分别取上述壳聚糖溶液 5 mL,加入 0.1 mL (9.08 U/mL) 壳聚糖酶液 45 ℃ 水浴反应 3 h,测定各体系中还原糖浓度。

1.2.6 最适酶量的测定

5% 壳聚糖醋酸溶液 40 mL,分别加入 9.08 U/mL 的壳聚糖酶液 1,2,5,10,20,30 mL,用蒸馏水定容至 70 mL,置于 45 ℃ 反应 12 h 后测还原糖浓度。

收稿日期:2005-04-06;修回日期:2005-04-18

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA70B04-07)

作者简介:杨菊林(1981-),女,浙江宁波人,硕士研究生,研究方向为生物化学与微生物,E-mail:yangjuln2002@hotmail.com;韩宝芹,通讯作者,电话:0532-82032105,E-mail:baoping@ouc.edu.cn

1.2.7 最适酶反应时间的测定

5%壳聚糖 40 mL 加入 1 mL 9.08 U/mL 酶 45℃ 水浴反应 36 h, 每隔 2 h 取一次样测还原糖量的变化情况。

1.2.8 不同脱乙酰度底物酶解情况

取脱乙酰度分别为 54.81%、62.11%、78.88%、90% 的壳聚糖底物用过量酶酶解后用 1.2.1 方法处理得到壳寡糖, HPLC 分析。

1.2.9 HPLC 分析酶解产物

KS-801 柱, 洗脱液 0.001 mol/L 含 0.02% (质量分数) NaN_3 的 NaOH, 流速 0.5 mL/min, 柱温 40℃, 壳寡糖质量分数 0.05%, 每次上样 20 μL 。

1.2.10 酶解壳寡糖分离

以脱乙酰度为 90% 的壳聚糖为底物, 酶解 24 h 后得到的寡糖配成 10% 质量分数。取 1 mL 上用氨水 (pH 9.0) 平衡的 Bio-Gel P-4 (1.5 cm \times 110 cm) 柱, 洗脱液为 pH 9.0 的氨水, 流速 0.25 mL/min, 检测波长 0.2 μm , 记录仪灵敏度 100 mV, 20 min/管, 分别收集各峰相对应的收集管。

2 实验结果

2.1 最适酶解反应温度和最适 pH 值

最适酶解反应温度和 pH 的测定结果见图 1。从图 1 可知, 温度和 pH 对酶促反应过程具有较大的影响。随着温度升高, 壳聚糖酶解反应速率增大, 最适酶解温度为 45℃, 当温度高于 50℃ 时, 由于壳聚糖酶的活力丧失, 造成壳聚糖酶解速度下降。

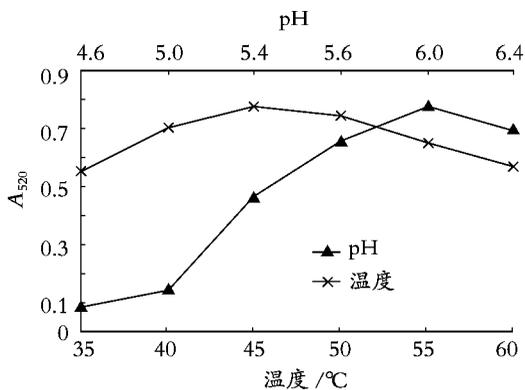


图 1 温度和 pH 对酶解反应影响

Fig. 1 The effects of temperature and pH on enzymatic hydrolysis

酶解的最适 pH 为 6.0。由于体系的 pH 对壳聚糖酶和壳聚糖都有较大影响, 一方面 pH 对酶分子上的氨基酸残基的解离状态有重要影响, 而酶分子侧链的不同解离状态可能直接影响与底物的结合和进一步催化反应, 从而影响到酶的活性; 另一方面, 在偏酸性环境中, 壳聚糖处于溶解状态, 分子伸展, 易于被酶降解。

2.2 最适酶解反应底物浓度和最适酶用量

最适酶解反应底物浓度和最适酶用量的测定结果见图 2。随着壳聚糖底物浓度的增加, 壳聚糖的酶解速度增大, 最适底物质量分数为 6%, 但底物浓度过大, 溶液的黏性也随之增大, 反应速度下降。

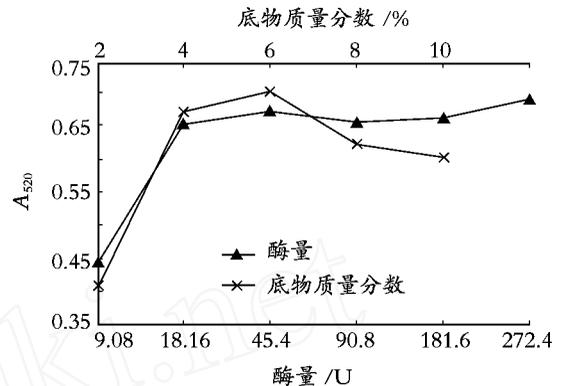


图 2 底物质量分数和酶量对酶解反应影响

Fig. 2 The effects of substrate concentration and enzyme quantity on enzymatic hydrolysis

对最适酶用量研究发现当酶活力增加到 18.16 U 时, 再增加酶用量壳聚糖的降解速度不再增加, 由此可得 9.08 U 的酶至少能降解 1 g 壳聚糖底物。

2.3 最适酶解反应时间

最适酶反应时间的测定结果见图 3。图 3 表明在酶解前 8 h, 还原糖量随时间延长而直线上升, 8 h 后还原糖随时间的变化就趋于缓慢, 24 h 后, 还原糖量就不随时间的延长而增大了。因此, 在酶解过程中选择 12 h 较经济。

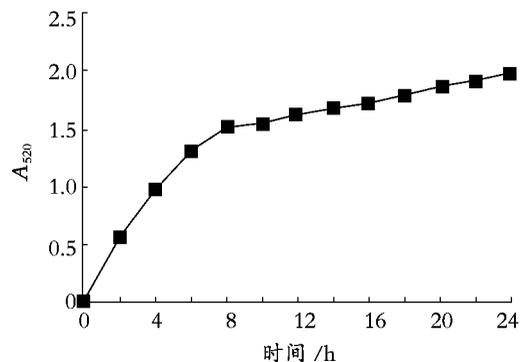


图 3 酶促反应过程中还原糖浓度的变化

Fig. 3 Changes of reductive sugar concentration during enzymatic hydrolysis process

2.4 不同脱乙酰度壳聚糖底物的酶解

不同脱乙酰度的壳聚糖底物经壳聚糖酶酶解后得到的壳寡糖, 进行 HPLC 分析, 结果见图 4~7。

由图 4~7 可见随着脱乙酰度的增大,其酶解产物的数均分子质量将降低,表现在高效液相色谱图上的结果显示为第二、三个峰逐渐变大。另外此酶对几丁质没有或有极微弱的降解活性。由此推测乙酰基的存在不利于酶解反应的进行。

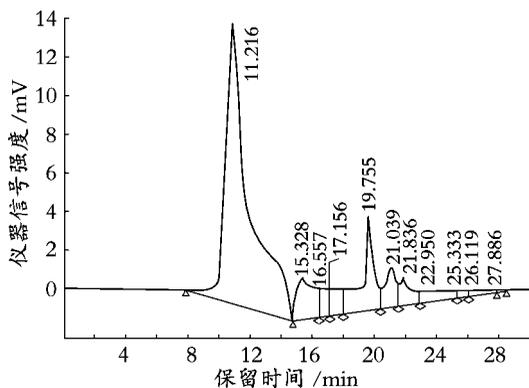


图 4 HPLC 分析脱乙酰度 54% 的壳聚糖酶解产物
Fig. 4 HPLC analysis result of chitooligosaccharide from degrading DD 54% chitosan

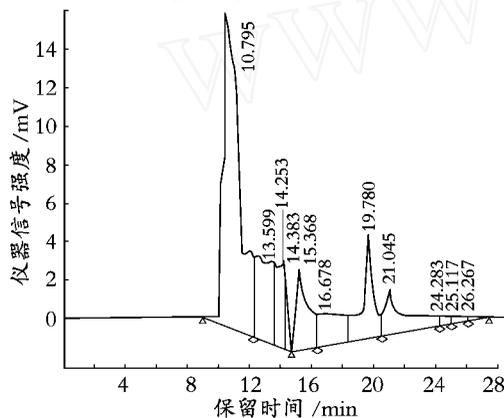


图 5 HPLC 分析脱乙酰度 62% 的壳聚糖酶解产物
Fig. 5 HPLC analysis result of chitooligosaccharide from degrading DD 62% chitosan

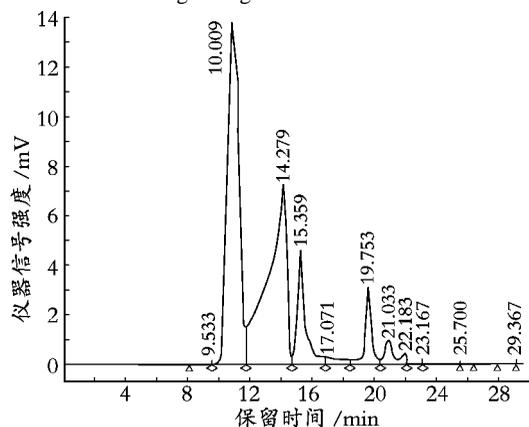


图 6 HPLC 分析脱乙酰度 78% 的壳聚糖酶解产物
Fig. 6 HPLC analysis result of chitooligosaccharide from degrading DD 78% chitosan

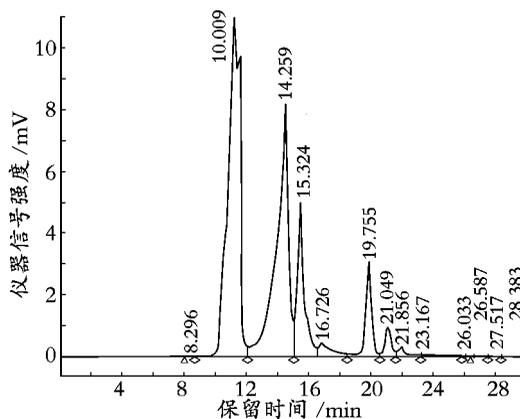


图 7 HPLC 分析脱乙酰度 90% 的壳聚糖酶解产物
Fig. 7 HPLC analysis result of chitooligosaccharide from degrading DD 90% chitosan

2.5 P-4 柱分离酶解寡糖结果

壳聚糖经壳聚糖酶降解后,经 P-4 柱分离,结果如图 8,洗脱曲线显示 4 个主峰,分别收集各峰(第一个峰 20~23 管,第二个峰 24~32,第三个峰 33~40,第四个峰 41~53)。各收集液减压浓缩,冷冻干燥后密封保存。用乙酰丙酮法测得各峰的数均相对分子质量分别为 4 011, 3 123, 2 906, 1 378,原料寡糖的数均相对分子质量为 2 400。由此推测第一个峰的寡糖聚合度在 20 以上,第二三峰的聚合度在 10~20,第四个峰的寡糖的聚合度在 10 以下,10 个聚合度左右的糖占大多数。

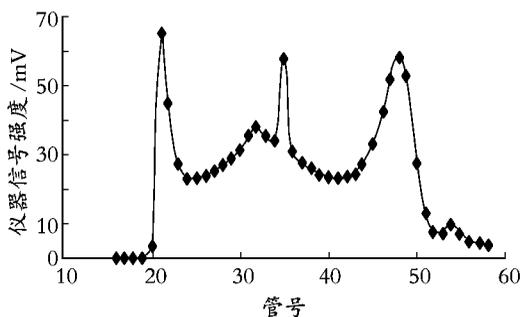


图 8 P-4 柱分离酶解产物壳寡糖
Fig. 8 Chromatogram of chitooligosaccharides on P-4 column

3 结论

近 20 年来,已经从微生物中开发了许多种壳聚糖酶,但这些酶酶活普遍较低,生产成本昂贵,难以实现商业化应用;另一方面,这些微生物降解壳聚糖得到的产物,其聚合度较低。本实验室筛选得到的菌所产的壳聚糖酶酶活较高,其酶解得到产物的数均相对分子质量 2 400,酶解反应条件温和,操作简便,可应用于工业大批量生产壳寡糖。

研究表明此酶解的最佳温度、pH 分别为 45 , 6.0,最佳底物质量分数为 6% ,最适酶量 9.08 U/g 壳聚糖,酶解的经济反应时间为 12 h。酶解过程黏度下降很快,脱乙酰度的提高酶解所得寡糖的数均分子质量降低,推测此酶为内切酶。酶解产物为淡黄色粉末,无味,在碱性条件下水溶性极好,通过初步分离纯化得到三组组分,其聚合度分别为大于 20, 10~20,小于 10。不同分子质量的寡糖具有不同生物学功能^[8],因此对酶解得到寡糖的初步分离为以后做活性研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Akira O. Microbial chitosanases: the degradation of chitosan and their application[J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1988, **62**(8):49.
- [2] Shigeo S. Immuopotentiating function of N-acetylchitooligosaccharides and chito-oligosaccharides [J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1988, **62**(8):1 241.
- [3] 板井和男. Development and application of chitio-oligosaccharides[J]. *New Food Industry*, 1989, **31**(6):17.
- [4] Uchida Y. Chitinolytic enzymes in Squid[J]. *Kichin, Kitosan Kenkyu*, 1998, **4**(2):182.
- [5] Somashekar D, Joseph R. Chitosanases-properties and applications: a review [J]. *Bioresouce Tech*, 1996, **55**(1):35.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994. 10.
- [7] 韩宝芹,位晓娟,房子,等. 乙酰丙酮法测定甲壳胺寡糖数均分子量[J]. *中国海洋药物*, 2004, **23**(6):12.
- [8] 李曙光,白雪芳,杜昱光. 壳寡糖的分离分析及其诱抗活性研究[J]. *中国海洋药物*, 2002, **90**(6):1.

Preparation and analysis of chitooligosaccharides by enzymatic hydrolysis

YANG Ju-lin, HAN Bao-qin, LIU Wan-shun

(Marine Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Apr. , 6, 2005

Key words: chitosanase; chito-oligosaccharides; analysis

Abstract: This paper describes the enzymatic hydrolysis process for preparing chitooligosaccharides. The effects of temperature, pH value, concentration and deacetylation degree of substrate, and reaction time on chitosan hydrolysis are studied. We also analyze the degraded material by HPLC and separate them by Bio-Gel P-4. Experiment results demonstrate the optimal temperature, pH value, concentration of substrate are 45 , 6.0, and 6% respectively. The average molecular weight becomes small with enhancing the deacetylation degree of substrate, and 24 hours later the reaction reaches balance. We obtain chitooligosaccharides with degree of polomerization over 20, between 10~20, and below 10 respectively by Bio-Gel P-4.

(本文编辑:刘珊珊)