

文章编号 :1009-038X(2002)02-0112-04

木瓜蛋白酶降解壳聚糖

苏 畅, 夏文水, 姚惠源

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要:通过粘度测定、还原端基测定和凝胶层析分子式量分布测定,研究了木瓜蛋白酶非专一性降解壳聚糖过程中温度、pH 值、反应时间和酶用量等因素对木瓜蛋白酶降解能力的影响,探讨了壳聚糖脱乙酰化度和相对分子质量与木瓜蛋白酶降解反应的关系.结果表明:木瓜蛋白酶在温度 40~45 ℃、pH 4.0~5.0 和酶用量 0.5%~10% 范围内,对壳聚糖的降解将随酶用量的增加而加快,但随脱乙酰度的升高而减慢.木瓜蛋白酶适合作用于数均分子式量在 20~5 万的虾壳聚糖.

关键词:壳聚糖;木瓜蛋白酶;水解;反应速率

中图分类号:TS 241;X 714

文献标识码:A

The Relationship between Structure of Chitosan and Papain Activity

SU Chang, XIA Wen-shui, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract:The effects of reaction temperature, pH, time and enzyme concentration on the hydrolysis of chitosan by papain were investigated. The relationship between hydrolysis and structure of chitosan (deacetylation degree and molecular weight) by papain was discussed. The results showed that a chitosan of low molecular weight and deacetylation degree was easier to be depolymerized.

Key words:chitosan; papain; hydrolysis; reaction velocity

木瓜蛋白酶(EC3.4.4.10)是一种活性部位含有巯基的高等植物蛋白酶,对酯和酰胺类底物表现出较高的活力,广泛应用于食品工业和药物的临床试验中.在涉及木瓜蛋白酶和甲壳素的文献中,报道了将木瓜蛋白酶固定化在甲壳素颗粒上,水解啤酒蛋白以除去啤酒冷藏后引起的浑浊.D Pantaleone (1992)等人在研究非专一性水解酶对壳聚糖的水解作用时,发现木瓜蛋白酶对壳聚糖具有较高的解聚作用^[1];R A A Muzzarelli 等人以甲壳素固定木瓜蛋白酶来水解壳聚糖乳酸盐,研究了木瓜蛋白酶的水解动力学^[2],但对其水解作用机理还不十分清

楚.因此,作者采用不同脱乙酰度和不同相对分子质量的壳聚糖,研究了木瓜蛋白酶对壳聚糖的水解作用,探讨了壳聚糖脱乙酰度和相对分子质量与木瓜蛋白酶水解作用的关系.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

木瓜蛋白酶:上海丽珠东风生物技术有限公司提供,酶活力 USP 6 000 U/mg;壳聚糖:脱乙酰化度 94.8%,水分 11%,灰分 0.5%,粘均分子式量 1.76×10^6 (除特别指明外,均为此原料);N-乙酰氨

收稿日期 2001-11-10; 修订日期 2002-01-08.

基金项目 教育部高等学校骨干教师资助计划资助.

作者简介 苏畅(1975-),女,江西南昌人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生.

基葡萄糖标样 Sigma 公司提供,其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖脱乙酰化度的测定 电位滴定法^[3]

1.2.2 壳聚糖粘均分子式量的测定 壳聚糖溶解于 0.2 mol/L 的醋酸溶液中,待全部溶解后,加入 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液,使壳聚糖溶液的质量分数为 1%。利用 0.1 mol/L HAC 和 0.2 mol/L NaCl 混合液稀释,得到不同的浓度,分别测定壳聚糖溶液的粘度。取 3 次数值的平均值,以浓度 c 对增比粘度 η_{sp}/c 作图,得到特性粘度 $[\eta]$,利用 Roberts 等人测得的粘度常数 0.92 进行相对分子质量的计算,方程式: $[\eta] = 1.81 \times M_r^{0.92}$ 。详见文献[4]。

1.2.3 还原糖测定 Imoto 改良法^[5],以 N -乙酰氨基葡萄糖做标准曲线。

1.2.4 相对分子质量分布的测定 Sepharose CL-6B 柱(1×100 cm),上样量:1.5 mL,体积流量:4.5 mL/h,20 min/管,洗脱液:0.1 mol/L 醋酸盐溶液,pH 4.2。Sepharose CL-6B 柱相对分子质量标定采用标准分子式量葡聚糖,相对分子质量分别为 10 500,72 000,200 000。洗脱液检测用壳聚糖含量测定方法。

1.2.5 壳聚糖含量测定 用移液管分别移取 1 mL 洗脱液于具塞试管中,再加入 4 mL 盐酸,塞好塞子,于 100 °C 水浴锅中水浴 8 h,使壳聚糖彻底水解。依次将水解后的糖液分别倒入各个小烧杯,加入一滴酚酞,用 5 mol/L 的氢氧化钠溶液调至刚好出现紫红色,再用 0.5 mol/L 的盐酸溶液回调至微红色。转入 25 mL 容量瓶,加水,定容。然后用 2 mL 的移液管移取糖液 2 mL 至具塞试管中,各加 1 mL 乙酰丙酮溶液,于 100 °C 水浴 30 min,然后取出冷却至室温。各个试管内分别加入 2 mL 无水乙醇、1 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液,振荡使得气泡完全溢出,再加入 4 mL 无水乙醇,于 60 °C 保温 1 h。取出在紫外可见光分光光度计上 530 nm 比色。详见文献[6]。

1.3 实验内容

1.3.1 反应条件对酶促反应的影响 称取一定量壳聚糖,溶解在 0.2 mol/L、pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,使壳聚糖质量分数至 1%,加入 1% 的木瓜蛋白酶溶液(酶底比),在 30~60 °C 反应 6 h,测定反应混合物中还原糖的释放值。同样测定不同 pH、酶底比对酶促反应的影响。

1.3.2 酶解反应过程中粘度的变化 称取一定量壳聚糖,溶解在 0.2 mol/L、pH 4.5 的醋酸-醋酸钠

缓冲液中,使壳聚糖质量分数至 1%,加入 1% 的木瓜蛋白酶溶液(酶底比),在 45 °C 于 AR1000 流变仪中反应,于剪切速率 200 s⁻¹(此剪切速率下不会造成机械降解)测其粘度变化,共记录 500 个点,绘制粘度随时间的变化曲线,并作粘度下降随时间变化的曲线。在最初 36 s 内的读数,因转子加速及溶液混合的影响而不考虑,取 36~108 s 间隔内的读数,计算其酶解初速度。

1.3.3 壳聚糖结构对酶促反应的影响 取不同乙酰化度和不同粘均分子式量的壳聚糖,溶解在 0.2 mol/L、pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,使壳聚糖质量分数为 1%,加入 1% 的木瓜蛋白酶溶液,在 40 °C 反应 6 h,测定反应混合物中还原糖的释放值。同时作不加酶的空白实验。

1.3.4 酶解壳聚糖产物的相对分子质量分布 称取一定量壳聚糖,溶解在 0.2 mol/L、pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,使壳聚糖质量分数为 1%,加入 10% 的木瓜蛋白酶溶液(酶底比),在 35 °C 水解反应 24 h,酶解产物液经 Sepharose CL-6B 柱分离。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对酶促反应的影响

木瓜蛋白酶对壳聚糖的降解作用在不同的条件下,反应过程的变化如图 1 所示。

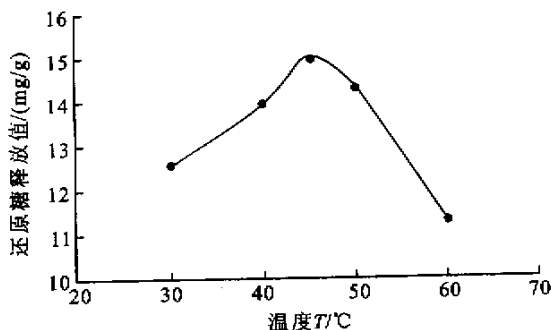


图1 温度对酶促反应的影响

Fig.1 The effect of temperature on enzyme reaction

随着温度的升高,在 30~60 °C 范围内,还原糖的质量分数增加,至 45 °C 时达到最高值,温度继续增加,酶反应下降,说明以壳聚糖为底物时,木瓜蛋白酶在高温下催化能力降低,木瓜蛋白酶在 40~50 °C 之间较为稳定。

由于壳聚糖在 pH 5.5 以上会出现沉淀,故选择 pH 3~5 范围考察 pH 的影响,图 2 表明,随着 pH 的增加,酶促反应程度加大,酶反应在 pH 4~5 较为稳定。图 3 表示,在酶量 0.5%~10% 的范围内,当壳聚糖的质量分数一定时,木瓜蛋白酶酶量

增加,降解产生的还原糖也增加,两者呈线性关系.在不加酶的空白实验中,反应 6 h 后,还原糖质量浓度由 0.04 mg/mL 变为 0.045 mg/mL,说明 0.2 mol/L 醋酸缓冲液对壳聚糖的降解释放还原糖的影响较小.因此可以以还原糖的释放值为指标来衡量反应进程.

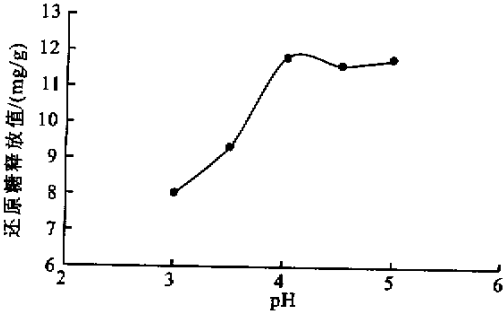


图 2 pH 对酶促反应的影响

Fig.2 The effect of pH on enzyme reaction

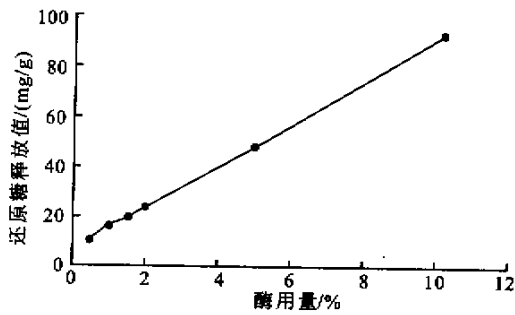


图 3 酶底比对反应的影响

Fig.3 The effect of ratio of enzyme to substrate on enzyme reaction

2.2 反应过程中粘度的变化

从图 4 粘度曲线中可以看出,在反应初始阶段,粘度迅速下降,反应 1 h 以后,粘度下降趋于平稳.在图 5 中亦可以看出,在反应 1 h 时,粘度降低 62%,反应至 2 h 时,粘度降低至 76%.因此,酶促反应 1 h 后反应速度变慢.其酶解初速度为 18 mPa·s/s.

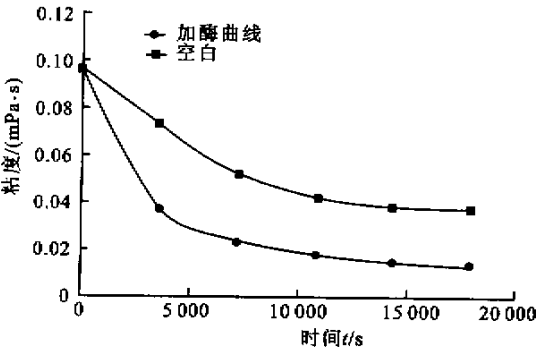


图 4 粘度随时间变化曲线

Fig.4 The curve of viscosity with time

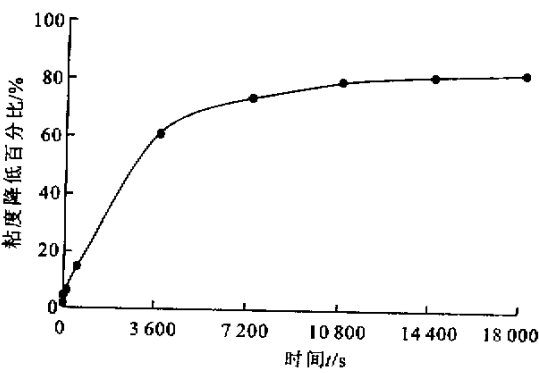


图 5 粘度下降百分比曲线

Fig.5 The curve of decreasing of viscosity

2.3 不同结构壳聚糖对酶促反应的影响

选取几种不同脱乙酰度和粘均分子式量的壳聚糖作为底物,在木瓜蛋白酶催化下进行水解,其结果见表 1.从脱乙酰度 86%~88% 的 4、6 号样品和脱乙酰度 93.2% 的 2、3 号样品的结果比较可以看出,粘均分子式量较小的壳聚糖比较大的易被水解.3 号和 7 号样品之间粘均分子式量相差不大,但水解效果相差较远,这可能是由于壳聚糖的来源不同,木瓜蛋白酶更适合于以虾壳聚糖为底物.

表 1 不同结构壳聚糖对木瓜蛋白酶水解作用的影响

Tab.1 The effect of different structure of chitosan on papain hydrolysis

样品	来源	脱乙酰度 (D.D)	粘均分子式量 (M_v)	还原糖释放值/(mg/g)
1	虾	72%	4.9×10^5	38.7
2	虾	93.2%	1.8×10^6	16.44
3	虾	93.2%	1.13×10^6	17.32
4	蟹	86%	1.11×10^6	19.41
5	蟹	90.7%	5.6×10^5	17.69
6	蟹	88.2%	5.2×10^5	16.61
7	蟹	93.2%	9×10^5	13.01
8	蟹	1.0	1.0×10^6	11.87

从粘均分子式量 50 万左右的 1 号和 6 号样品,及粘均分子式量 100~110 万的 3、4、8 号样品的比较可以看出,在同一粘均分子式量范围,样品的脱乙酰度越低,木瓜蛋白酶的作用越大,说明木瓜蛋白酶主要水解 GlcNAc—GLcN 之间的糖苷键.但由于脱乙酰度 1.0 的 8 号样品也能被木瓜蛋白酶水解,表明木瓜蛋白酶也可能水解 GLcN—GLcN 之间的糖苷键,这一点与一般的文献报道有所不同,有待进一步确证.

2.4 木瓜蛋白酶降解壳聚糖的相对分子质量分布
壳聚糖经木瓜蛋白酶水解的产物的相对分子质量分布见图 6. 标准分子式量葡聚糖在 Sepharose CL-6B 上的分离图谱见图 7. 相对分子质量标准曲线见图 8, 可见曲线的线性良好.

从图 6 中原料壳聚糖的柱分离曲线和反应 24 h 后水解产物的柱分离洗脱曲线的对比可以看出, 木瓜蛋白酶主要作用于数均分子式量 20~5 万之间(洗脱体积 40~55 mL)的壳聚糖, 水解产物的相对分子质量主要分布于 3~1 万之间. 而木瓜蛋白酶对于数均分子式量 70~20 万的壳聚糖部分(洗脱体积 30~40 mL)的水解作用较小. 在本实验中, 壳聚糖粘均分子式量和 Sepharose CL-6B 凝胶过滤色谱分子式量之间存在幂指数关系: $Y=0.0001X^{2.2962}$, Y 为凝胶过滤色谱分子式量(万道尔顿), X 为粘均分子式量(万道尔顿) 则数均分子式量 5 万即相当于粘均分子式量 110 万, 这与粘均分子式量得出的趋势相吻合. 图中相对分子质量分布曲线有拖尾现象, 这可能是由于壳聚糖上带有氨基与 Sepharose CL-6B 之间有吸引作用有关.

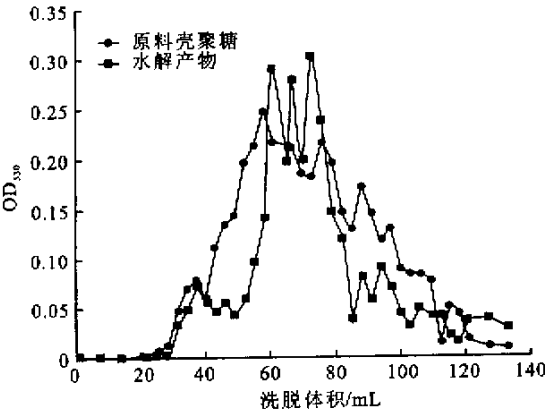


图 6 水解产物洗脱曲线

Fig. 6 The elution curve of hydrolysis product on Sepharose CL-6B

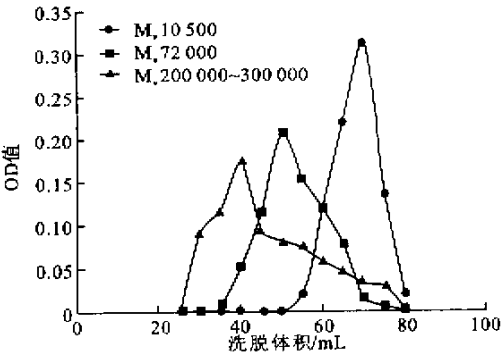


图 7 标准分子式量葡聚糖洗脱曲线

Fig. 7 The elution curve of standard molecular weight of dextran

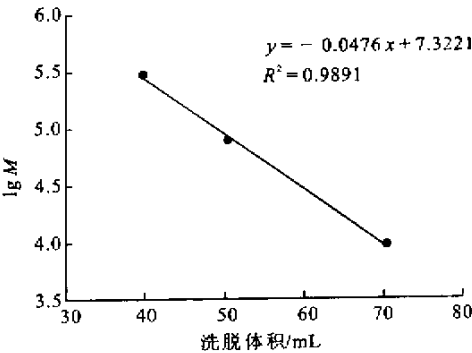


图 8 相对分子质量标准曲线

Fig. 8 The standard curve of molecular weight

3 结 论

- 1) 木瓜蛋白酶降解壳聚糖的最适反应条件为: 温度 40~45 ℃, pH 4.0~5.0, 反应 2 h, 酶用量 1% 此条件下, 酶解初速度为 18 mPa·s/s.
- 2) 木瓜蛋白酶适合作用于脱乙酰度较低的壳聚糖, 说明木瓜蛋白酶主要水解 GlcNAc—GlcN 之间的糖苷键, 但也可可能水解 GlcN—GlcN 之间的糖苷键.
- 3) 木瓜蛋白酶主要作用于数均分子式量 20~5 万的壳聚糖.

参考文献:

[1] DAVID PANTALEONE, MANSSUR YALPANI, MARK SCOLLAR. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis [J]. Carbohydr Res, 1992, 237 :325 - 332.

[2] RICCARDO A. MUZZARELLI A. Marco Tomasetti and Pierluca Ilari Depolymerization of chitosan with the aid of papain [J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16 :110 - 114.

[3] 林瑞询, 蒋苏滨, 张慕珊. 脱乙酰度测定方法 [J]. 化学通报, 1992 (3) :39~42.

[4] 陈鲁生, 周武, 姜云生. 壳聚糖粘均分子量的测定 [J]. 化学通报, 1996 (4) :57.

[5] IMOTO T, YAGISHITA K. A Simple activity measurement of lysozym [J]. Agri Biol Chem, 1971, 35 (7) :1154 - 1156.

[6] 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院合编. 食品分析方法 [M]. 成都 四川科学技术出版社, 1985. 144 - 148.