

文章编号:1673-1689(2011)06-0812-06

壳寡糖修饰多聚半乳糖醛酸酶优化条件研究

刘小林

(宜春学院 生命科学学院,江西 宜春 336000)

摘要:以水溶性低分子量壳寡糖作为修饰剂对已纯化的多聚半乳糖醛酸酶进行化学修饰,通过单因素试验和正交试验探讨 pH 值、温度、修饰时间、壳寡糖的用量等因素对修饰效果的影响和最佳修饰条件的优化筛选。结果表明,通过正交试验筛选出最佳修饰反应条件为:80 mg 活化的多聚半乳糖醛酸酶,反应体系中 pH 为 4.0,反应温度为 3 ℃,反应时间为 12 h,壳寡糖用量为 150 mg,修饰效果最佳。利用此条件对多聚半乳糖醛酸酶进行化学修饰具有显著的激活作用,修饰后酶的比活力是 340.10 U/mg protein,比修饰前提高了 153.42%。

关键词:壳寡糖;多聚半乳糖醛酸酶;化学修饰

中图分类号:Q 936

文献标识码:A

Study on Chemical Modification of Polygalacturonase with Chitosan Oligosaccharides

LIU Xiao-lin

(College of Life Science, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: Purified polygalacturonase (PG) was chemically modified with water soluble chitosan oligosaccharide (COS) as modifier. The optimum modification conditions were determined by the single factor tests and orthogonal tests and listed as follows: purified PG 80 mg, pH 4.0, temperature 3 ℃, reaction time 12 h, COS content 150mg. Under the optimum conditions, The specific activity of the modified PG was 340.10 U/mg protein, higher 153.42% than that of the unmodified PG.

Key words: chitosan oligosaccharide, polygalacturonase, chemical modification

利用大分子或小分子修饰剂对酶分子的侧链进行改造,以获得具有临床和工业应用价值的酶蛋白,是目前应用最广泛的酶化学修饰技术。多聚半乳糖醛酸酶(EC 3.2.1.15, polygalacturonase, 简称 PG)能随机地从多聚半乳糖醛酸内部打开 α -1,4-糖苷键,产生聚合度为 10~14 的寡聚半乳糖醛酸^[1]。

PG 在植物抗真菌感染机理研究,植物果实软化和脱落,种子成熟等基础领域有广泛的研究^[2-5]。此外,PG 在食品工业,农业,化妆品业,造纸业等领域也有广泛的应用,是当今国际生物科学研究领域的热点^[6-7]。目前,应用较多的小分子修饰剂主要有氨基葡萄糖、乙酸酐、丁酸酐、邻苯二酸酐等,而应

收稿日期:2010-11-12

基金项目:国家自然科学基金项目(10074016)。

* 通信作者:刘小林(1966—),男,江西高安市人,理学博士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。Email:LXL7519@yahoo.com.cn

用较为广泛的大分子修饰剂有右旋糖苷、聚乙二醇(PEG)、单氧甲基聚乙二醇(mPEG)、壳寡糖等。

壳寡糖也叫壳聚寡糖,也称几丁寡糖,学名 β -1,4-寡聚葡萄糖胺。壳寡糖是将壳聚糖经特殊的生物酶技术处理而得到的一种全新的产品,一般把由 20 个以下氨基葡萄糖组成的低聚壳聚糖称为壳寡糖。壳寡糖是水溶性较好、功能作用大、生物活性高的低分子量产品^[8-9]。壳寡糖能够与糖蛋白的侧链起作用,它可以与蛋白质的糖链连接,使糖链延长,从而改变蛋白质的分子构象,进而影响蛋白质分子的生物活性。壳寡糖作为酶化学修饰剂目前有报道仅用于蔗糖酶的化学修饰^[10],特别是低分子量的壳寡糖(相对分子质量小于 5 000)作为化学修饰剂应用于酶的化学修饰更未见报道。为了提高多聚半乳糖醛酸酶的催化活性,提升此酶在工业生产中的应用价值,本试验以水溶性低分子量壳寡糖(Chitosan oligosaccharide,简称 COS)作为修饰剂对已纯化的多聚半乳糖醛酸酶进行化学修饰,通过单因素试验和正交试验,探讨 pH 值、温度、修饰时间、壳寡糖的用量等因素对修饰效果的影响,筛选最佳的修饰条件,以图快速、廉价地提高 PG 的活力和稳定性提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

多聚半乳糖醛酸酶(PG)为 Fluka 公司产品,桔子果胶(99%)为 Sigma 公司产品,壳寡糖购于深圳汉邦多糖科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量测定 参照 Bradford^[11]的方法,以牛血清清蛋白为标准。

1.2.2 酶活力测定 修饰酶和未修饰酶活力测定参照王小敏等^[12]的方法进行改进,酶促反应体系 pH 4.0,反应温度为 55 ℃,反应时间是 30 min,采用 DNS 法测定生成的半乳糖醛酸量,在上述反应条件下,每分钟产生 1 μ g 半乳糖醛酸的酶量定义为 1 单位 PG 酶活(U)。酶的比活力用 U/mg protein 表示。

1.2.3 中性糖含量测定 采用硫酸-苯酚法^[13]。

1.2.4 氨基修饰率的测定 采用 TNBS 法^[14],分别对 PG 及 COS-PG 进行游离氨基的测定,并计算每毫克蛋白质被结合的氨基。

1.2.5 单因素试验 采用不同 pH 值(分别为 3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6)、不同反应时间(分别为 4、8、12、16、20、24 h)、不同高碘酸钠用量(分别

为 20、40、60、80、100、120 mg)、不同壳寡糖用量(分别为 40、80、100、120、150、200 mg)、不同反应温度(分别为 3、5、10、20、37、45 ℃)对酶进行化学修饰,比较不同反应条件对 PG 修饰效果的影响。

1.2.6 正交试验 选用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方案对修饰条件进行优化,正交试验综合考虑了反应体系中 pH(A)、温度(B)、反应时间(C)、壳寡糖用量(D)、pH 与温度的交互作用(即 pH $\times$ 温度)(E)等对 PG 化学修饰效果的影响,正交试验因素条件设计如表 1 所示。

表 1 正交试验因素

Tab. 1 Factors of orthogonal comparison test

水平	因素				
	A pH 值	B 温度/ ℃	C 反应 时间/h	D 壳寡糖 用量/mg	E pH $\times$ 温度
1	3.0	3	4	50	1
2	3.6	5	8	100	2
3	4.0	10	12	150	3
4	4.6	20	18	200	4

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同 pH 值对 PG 修饰效果的影响 结果见图 1。由图 1 可知,在一定条件下,pH 以 3.6 时修饰效果最好,修饰后,PG 的酶活力提高最为显著,修饰后酶的比活力为 316.76 U/mg,比修饰前提高了 136.38%。

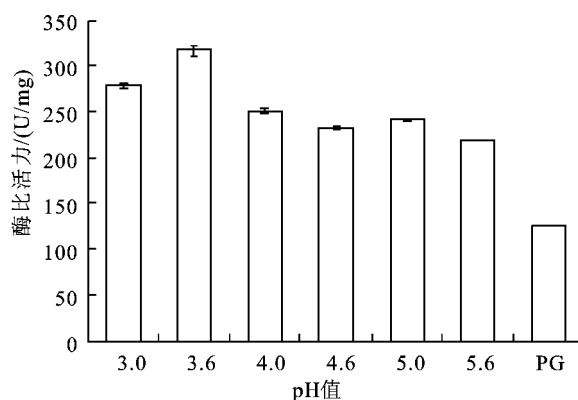


图 1 不同 pH 值对 PG 修饰效果的影响

Fig. 1 Effect of different pH on the chemical modification of PG

2.1.2 不同反应时间对 PG 修饰效果的影响 结果见图 2。由图 2 可见,在一定条件下,反应时间以 8 h 时修饰效果最好,修饰后,PG 的酶活力提高最

为显著,修饰后酶的比活力为 318.92 U/mg,比修饰前提高了 137.82%。

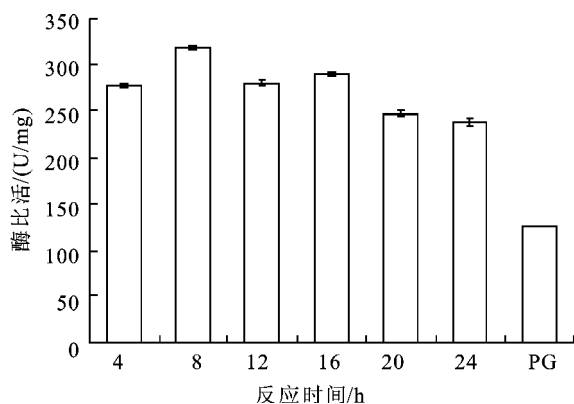


图2 不同反应时间对 PG 修饰效果的影响

Fig. 2 Effect of different reaction time on chemical modification of PG

2.1.3 不同用量的高碘酸钠对 PG 修饰效果的影响 结果见图 3。由图 3 可见,在一定条件下,高碘酸钠用量以 60 mg 时修饰效果最好,修饰后,PG 的酶活力提高最为显著,修饰后酶的比活力为 313.31 U/mg,比修饰前提高了 133.64%。

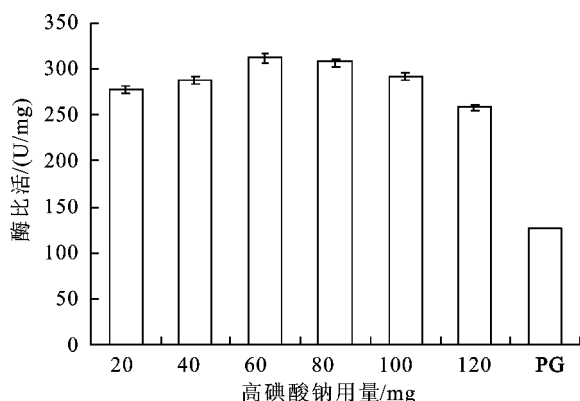


图3 不同高碘酸钠用量对 PG 修饰效果的影响

Fig. 3 Effect of different sodium periodate dosage on chemical modification of PG

2.1.4 不同壳寡糖用量对 PG 修饰效果的影响 结果见图 4。由图 4 可见,在一定条件下,修饰剂壳寡糖用量以 150 mg 时修饰效果最好,修饰后,PG 的酶活力提高最为显著,修饰后酶的比活力为 316.35 U/mg protein,比修饰前提高了 135.90%。

2.1.5 不同反应温度对 PG 修饰效果的影响 结果见图 5。由图 5 可见,在一定条件下,反应温度以 10 °C 时修饰效果最好,但与修饰温度为 5 °C 时差异不显著,修饰后,PG 的酶活力提高显著,修饰后酶的比活力为 301.89 U/mg,比修饰前提高了 125.12%。

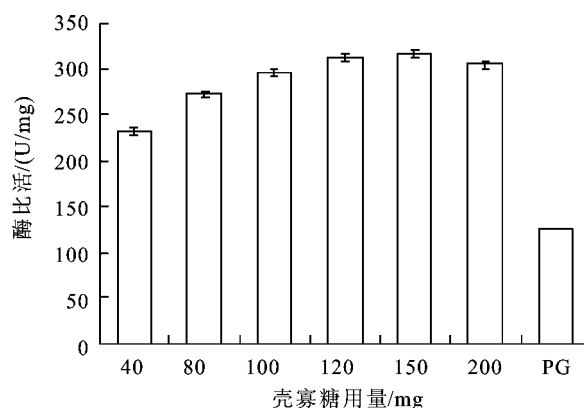


图4 不同的壳寡糖用量对 PG 修饰效果的影响

Fig. 4 Effect of different COS dosage on chemical modification of PG

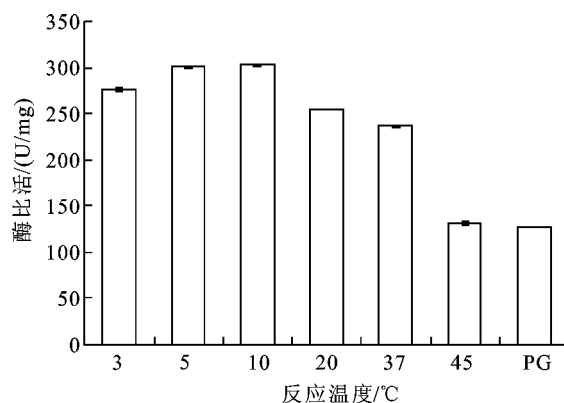


图5 不同反应温度对 PG 修饰效果的影响

Fig. 5 Effect of different temperature on chemical modification of PG

2.1.6 正交试验结果 正交试验见表 2。从表 2 可知,因素 A(pH)以第 3 水平为最好,因素 B(温度)以第 1 水平为最好,因素 C(反应时间)以第三水平为最好,因素 D(壳寡糖用量)以第三水平为最好,因此,最优水平搭配为 $A_3B_1C_3D_3$,即以 80 mg 活化的 PG 为底物,反应体系中 pH 值为 4.0,反应温度为 3 °C,反应时间为 12 h,壳寡糖用量为 150 mg,修饰效果最佳,对 PG 具有显著的激活作用,修饰后酶的比活力是 340.10 U/mg,比修饰前提高了 153%。

极差分析表明,影响 PG 化学修饰效果因素的主次顺序为:pH(A)> pH×温度(E)>温度(B)>反应时间(C)>壳寡糖用量(D),说明 pH 对 PG 化学修饰的效果影响最大,是影响 PG 化学修饰的关键因素。

2.1.7 壳寡糖对 PG 修饰效果的检验 以 80 mg 活化的 PG 为底物,按照正交试验得出壳寡糖修饰 PG 的最佳条件(即反应体系中 pH 值为 4.0,反应温度为 3 °C,反应时间为 12 h,壳寡糖用量为 150

mg)进行验证性试验对正交试验结果进行验证,得到修饰酶(COS-PG),修饰前后酶活性、糖含量、氨基修饰率、酶活力回收率的比较见表 3。

表 2 壳寡糖对 PG 化学修饰的正交试验

Tab. 2 Orthogonal comparison test of Chemical modification of PG with Chitooligosaccharides

水平	A pH 值	B 温度/℃	C 反应时间/h	D 壳寡糖用量/mg	E pH×温度	酶比活力/ (U/mg protein)
1	3.0	3	4	50	1	286
2	3.0	5	8	100	2	325
3	3.0	10	12	150	3	330
4	3.0	20	18	200	4	263
5	3.6	3	8	150	4	311
6	3.6	5	4	200	3	303
7	3.6	10	18	50	2	323
8	3.6	20	12	100	1	291
9	4.0	3	12	200	2	354
10	4.0	5	18	150	1	313
11	4.0	10	4	100	4	309
12	4.0	20	8	50	3	299
13	4.6	3	18	100	3	283
14	4.6	5	12	50	4	278
15	4.6	10	8	200	1	265
16	4.6	20	4	150	2	290
K_1 平均	301.000	308.500	297.000	296.500	288.750	
K_2 平均	307.000	304.750	300.001	302.000	323.000	
K_3 平均	318.750	306.750	313.250	311.000	303.750	
K_4 平均	279.000	285.750	295.500	296.250	290.250	
R	39.750	22.750	17.750	14.750	34.250	

由表 3 可知,修饰后,COS-PG 的酶比活力、糖含量有大幅度的提高,与天然酶相比,修饰酶的比活力提高了 153.42%,糖质量分数提高了 41.82%,氨基修饰率为 32.85%,酶的活力回收率为 126.51%。

表 3 修饰前后 PG 酶活性、糖含量、氨基修饰率和酶活力回收率的比较

Tab. 3 Comparison of enzyme specific activity, carbohydrate content, amino modification rate, enzyme activity retrieve rate between modified enzyme and natural enzyme

酶	酶比活力/ (U/mg protein)	糖质量 分数/%	氨基 修饰率/%	酶活力 回收率/%
PG	134.20	3.18	0	100
COS-PG	340.10	4.51	32.85	126.51

3 讨 论

酶分子的化学修饰,就是在分子水平上对酶分子进行改造。这种改造包括两个水平上的改变:即对酶分子主链结构的改变^[15]和对其侧链基团的改变^[16]。利用大分子或小分子修饰剂对酶分子的侧链进行改造,以获得具有临床和工业应用价值的酶蛋白,是目前应用最广泛的酶化学修饰技术。本试验用壳寡糖来修饰 PG,取得了较好的效果。事实上,修饰效果受到 pH 值、温度、修饰时间、壳寡糖的用量等因素的综合影响。

首先,pH 是控制修饰反应的重要条件之一。有报道认为,对木瓜凝乳蛋白酶而言,增加 pH 可以提高反应速率,降低 pH 可以减小反应速率^[17]。pH 能改变肽链的二级结构,因为改变了侧链基团的电荷而引起构象的变化^[18]。pH 决定了酶蛋白分

子中反应基团的解离状态,所以控制反应的 pH,也就控制了各功能基的解离程度,从而影响修饰的效果。本实验结果表明,pH4.0 条件下,最适合 PG 的化学修饰。这可能是由于 PG 的最适 pH 为 4.0^[19-20],当 pH 为 4.0 时,PG 酶分子活性部位的反应基团处于最适于反应的解离状态。此时,用水溶性的壳寡糖进行修饰,壳寡糖就容易交联到酶蛋白表面上。

其次,温度也是影响酶分子修饰效果的重要因素。一般情况下,酶分子是不耐高温的。温度过高酶分子会变性失活。反过来,温度太低也不利于反应。不同的酶对温度的敏感性差异很大。在酶分子化学修饰过程中,必须考虑酶的稳定性和活化后修饰剂的稳定性两方面。酶分子是蛋白质,凡是使蛋白质变性的温度都能使酶失去活性。酶在常温下也会逐渐失活,这是因为不管在任何温度下,总会有少量酶分子处于较高的能量状态,这些分子会越过能障成为非活性分子,称之为热失活^[21]。温度越高,处于高能状态的酶分子就越多,宏观上表现出酶分子越不稳定。本试验的单因素试验结果表明,当用水溶性的壳寡糖修饰 PG 时,修饰温度为 5~10℃ 时修饰效果最好,修饰后酶活性最高。而正交试验结果则表明,修饰温度为 3℃ 时修饰效果最好,修饰后酶活性最高。其原因可能是由于壳寡糖修饰 PG 的活化过程是高碘酸钠将糖蛋白分子糖链

上的羟基氧化为醛基,形成一个含有二醛的中间产物,中间产物极不稳定,温度高时,经活化的 PG 不稳定而导致不利于化学修饰的进行。

再次,修饰时间也影响修饰效果。一般而言,修饰时间稍长,酶与修饰剂结合率就高,修饰效果就应该较好。但修饰时间也不是越长越好。本试验的单因素试验结果表明,修饰时间为 8 h 时修饰效果最好,修饰后酶活性最高。但正交试验结果则表明,修饰时间为 12 h 时修饰效果最好,修饰后酶活性最高。修饰时间对修饰效果的影响主要表现在:一方面,修饰时间过短,修饰剂与酶未能充分结合;另一方面,由于活化的 PG 不稳定,过长的修饰时间有可能导致 PG 分子之间的交联或失活,反而不利于酶分子的化学修饰。

最后,壳寡糖的用量也会影响修饰效果。用量过少,酶分子的基团未能全部修饰,会使修饰效果差。反之,壳寡糖用量过多也不一定就能得到好的修饰效果,更会造成材料浪费。本研究通过正交试验得出壳寡糖的最适用量是 150 mg。

经过细致的探索,本实验筛选出对 PG 的最佳修饰反应条件为:以 80 mg 活化的多聚半乳糖醛酸酶为底物,反应体系 pH 为 4.0,反应温度为 3℃,反应时间为 12 h,壳寡糖用量为 150 mg,修饰效果最佳。经修饰后的多聚半乳糖醛酸酶的比活力是 340.10 U/mg,比修饰前提高了 153%。

参考文献(References):

- [1] Cook B, Clay R, Bergmann C, et al. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase inhibiting proteins[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12 (8):703-711.
- [2] Kristen A, Alan B. Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:337-343.
- [3] Scott S, Cheng Y, Cervone F, et al. Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases[J]. *Appl Environ Microb*, 1998, 64 (4):1497-1503.
- [4] David A. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening[J]. *The Plant cell*, 1999, 11:2203-2216.
- [5] Pietro A, Madrid M, Caracul Z, et al. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus [J]. *Molecular Plant Pathol*, 2003, 4 (5):315-325.
- [6] LI J ian-zhou, L I J iang-hua, XU Zheng-hong, et al. Optimizing fermentation of alkaliphilic and halophilic alkalibacterium sp 1 F26 for producing alkaline pectinase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6):43-48.
- [7] ZHEN Dong-xiao, WANG Shu-ying, YAN Qun, et al. Cloning and expression of gene pel9A encoding thermostable pectate lyase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2):112-115.
- [8] YAO Qian, SUN Tao, XU Yi-xia, et al. Preparation of chitosan/ chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activities[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(2):188-191.
- [9] SUN Tao, YIN Xu-hong, XIE Jing, et al. The radical scavenging effect of n-Acyl chitosan oligosaccharide[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(3):406-409.

- [10] Leissy G omez, Reynaldo Villalonga. Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan[J]. **Biotechnology Letters**, 2000, 22: 347—350.
- [11] Bradford R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248—254.
- [12] WANG Xiao-min, WU Wen-nong, Lü Lian-fei, et al. Study on the spectrophotometric analysis of pectinase activity[J]. **Science and Technology of food industry**, 2007, 28 (5): 227—229.
- [13] Peng Y, Zhang L, Zeng F, et al. Structure and antitumor activity of extra cellular polysaccharides from Mycelium [J]. **Carbohydr Polym**, 2003, 54: 297—303.
- [14] Habeeb A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid [J]. **Anal Biochem**, 1966, 14: 328—336.
- [15] Davis B. Chemical modification of biocatalysts [J]. **Curr Option Biotechnol**, 2003, 14:379—386.
- [16] Koclra Y, Matsushima A, Hiroto M, et al. Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications[J]. **Polymer Sci**, 1998, 23: 1233—1271.
- [17] SHU Wei, GUO Yong. The determination and analysis of 2-(o-methorypolyethyleneglycol)-4,6-dichloro-s-triazine-modified chymopapain[J]. **Journal of South China Agricultural University**, 2005, 26(3): 64—68.
- [18] YAN Nong-fei, XUN Zhi-rong. The molecular structure of protein[M]. BeiJing: QingHua University Press, 1999. 156—178.
- [19] Maria C, Stuasser D. Purification and characterization of pectin esterase produced by a strain of *Aspergillus niger*[J]. **Curr Microbiol**, 1994, 28: 193—196.
- [20] Sridevi A, Appurao S. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger* [J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 2002, 35: 115—123.
- [21] Johnson R, Adams P, Rupley A. Therodynamics of protein cross-links[J]. **Biochemistry**, 1978, 17: 1479—1483.

《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》2012 年为月刊, 国际 A4 开本, 112 页, 内容丰富, 信息量大, 精美印刷, 国内外公开发行人每月月底出版。

主要栏目: 食品科学与工程、生物技术与发酵工程高端论坛、科技前沿、专题论述、技术应用、行业信息等。

每期定价 80 元, 全年 12 期 960 元; 本刊邮发代号: 28—79, 全国各地邮局均可订阅。发行部常年办理邮购, 订阅方法:

1. 现金订阅: 直接通过当地邮局汇款至江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学《食品与生物技术学报》编辑部收 邮政编码: 214122

联系人: 顾玉娥 联系电话: 0510—85913516 传真: 0510—85913516

网址: <http://zss.jiangnan.edu.cn> 电话信箱: xbbjb@jiangnan.edu.cn

2. 银行汇款:

帐户: 江南大学 开户行: 工行无锡江南大学支行

帐号: 1103030709100000136