

多孔化 CLEAs 催化降解壳聚糖制备活性低聚糖

刘晓婧¹, 王梦凡^{1,3}, 齐 巍^{*2,3}, 苏荣欣^{2,3}, 何志敏¹

(1. 天津大学 化工学院, 天津 300072; 2. 天津大学 化学工程联合国家重点实验室, 天津 300072; 3. 天津市膜科学与海水淡化重点实验室, 天津 300072)

摘要: 针对传统交联酶聚体 (CLEAs) 催化大分子底物传质限制严重的问题, 作者利用多孔化 CLEAs (p-CLEAs) 实现了壳聚糖酶法降解制备生物活性低聚糖。相同条件下 p-CLEAs 催化所生成还原糖量是游离酶的 85%, 是传统 CLEAs 的 4 倍。p-CLEAs 所具有的多孔化结构造成了反应物相对分子质量和多分散性指数具有与游离酶催化不同的变化规律。通过控制酶解时间, 结合超滤膜分离得到了相对分子质量为 5 000~10 000 的低聚糖产品, 占总酶解产物质量的 67.5%。抑菌性实验发现, 当低聚壳聚糖 (5 000~10 000) 质量浓度为 0.275 mg/mL 时, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌达到完全抑制。

关键词: 木瓜蛋白酶; 交联酶聚体; 多孔化; 壳聚糖; 低聚糖; 抑菌性

中图分类号: O 629.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)07-0688-07

Degradation of Chitosan to Produce Bioactive Oligomers Catalyzed by the Porous CLEAs

LIU Xiaojing¹, WANG Mengfan^{1,3}, QI Wei^{*2,3}, SU Rongxin^{2,3}, HE Zhimin¹

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. State Key Laboratory of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Membrane Science and Desalination Technology, Tianjin 300072, China)

Abstract: In order to overcome the defect of low catalytic efficiency of conventional cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) toward macromolecular substrate, porous CLEAs (p-CLEAs) was applied in the degradation of chitosan to produce bioactive chitosan oligomers. The reducing sugar concentration was 85% of that catalyzed by free papain, which is 4 times higher than the conventional CLEAs under the same condition. Molecular weight and polydispersity index displayed the particular properties in the degradation of chitosan catalyzed by p-CLEAs compared with free papain. By controlling the degradation time, 67.5% (wt) of the oligomer product (5~10 kD) were obtained through ultrafiltration membrane separation. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* can be totally suppressed when the concentration of oligomers (5~10 kD) was 0.275 mg/mL.

Keywords: papain, cross-linked enzyme aggregates, porous, chitosan, oligomers, antibacterial activity

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21206113); 天津市应用基础研究计划项目 (13JCQNJC09300)。

* 通信作者: 齐 巍 (1973—), 女, 天津人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化工研究。E-mail: qiwei@tju.edu.cn

引用本文: 刘晓婧, 王梦凡, 齐巍, 等. 多孔化 CLEAs 催化降解壳聚糖制备活性低聚糖[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(07): 688-694.

甲壳素是一类在自然界中储量仅次于纤维素的天然高分子多糖,甲壳素经脱乙酰化处理后即得到壳聚糖,在纺织、医药、材料等诸多领域具有广泛的应用价值^[1-2]。壳聚糖的降解产物——低聚壳聚糖不仅具有很好的溶解性和保湿性能,在免疫调节、抑制肿瘤、抗菌抑菌方面也表现出较强的生物活性^[3-6]。因此,探索壳聚糖的高效降解方法^[7-10],开发低聚壳聚糖的应用领域已成为国内外研究的热点^[11-15]。酶法降解天然多糖在转化效率、环境友好、产品质量可控方面均具有比化学降解法更大的优势^[16-18]。木瓜蛋白酶是一种可以降解壳聚糖中 N-乙酰氨基葡萄糖单元(GlcNAc)与氨基葡萄糖单元(GlcNH₂)之间糖苷键的非专一性水解酶。利用游离态木瓜蛋白酶催化壳聚糖降解虽然效率高,但酶制剂无法回收,不仅提高了成本,也对产品品质造成影响。

交联酶聚体(CLEAs)是一种无载体固定化酶,其利用有机沉淀剂将游离态的酶进行沉淀,再经戊二醛交联,最终得到具有较高比酶活力且易于回收的生物酶催化剂^[19-20]。然而传统方法制备得到的 CLEAs 其内部孔径较小,不利于如多糖、蛋白质等大分子底物进行传质,限制了其应用^[21-24]。作者前期利用淀粉致孔的方法,得到了内部具有孔隙结构的多孔化交联酶聚体(p-CLEAs),验证了其对于大分子蛋白底物的高催化效率^[25]。作者将 p-CLEAs 应用于大分子多糖底物壳聚糖的酶法降解反应中,与游离酶及传统 CLEAs 对比,考察其对壳聚糖的降解效率,评价 p-CLEAs 的应用效果及重复利用性。通过控制 p-CLEAs 的降解反应时间,结合超滤膜分离,最终制得目标相对分子质量区间的低聚壳聚糖产品,并对其抗菌性能进行测试。

1 材料与方法

1.1 木瓜蛋白酶 CLEAs 的制备

称取 5.0 mg 木瓜蛋白酶(广西庞博生物有限公司),用 1 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)溶解,室温下边搅拌边加入 9 mL 无水乙醇令游离木瓜蛋白酶完全沉淀,30 min 后,向此悬浊液中加入 50% 戊二醛溶液,令最终戊二醛体积分数为 4.5%,于 4 °C 下交联 12 h。随后向其中加入 10 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)稀释,10 000 r/min 离心 1 min 取沉淀,并用蒸馏水重复洗涤 3 次,最终将其分散于磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0),于 4 °C 保存。

1.2 木瓜蛋白酶 p-CLEAs 的制备

将水溶性淀粉溶解于 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中,沸水中加热 3 min,形成质量分数 0.3% 的糊化淀粉溶液。待此淀粉溶液冷却后,取 1 mL 加入 5 mg 木瓜蛋白酶搅拌溶解,随后室温下边搅拌边加入 9 mL 无水乙醇令游离木瓜蛋白酶完全沉淀,30 min 后,向此悬浊液中加入体积分数 50% 戊二醛溶液,令最终戊二醛体积分数为 4.5%,于 4 °C 下交联 12 h。所得沉淀用蒸馏水重复洗涤 3 次后溶于 30 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0),加入 1 mL 的 α -淀粉酶(天津诺微信公司),室温反应。随时取出少量用碘指示剂检测^[26]。当反应进行到指示剂不再变色时离心取沉淀物,用蒸馏水洗涤 3 次,最终将其分散于磷酸缓冲液中(0.1 mol/L, pH 7.0),于 4 °C 保存。

1.3 酶法降解壳聚糖

在 pH 4.5 的壳聚糖乙酸钠溶液中按照底物与酶的质量比为 2:1 加入木瓜蛋白酶,于 45 °C, 200 r/min 条件下水浴振荡反应。一段时间后取样,水浴煮沸 10 min 后测定还原糖浓度及相对分子质量的变化。

1.4 催化降解壳聚糖效率的测定

依照 Imoto 法^[27]测定反应过程中释放出来的还原糖量来评价木瓜蛋白酶降解壳聚糖效率:取 5 mL 酶解后的壳聚糖溶液,用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液调节其 pH 至 7~8,加入 1.5 mL 10.0 g/L 的碱性铁氰化钾溶液,蒸馏水定容至 10 mL,于沸水浴中反应 15 min,冷却,用蒸馏水定容至 20 mL。过滤反应液,测定 420 nm 波长下的吸光值,以单位时间内还原糖浓度的变化表示酶解反应速度。

1.5 壳聚糖及其酶解产物的相对分子质量

利用凝胶排阻色谱(GPC)对壳聚糖及其酶解产物的相对分子量进行测定,结合普适校正法,以聚乙二醇/聚氧乙烯(M_p 分别为 909 500, 442 800, 62 100, 23 520, 3 930, 1 500, 194, 106)为标准品。流动相为 0.2 mol/L 乙酸/0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液,TSKgel G5000PW 与 TSKgel G3000PW 凝胶排阻色谱柱串联,流量 1 mL/min,柱温及示差折光检测器温度均设为 30 °C。

1.6 壳聚糖分子尺寸的测定

不同相对分子质量壳聚糖的分子尺寸采用布鲁克海文 Zeta PALS 型动态光散射仪(DLS)测定,将壳聚糖样品溶解于 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液中(pH

4.5), 静置10 min 以上, 于 25 ℃恒定温度下测定。

1.7 壳聚糖水解产物的超滤膜分离

控制木瓜蛋白酶 p-CLEAs 降解壳聚糖一段时间后, 取全部反应液, 利用滤纸过滤掉 p-CLEAs, 滤液再经截留相对分子质量 10 000 和 5 000 的再生纤维素超滤膜过滤, 分别截取大于 10 000 和 5 000~10 000 的壳聚糖水解产物组分。

1.8 壳聚糖水解产物抗菌性测定

壳聚糖水解产物的抗菌活性采用比浊法测定。向试管中分别加入 300 mL 营养肉汤培养基, 100 mL 的菌液 (浓度为 10^6 CFU), 100 mL 配制好的低聚壳聚糖溶液, 放入 37 ℃的培养箱中培养。其中大肠杆菌培养 8 h, 金黄色葡萄球菌培养 12 h。以不加水解产物而以同样体积无菌水替代的试管作为对照并放置相同时间, 测定各样品在 600 nm 下的 A 值, 抑菌率依照式(1)所示。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{添加}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 游离木瓜蛋白酶、CLEAs、p-CLEAs 降解壳聚糖效率对比

图 1 所示为分别采用游离木瓜蛋白酶, CLEAs 和 p-CLEAs 降解相对分子质量为 200 000 左右壳聚糖反应过程中还原糖释放曲线的对比。

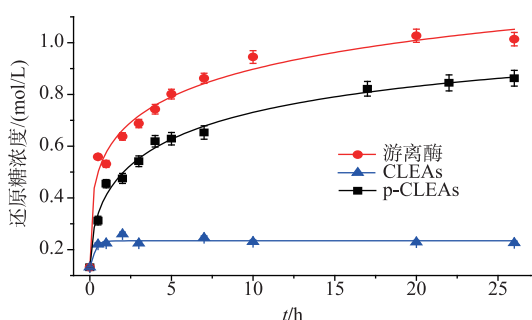


图 1 游离酶、CLEAs、p-CLEAs 降解壳聚糖效率对比

Fig. 1 Hydrolysis efficiency of free papain, CLEAs and p-CLEAs on chitosan

从图中可以看出, 虽然加入的木瓜蛋白酶酶活总量相同, 但相同时间内游离酶催化释放的还原糖量较 CLEAs 和 p-CLEAs 多, 其效率最高, 反应 20 h 后还原糖产量基本达到平衡, 约为 1.0 mol/L。这是因为底物壳聚糖在反应体系 (pH 4.5 的乙酸钠缓冲液) 中呈聚合物网团结构, 游离态的酶分子尺寸远

小于此聚合物网团, 酶可以进入到壳聚糖分子的无规柔性网团中从而催化糖苷键的水解。而采用传统 CLEAs 催化壳聚糖反应时, 众多酶分子在 CLEAs 中形成超分子聚集体结构, 此交联酶聚集体簇的尺寸远大于壳聚糖网团所能容纳的分子尺寸, 因此, 只有暴露于 CLEAs 外表层的木瓜蛋白酶分子可以与壳聚糖网团外层相接触发挥水解功能, 而大部分酶则被“屏蔽”于酶聚集体内部, 并不能与底物壳聚糖接触, 也就无法发挥催化功能, 表现出 CLEAs 的催化效率低下, 仅在反应开始的 2~3 h 内还原糖含量有所增加, 而后在所检测的时间范围内基本上维持恒定值 0.25 mol/L。

采用木瓜蛋白酶 p-CLEAs 催化壳聚糖, 其水解效率相对 CLEAs 有了明显提高, 酶解 26 h 后还原糖浓度约为 0.85 mol/L, 是游离酶的 85% 左右, 为传统 CLEAs 的 4 倍。这是因为壳聚糖不仅能够与 p-CLEAs 外表面的木瓜蛋白酶相结合, 而且可由孔道进入到 p-CLEAs 内部与内部的木瓜蛋白酶接触, 发生催化作用。证明了经多孔化改进的 CLEAs 相比传统 CLEAs 对大分子多糖底物具有更高的催化效率。

2.2 p-CLEAs 降解不同相对分子质量壳聚糖底物对比

为了进一步说明 p-CLEAs 对壳聚糖的高催化效率源于其内部的多孔结构, 选择了 3 种不同分子量的壳聚糖作为底物。图 2 为由动态光散射得到 3 种底物的分子尺寸分布。可以看出, 平均相对分子质量为 137 000, 169 000, 206 000 的壳聚糖分子平均尺寸分别为 590, 910, 1 057 nm。利用 p-CLEAs 催化这 3 种底物反应的效率如图 3 所示, 随着底物相对分子质量减小, 其平均分子尺寸降低, p-CLEAs 相对分子质量催化效率提高。这是因为底物分子尺寸小, 其进入 p-CLEAs 内部所受到的空间位阻小, 传质限制低, 同时能有更多的底物分子与酶接触, 发生反应, 因而相同时间内相对分子质量相对小的壳聚糖释放出的还原糖更多, 表现出 p-CLEAs 对其催化效率更高。

2.3 p-CLEAs 水解壳聚糖过程中降解产物的相对分子质量及多分散度变化

木瓜蛋白酶降解壳聚糖过程中, 专一性地剪切 N-乙酰氨基葡萄糖单元 (GlcNAc) 与氨基葡萄糖单元 (GlcNH₂) 之间的糖苷键, 使壳聚糖聚合度降低, 平均相对分子质量减小。由于不同相对分子质量范

围的低聚壳聚糖产物具有不同的性质及生理活性,为了得到某一相对分子质量范围的低聚壳聚糖,需要对降解过程中壳聚糖相对分子质量变化趋势进行跟踪。作者采用凝胶排阻色谱结合普适校正法测定壳聚糖在被木瓜蛋白酶降解过程中相对分子质量的变化。首先测定了不同相对分子质量聚乙二醇/聚氧乙烯标准品的色谱淋洗时间,得到标定方程为:

$$\lg M_{\text{PEG}} = 9.9153 - 0.3524Ve \quad (2)$$

式中 M_{PEG} 为 PEG 标准品的色谱峰处相对分子质量, Ve 为色谱淋洗体积(mL)。

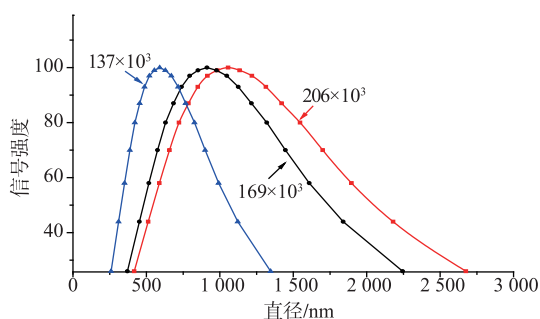


图2 动态光散射测定不同相对分子质量壳聚糖分子尺寸分布
Fig. 2 Molecular size of chitosan determined by DLS

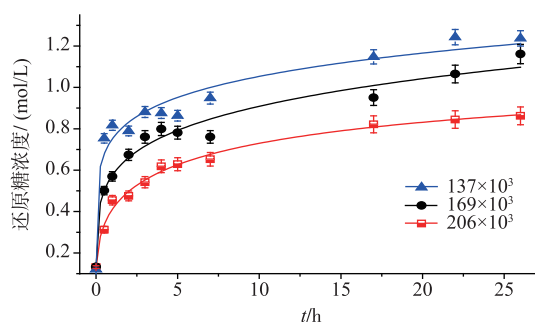


图3 p-CLEAs 水解不同相对分子质量壳聚糖反应效率曲线
Fig. 3 Hydrolysis efficiency of p-CLEAs on chitosan of different molecular weights

由文献[28]中相同色谱条件下的聚乙二醇/聚氧乙烯标准品标定方程(3)及壳聚糖工作曲线(4)得到本实验中壳聚糖样品工作曲线(5):

$$\lg M_{\text{PEG}} = 10.1 - 0.425Ve \quad (3)$$

$$\lg M_{\text{chitosan}} = 9.7626 - 0.3184Ve \quad (4)$$

$$\lg M_{\text{chitosan}} = 9.5853 - 0.3298Ve \quad (5)$$

式中: M_{PEG} 和 M_{chitosan} 分别为文献中 PEG 标准品和壳聚糖的色谱峰处相对分子质量; $M_{\text{pchitosan}}$ 为色谱峰处壳聚糖相对分子质量。

图4所示为 p-CLEA 降解平均相对分子质量为 206 000 的壳聚糖过程中相对分子质量变化的 GPC 结果。由图中可以看出,随着酶解反应的进行, GPC 曲线向高淋洗体积推移,壳聚糖平均相对分子质量降低,同时相对分子质量分布范围变宽,表明木瓜蛋白酶降解过程中有不同相对分子质量的降解产物生成。同时本研究也发现,壳聚糖原料及降解产物的 GPC 图中,在淋洗体积 21 mL 左右处均出现一个峰(图中*所示),其多分散性指数(polydispersity index, PI)为 1.07,有文献[28]报道其为 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖,且来自不同甲壳类动物如海蟹、河虾、虾皮以及桑蚕蛹等的甲壳素所制得的壳聚糖均具有此成分,从反应过程的色谱图中可以看出,2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖在反应初期即快速释放出来,且随反应进行其含量未见明显变化。

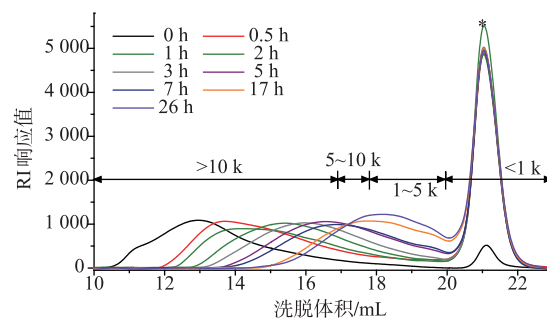


图4 p-CLEAs 降解壳聚糖过程中相对分子质量分布变化
Fig. 4 Molecular weight of chitosan during the hydrolysis by p-CLEAs

表1所示为木瓜蛋白酶 p-CLEAs 和游离酶降解壳聚糖过程中重均相对分子质量 M_w , 数均相对分子质量 M_n 及平均聚合度 DP_n 的变化。可以看出,虽然从水解得到还原糖量的角度来评价多孔化木瓜蛋白酶 CLEAs 的催化效率低于游离酶,但是从相同时间水解产物相对分子质量分布角度来看,二者的 M_w , M_n 及 DP_n 的变化趋势非常相近,特别是当反应进行到 26 h 时,采用 p-CLEAs 及游离酶催化得到的低聚壳聚糖重均相对分子质量均已在 5 000~10 000 之间。

多分散性指数是聚合物相对分子质量分布宽度的量度。在随机剪切高分子链的过程中 PI 值的变化遵循公式(6)规律:

$$PI = \frac{(N+1)}{\left(\frac{1}{2}(N+1) + \left(\frac{1}{PI_0} - \frac{1}{2}\right)/\sqrt[3]{N+1}\right)} \quad (6)$$

其中, $N=(M_{n0}-M_n)/M_n$ 称为剪切率; PI_0 和 PI 分别为高分子在剪切前和剪切 t 时间后的多分散性指数。可见随机降解过程中, t 时刻的 PI 值与高分子的初始相对分子质量无关, 而只跟初始 PI 值有关。由式 (6) 可得:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} PI = 2 \quad (7)$$

表 1 壳聚糖酶解过程中相对分子质量、聚合度及 PI 变化
Table 1 Molecular weight, DPn and PI of chitosan during enzymatic hydrolysis

类别	时间/h	$M_w \times 10^3$	$M_n \times 10^3$	DP _n	PI
p-CLEAs	0	248.4	53.3	331	4.66
	0.5	77.8	3.2	20	24.31
	1	61.1	3.7	23	16.51
	2	41.0	3.9	24	10.51
	3	28.6	3.2	20	8.94
	5	17.0	2.2	14	7.73
	7	13.7	2.0	12	6.85
	17	7.0	1.6	10	4.38
	26	6.3	1.5	9	4.20
free papain	0	248.4	53.3	331	4.66
	0.5	55.5	5.7	35	9.83
	1	41.8	2.1	13	20.27
	2	27.3	1.6	10	16.79
	3	19.1	1.3	8	15.06
	5	12.3	1.6	10	7.55
	7	9.4	1.1	7	8.73
	10	7.8	1.2	7	6.79
	20	4.7	1.0	6	4.65
	26	4.6	1.3	8	3.44

游离木瓜蛋白酶及 p-CLEAs 降解壳聚糖过程中 PI 值随时间变化趋势如表 1 所示。从表中可以看出, 整个反应过程 PI 值呈先增长后降低的趋势: 在反应开始的 0.5~1 h 内, 两种酶催化下壳聚糖的 PI 值均有明显提高, 而随着反应进行, PI 值逐渐降低, 至反应结束时, PI 值基本达到平衡。反应 26 h 后, 游离酶降解的 PI 值为 3.44, 而 p-CLEAs 降解的 PI 为 4.20, 均未达到理论上高分子随机降解最终的 PI 值 ($PI=2$)。此变化规律表明木瓜蛋白酶降解壳聚糖的相对分子质量分布并不符合随机降解过程呈正态分布的规律, 即木瓜蛋白酶的降解为非随机剪切方式。

对于游离木瓜蛋白酶降解壳聚糖来说, 同时存在着酶对底物的单次剪切和多次剪切。单次剪切指

酶与底物每次接触只剪切一个底物分子上的一个糖苷键, 糖苷键断裂后酶即从这个底物分子上脱离; 而多次剪切指酶对一个底物分子一次剪切后, 仍然存留在该底物分子上并继续对已断裂的底物链段进行多次剪切。显然多次剪切对一个底物分子的降解更为彻底, 故得到的产物相对分子质量更小; 而单次剪切得到的产物相对分子质量更大, 正是这种单次剪切和多次剪切模式的同时存在使得反应过程中特别是反应初期糖苷键被剪切的几率不可能相等, 生成不同相对分子质量大小的降解产物, 因此整体的相对分子质量分布变宽, PI 值增加。随后, 随着大相对分子质量的降解产物逐步又被酶降解成小相对分子质量产物, 降解程度逐渐加深, 产物呈现趋于均一的相对分子质量分布, PI 值降低直至基本达到平衡。

对于 p-CLEAs, 其降解机理同样遵循木瓜蛋白酶降解特性, 因此 PI 值先增大后降低的变化趋势与游离酶相同; 而与游离酶不同之处在于 p-CLEAs 在反应初期 PI 值最大可达 24.31, 大于游离酶的 20.27, 这主要是由于固定化酶改变了底物与酶的结合方式。在游离酶催化多糖降解的反应中, 因为酶分子尺寸远小于底物分子, 酶可以进入到多糖的无规网格内部进行催化作用; 而酶经过固定化以后, 体积变大, 无法进入到底物内部, 相反则是底物壳聚糖吸附在 p-CLEAs 表面及内孔道上。因为吸附作用和孔道限制作用的存在, 被 p-CLEAs 吸附上的壳聚糖分子不太容易从 p-CLEAs 上脱离, 因此对这些壳聚糖分子的降解就更为彻底, 产物的相对分子质量更小; 与此同时, 体系中还存在着许多没有来得及与 p-CLEAs 接触或刚与 p-CLEAs 接触即发生脱离的壳聚糖分子, 这就造成了在反应初期有相当一部分两极端相对分子质量的壳聚糖同时存在, 使 M_w 和 M_n 差异明显, 这正是 p-CLEAs 与游离酶区别最大的地方。游离酶体系下酶分子相对来说比较自由, 每个壳聚糖分子都有机会与酶接触, 因此其相对分子质量分布范围相比 p-CLEAs 更集中一些, PI 值也就更小一些。随着反应进行, 小分子的壳聚糖产物从 p-CLEAs 上脱离, 并逐渐有更多的壳聚糖吸附于 p-CLEAs 上发生降解, 大分子逐步消失, 小分子不断生成并积累, 使 PI 值降低, 最终趋于一个常数。

另一方面, 木瓜蛋白酶对壳聚糖糖苷键的剪切具有一定选择性。诸多文献已经证明, 木瓜蛋白酶

在降解壳聚糖过程中只专一性地剪切 N-乙酰氨基葡萄糖单元(GlcNAc)与氨基葡萄糖单元(GlcNH₂)之间的糖苷键,并不剪切 GlcNAc-GlcNAc 键和 GlcNH₂-GlcNH₂ 键,而壳聚糖分子中 GlcNAc 单元和 GlcNH₂ 单元的分布并不是均匀的,这就造成最终降解产物相对分子质量分布的多分散性指数值不可能达到随机剪切的 PI=2。

2.4 木瓜蛋白酶 p-CLEAs 的重复利用性

相比于游离酶催化剂,交联酶聚体的优势在于可以通过离心或过滤的方式从体系中回收再利用,不仅可以降低催化剂成本,还能避免其对产物品质的影响。作者利用离心方法回收 p-CLEAs,并将回收得到的 p-CLEAs 重复用于相同条件下降解壳聚糖的反应,测定生成的还原糖量。由图 5 结果可以看出,p-CLEAs 前两次回收使用效果相当,相同时间内得到的还原糖量基本相同,而随着离心回收次数的增加,p-CLEAs 催化效率降低,当应用到第 5 次时,得到的还原糖量为初次使用的 50%左右。分析这一原因,一方面是木瓜蛋白酶本身长时间处于 pH4.5 的反应条件下造成其活性有所降低;另一方面可能是多次回收操作一定程度上破坏了 p-CLEAs 的多孔化结构,使得底物传质受到限制,造成催化效率的降低。

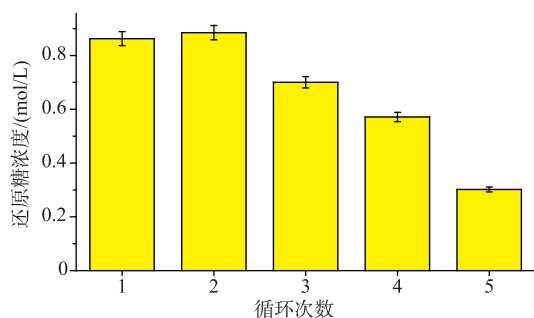


图 5 离心回收 p-CLEAs 降解壳聚糖效果

Fig. 5 Hydrolysis of chitosan with recovered p-CLEAs by centrifugation

参考文献:

- [1] KUMAR M N V R. A review of chitin and chitosan applications[J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2000, 46(1): 1-27.
- [2] KHOR E, LIM L Y. Implantable applications of chitin and chitosan[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2339-2349.
- [3] MACLAUGHLIN F C, MUMPER R J, WANG J, et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 1998, 56(56): 259-272.
- [4] TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, et al. Molecular weight dependent antimicrobial activity by Chitosan[J]. *Macromolecular Symposia*, 1997, 120(1): 1-9.
- [5] KUMAR A B V, VARADARAJ M C, LALITHA R G, et al. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain

2.5 壳聚糖水解产物的抗菌性能

分别利用 5 000 及 10 000 的超滤膜对 p-CLEAs 降解壳聚糖 26 h 后的产物进行分离,得到相对分子质量在 5 000~10 000 的低聚壳聚糖样品,经冻干后称量,其质量占总酶解产物的 67.5%。随后对相对分子质量范围在 5 000~10 000 及大于 10 000 的壳聚糖酶解样品的抗菌性进行了考察。在所选择的浓度范围内,相对分子质量大于 10 000 的壳聚糖样品几乎没有抗菌能力,而 5 000~10 000 的壳聚糖样品抗菌率随着质量浓度的增加而提高,当加入质量浓度为 0.275 mg/mL 时,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌基本上能实现完全抑制,体现出较好的生物活性。

3 结 语

作者采用木瓜蛋白酶 p-CLEAs 降解壳聚糖,其催化效率明显高于传统 CLEAs 酶解,且实现了酶制剂的重复利用。研究发现,p-CLEAs 酶解过程中壳聚糖的 PI 值呈先大幅增大后减小的趋势由 3 个原因决定:1) 酶解过程同时存在单次剪切和多次剪切;2) 底物通过吸附于 p-CLEAs 内孔道和表面的形式与 p-CLEAs 结合;3) 木瓜蛋白酶本身对壳聚糖的糖苷键具有选择性。通过控制反应时间,结合超滤膜分离,得到了质量分数为 67.5%,相对分子质量为 5 000~10 000 的低聚壳聚糖产品,且当质量浓度达 0.275 mg/mL 时,可实现对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的完全抑制。

- and characterization[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta**, 2004, 1670(2):137-146.
- [6] YIN Xuhong, SUN Tao, YAO Qian, et al. DPPH scavenging activity of chitosan oligosaccharide zinc complexes [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3):329-331. (in Chinese)
- [7] JIA Z, SHEN D. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2002, 49(4):393-396.
- [8] QIN C Q, DU Y M, XIAO L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan [J]. **Polymer Degradation & Stability**, 2002, 76(2):211-218.
- [9] CZECHOWSKA-BISKUP R, ROKITA B, LOTFY S, et al. Degradation of chitosan and starch by 360 kHz ultrasound [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2005, 60(2):175-184.
- [10] GE H, LUO D. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation [J]. **Carbohydrate Research**, 2005, 340(7):1351-1356.
- [11] GUOJANE T, WU Z Y, SU W H. Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation[J]. **Journal of Food Protection**, 2000, 63(6):747-752.
- [12] SHARP R G. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields[J]. **Agronomy**, 2013, 3(3):757-793.
- [13] NAM K S, CHOI Y R, SHON Y H. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide:Rec, Ames and Umu tests[J]. **Biotechnology Letters**, 2001, 23(23):971-975.
- [14] NGO D N, QIAN Z J, JE J Y, et al. Aminoethyl chitooligosaccharides inhibit the activity of angiotensin converting enzyme[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43(1):119-123.
- [15] MATEI P M, MARTIN-RAMOS P, SANCHEZ-BASCONES M, et al. Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *diplodia seriata* [J]. **International Journal of Polymer Science**, 2015, 864729, 1-11.
- [16] LEE D X, XIA W S, ZHANG J L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase [J]. **Food Chemistry**, 2008, 111(2):291-295.
- [17] LI J, DU Y, YANG J, et al. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme[J]. **Polymer Degradation & Stability**, 2005, 87(3):441-448.
- [18] RAMIREZ-COUTINO L, REVAH S, SHIRAI K. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41(5):1106-1110.
- [19] SHELDON R A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance [J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 2007, 38(36):1289-1307.
- [20] TANDJAOUI N, TASSIST A, ABOUSEOUD M, et al. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase[J]. **Biocatalysis & Agricultural Biotechnology**, 2015, 4(2):208-213.
- [21] AYTAZ B S, BAKIR U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43(2):125-131.
- [22] LANGEN L M, VAN, SELASSA R P, FRED V R, et al. Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: a stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation[J]. **Organic Letters**, 2005, 7(2):327-329.
- [23] DANIEL I P, FRED V R, ROGER A S. Cross-linked enzyme aggregates of chloroperoxidase: synthesis, optimization and characterization[J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 2009, 351(351):2133-2139.
- [24] MONTORO-G S, GIL O F, NAVARRO F J, et al. Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl beta-lactam antibiotics intermediates[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(1):331-336.
- [25] WANG M, JIA C, QI W, et al. Porous-CLEAs of papain: application to enzymatic hydrolysis of macromolecules [J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(3):3541-3545.
- [26] OKAMOTO K, KITANO H, AKAZAWA T. Biosynthesis and excretion of hydrolases in germinating cereal seeds [J]. **Plant and Cell Physiology**, 1980, 21(1):201-204.
- [27] IMOTO T K Y. A simple activity measurement of lysozyme[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1971, 35:1154-1156.
- [28] LIU Yijun, JIANG Ying, FENG Yunfang, et al. The study of molecular weight and distribution in the process of oxidative degradation of chitosan by GPC[J]. **Journal of Functional Polymer**, 2004, 17(4):671-674. (in Chinese)