

九孔鲍褐藻酸酶降解褐藻胶的反应条件与酶解产物的分析

王斌¹, 甘纯玘², 管华诗¹, 谢苗²

(1. 中国海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东 青岛, 266003; 2. 福建农林大学 生物技术中心, 福建 福州, 350002)

摘要:以九孔鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis*) 为原料制备一定纯度的褐藻酸酶, 并对影响其降解褐藻胶的条件和产物的性质进行分析。该酶的最适温度和 pH 分别为 45 °C 和 7.0; 与磷酸盐缓冲液相比, 其在 Tris-HCl 缓冲液中与底物的亲和力相对较高。动力学曲线表明酶解反应主要发生在 1 h 之内, 在 2 h 之内达到平衡, 酶的剂量和底物的浓度对该平衡起到一定的影响作用。反应 2 h 之后, 添加同数量的酶或者底物发现, 产物的反馈抑制只是反应达到平衡的一个影响因素, 而酶的变性失活也起到了重要的作用。金属离子对酶的活性具有明显的影响, Co^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶的活性具有较强的促进作用, 而 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 和 Zn^{2+} 则具有较强的抑制作用。产物特性黏度的变化主要是在 1 h 内, 2 h 后基本不再改变。¹H NMR 图谱分析发现随着聚甘露糖片段, 特别是 M-M 二聚体的降解, MG 二聚体、GGM 和 MGM 三聚体的量相应增多, 表明该酶属于甘露糖裂解酶 (EC 4.2.2.3)。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 659-666]

关键词: 九孔鲍; 褐藻酸酶; 降解

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0659-08

褐藻胶 (Alginate) 是一种亲水性海藻多糖, 由聚古罗糖醛酸 (G)、聚甘露糖醛酸 (M) 及其交替片段所组成。由于其独特的性质, 如无毒、生物活性和生物降解性, 被广泛应用于工业、农业、医药、食品等各个领域^[1]。近年来研究发现, 利用褐藻胶制备的低聚糖具有抗病毒、抗肿瘤、促进植物生长和抵抗外界刺激等性质^[2]。褐藻胶低聚糖的制备方法主要有 3 种: 酸解法^[3]、酶解法^[4]、辐射降解法^[5]。由于褐藻酸酶的底物专一性和易操作的特点, 因而酶解法更适合用于褐藻胶特定产物的制备。

褐藻酸酶也称为褐藻酸裂解酶, 分为聚古罗糖裂解酶 (EC 4.2.2.11) 和聚甘露糖裂解酶 (EC 4.2.2.3), 均具有底物专一性。该酶作用于多糖链中的 1→4 糖苷键, 通过 β -异构化机制, 在六元环中的 C4 和 C5 之间形成不饱和双键, 从而导致褐藻胶的降解^[6]。褐藻酸酶已经被应用于研究褐藻胶结构、制备特殊用途的褐藻胶产物和海藻遗传工程。鲍 (*Haliotis* sp.) 消化腺分泌降解褐藻酸的酶类, 因此其以海藻为食物。杨惠萍等^[7]对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hanna* Ino) 褐藻酸酶的最适温度、pH 和金属离子的影响进行了研究, Alain 等^[8-9]利

用 NMR 和 HPLC 对疣鲍 (*Haliotis tuberculata*) 褐藻酸酶的底物专一性进行了研究。

本研究主要从动力学的角度对影响九孔鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis*) 褐藻酸酶降解褐藻胶的因素、降解产物的性质以及该酶的底物专一性进行分析, 以期褐藻胶降解产物的研究寻求合适的酶原, 为褐藻胶活性寡糖的制备条件提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

褐藻胶由福建福鼎化工厂提供, 溶于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.05 mol/L) 配成 1% 溶液, 备用。九孔鲍 (市售, 壳长 3~4 cm, 约 20 g/个)。冻干酶粉溶于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.05 mol/L) 配成 1.25 U_A/mL 溶液, 置于 4 °C 保存, 备用。

1.2 方法

1.2.1 褐藻酸酶的制备^[10] 九孔鲍称重、测体长后, 取内脏, 用 DS-1 高速组织捣碎机匀浆, 浸泡于 4 °C PBS 中抽提 12 h, 经抽滤, 加硫酸铵至饱和度为 50%, 静置 1 h, 沉淀, 用 eppendorf 5804R 冷冻离心

收稿日期: 2006-08-26; 修订日期: 2006-12-15.

基金项目: 国家海洋局 908 专项资助 (908-01-ST12, 908-02-05-04); 福建省自然科学基金资助项目 (JA.No.C0110009).

作者简介: 王斌 (1977-), 男, 博士研究生, 从事海洋药物的研究. E-mail: binwang4159@hotmail.com

机于 4 ℃、4 500 r/min 离心 15 min 去除沉淀。继续加入硫酸铵至饱和度为 70%，静置、离心，收集沉淀，于 4 ℃用超纯水透析 24 h，每 2 小时换水 1 次，将透析液冻干，于 -20 ℃保存，备用。

1.2.2 酶活力的测定^[7] 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定酶活力，该方法系参照纤维素酶活力的测定方法加以改进后设计的。操作步骤如下：缓冲液、褐藻胶溶液 (1%) 和酶液 (1.25 U_A/mL) 按体积比 3:1:1 进行配制后置于 45 ℃水浴中，每 10 min 取出 1 mL 迅速加入到 3 mL DNS 溶液中，于沸水浴中显色 15 min，摇匀后在 550 nm 波长下测定吸收值 (A_{550})，以灭活酶液代替酶液作为空白对照。550 nm 波长下每升高 1 个光吸收值定义为 1 个酶活力单位 (U_A)。

1.2.3 反应条件对褐藻酸酶活力的影响

(1) 缓冲液对酶活力的影响 在磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 0.5 mol/L) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.5 mol/L) 条件下，以不同浓度的褐藻酸钠溶液 (s) 为底物，在 pH 7.0、45 ℃下反应 20 min，测其吸光值，以 1/[s] 为横坐标，以 1/V 为纵坐标作图 ([s] 表示褐藻胶质量分数，V 表示褐藻酸酶降解褐藻胶的速度，单位为 U_A/min)。

(2) 酶最适温度 将 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.05 mol/L)、褐藻胶溶液 (1%) 和酶溶液 (1.25 U_A/mL) 按体积比 3:1:1 进行配制，置于不同温度水浴中反应，反应温度为 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃和 55 ℃，每 10 分钟按照 1.2.2 的方法测定一次酶活力。

(3) 最适 pH 将不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 梯度设置为 5.8、6.2、6.6、7.0、7.4、7.8 和 8.0)、褐藻胶溶液 (1%) 和酶溶液 (1.25 U_A/mL) 按体积 3:1:1 的比例进行配制，置于 45 ℃水浴中反应，每 10 分钟按照 1.2.2 的方法测定一次酶活力。

(4) 底物浓度对酶活力的影响 将 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.05 mol/L)、不同浓度的褐藻胶溶液 (质量分数分别为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.30%、0.40% 和 0.50%) 和酶溶液 (1.25 U_A/mL) 按体积比 3:1:1 进行配制，置于 45 ℃水浴中反应，每 10 分钟按照 1.2.2 的方法测定一次酶活力。

(5) 酶液浓度对酶活力的影响 将 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.05 mol/L)、褐藻胶溶液 (1%) 和不同浓度的酶溶液 (酶浓度为 0.062 5 U_A/mL、0.125 U_A/mL、0.150 U_A/mL、0.250 U_A/mL、0.375 U_A/mL、

0.500 U_A/mL 和 0.625 U_A/mL) 按体积比 3:1:1 进行配制，置于 45 ℃水浴中反应，每 10 分钟按照 1.2.2 的方法测定一次酶活力。反应 2 h 后，将酶溶液浓度为 0.125 U_A/mL、0.250 U_A/mL 和 0.500 U_A/mL 的反应系统中加入与初始反应时相同量的酶，置于 45 ℃水浴中反应，每 10 分钟按照 1.2.2 的方法测定一次酶活力。

(6) 不同的离子对酶活力的影响 选取 Ag⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Al³⁺、Ba²⁺、K⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Mg²⁺ 和 NH₄⁺ 配成离子浓度 0.2 × 10⁻⁵ mol/L、pH 7.0 的褐藻胶溶液 (1%)，与酶液 (1.25 U_A/mL) 混匀，于 45 ℃水浴反应 10 min，按照 1.2.2 的方法测定酶活力。

相对酶活力 (Relative activity) = (不同的离子条件下的酶活力/对照酶活力) × 100%

1.2.4 褐藻酸钠酶解物的制备及其特性黏度的测定 (Batch measurements)

(1) 酶降解物的制备 将褐藻酸酶溶液 (1.25 U_A/mL)、褐藻酸钠溶液 (2%) 和缓冲液按照体积比 1:1:3 混合后置于 45 ℃水浴中反应不同的时间，取出后于沸水浴中灭活 10 min、6 000 r/min 离心去除沉淀，用蒸馏水透析 12 h 后冻干。

(2) 特性黏度的测定 特性黏度在 20.0 ℃下，用 Ubbelohde 毛细管黏度计测定。用控制单元 AVS 310、PC-操作滴定仪进行溶剂的自动稀释，数据的获得和计算。溶剂的流过时间为 212 s，相应的平均速率为 110 cm·s⁻¹。

1.2.5 ¹H-NMR 测定褐藻酸酶解产物

(1) ¹H-NMR 样品的制备 取酶降解物冻干样品 0.1 g 溶解于 100 mL 双蒸水中，用 3 mol/L 的盐酸调 pH 至 5.6，于 95~100 ℃的水浴中水解 1 h，取出冷却，调 pH 至 3.8，重新放入沸水浴内水解 1 h，冷却，用 NaOH 调 pH 至 6.8~7.0 后，将溶液冻干，收集固形物。

(2) 样品的测定 ¹H-NMR 谱在 Bruker DRX-400 核磁共振仪上测定，实验条件如下：将 20 mg 测定样品溶解于 1.4 mL 氘代水 (D₂O) 中，5 μm 滤膜过滤，滤液转移到核磁管内，以 TTHA 为内标。

1.3 数据分析

金属离子和对酶活力影响的显著性分析采用 *t* 检验， $\alpha = 0.01$ ，*t* (2) = 6.964 6，分析软件使用 SPSS 12.0。

2 结果与分析

2.1 缓冲液对酶活力的影响

不同的缓冲液对酶活力的影响结果见图1和图2。图1表明磷酸盐缓冲液对酶活力的影响,通过横坐标和纵坐标的截距可以求得褐藻酸酶的 K_m 、 V_{max} 分别为 $0.021\ 1\ \text{mg/mL}$ 和 $0.209\ \text{U}_A/\text{min}$ 。图2表明

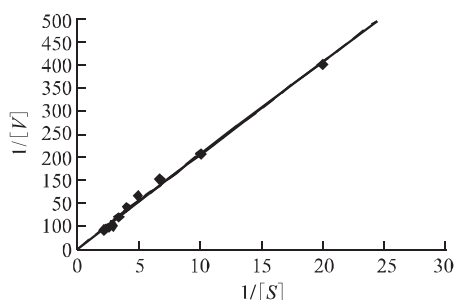


图1 九孔鲍褐藻酸酶在磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 0.5 mol/L) 中的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.1 Lineweaver-Burk Plots for the *Haliotis diversicolor aquatilis* lyase acting on alginate in phosphate buffer (pH 7.0, 0.5 mol/L)

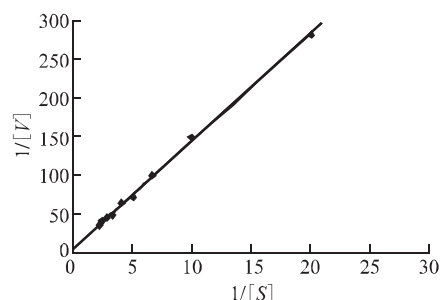


图2 九孔鲍褐藻酸酶在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 0.5 mol/L) 中的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.2 Lineweaver-Burk Plots for the *Haliotis diversicolor aquatilis* lyase acting on alginate in Tris-HCl buffer (pH 7.0, 0.5 mol/L)

2.2 温度和 pH 对褐藻酸酶活力的影响

图3表明酶活力从 $25\ ^\circ\text{C}$ 至 $45\ ^\circ\text{C}$ 呈缓慢上升趋势,当温度达到 $45\ ^\circ\text{C}$ 时,该酶表现出最高活力;超过该温度,酶活力开始下降,从 $45\ ^\circ\text{C}$ 到 $50\ ^\circ\text{C}$ 比较缓慢;超过 $50\ ^\circ\text{C}$,酶活力下降趋势增强。表明该酶的最适温度为 $45\ ^\circ\text{C}$ 。另一方面,褐藻酸酶在 20 min

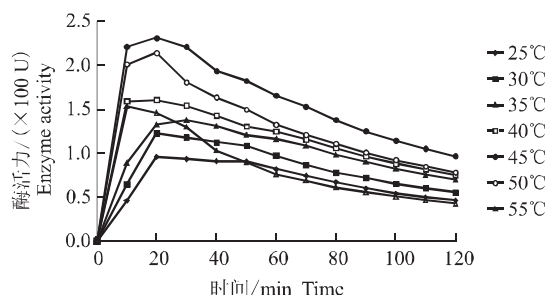


图3 温度对九孔鲍褐藻酸酶活性影响的动力学曲线 (pH 7.0、褐藻胶溶液 0.20% 和酶溶液 $0.25\ \text{U}_A/\text{mL}$)

Fig.3 Progress curves for *Haliotis diversicolor aquatilis* lyase acting on 0.20% alginate at different temperature (pH 7.0, enzyme concentration $0.25\ \text{U}_A/\text{mL}$)

内活力呈上升趋势,特别是前 10 min,酶活力上升很快,但超过 20 min 后酶活力呈现下降趋势,造成这种现象的原因主要有两个方面:(1)随着反应的时间加长,生成的产物逐渐增加,反应的逆反应逐渐加快,对酶产生了反馈抑制作用;(2)底物的浓度逐渐减小;(3)反应过程中,部分酶变性失活。

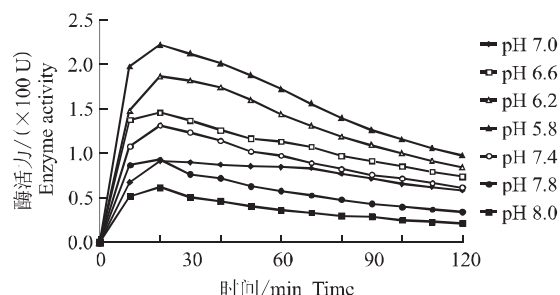


图4 pH 对九孔鲍褐藻酸酶活性影响的动力学曲线 ($45\ ^\circ\text{C}$ 、褐藻胶溶液 0.20% 和酶溶液 $0.25\ \text{U}_A/\text{mL}$)

Fig.4 Progress curves for *Haliotis diversicolor aquatilis* lyase at different pH ($45\ ^\circ\text{C}$, alginate 0.20%, enzyme concentration $0.25\ \text{U}_A/\text{mL}$)

图4表明,褐藻酸酶的活力受碱性溶液的影响较大,而受酸性溶液的影响较小。从pH 5.8到6.6酶活力呈缓慢上升趋势,当pH值达到6.6时,酶活力迅速上升,至pH 7.0时活力达到最大。在碱性范围内,酶活力随pH增加而明显下降,当pH 7.4时,几乎失去了一半的活力;当pH到达8时,该酶几乎丧失了所有的活力。表明该酶的最适pH为7.0。

2.3 底物浓度对酶活力的影响

图5表明,随着底物浓度的增加,酶活力逐渐上

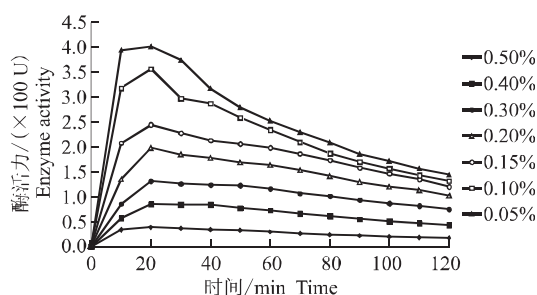


图5 不同底物浓度对九孔鲍褐藻酸酶酶活性影响的动力学曲线 (pH 7.0、45℃和酶溶液 0.25 U_A/mL)

Fig.5 Progress curves for *Haliotis diversicolosa aquatilis* lyase acting on different substrate concentration (pH 7.0, 45℃, enzyme concentration 0.25 U_A/mL)

2.4 酶浓度对反应的影响

图7表明,随着酶浓度的增加酶活力逐渐减小。图8阐明了反应体系反应2 h后,加入与起始反应时相同量的酶反应体系中酶活力的变化情况。结果

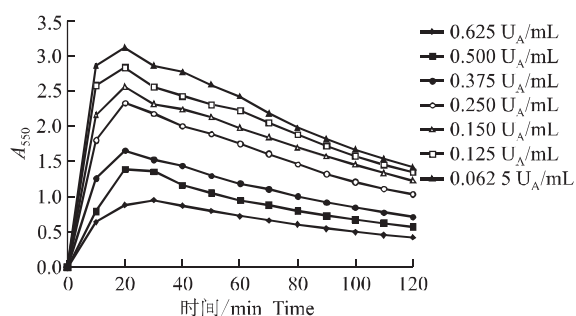


图7 酶浓度对九孔鲍褐藻酸酶酶活性影响的动力学曲线 (pH 7.0、45℃和褐藻胶溶液 0.20%)

Fig.7 Progress curves for different *Haliotis diversicolosa aquatilis* lyase concentration acting on 0.20% alginate (pH 7.0, 45℃)

升,当底物质量分数达到0.4%时,酶活力上升速率有所减慢,表明该体系中酶和底物的结合基本达到饱和。图6显示,体系反应2 h后,加入与起始反应时相同量的底物反应体系中酶活力的变化。所有的曲线表明,反应体系进行1 h后反应已经非常缓慢,在2 h产物的量几乎不再增加,但是新的底物加入后酶的活性有了明显的改变,重新生成新的产物,但是随着时间的延长,产物的生成速度变小,4 h后曲线变化很小。

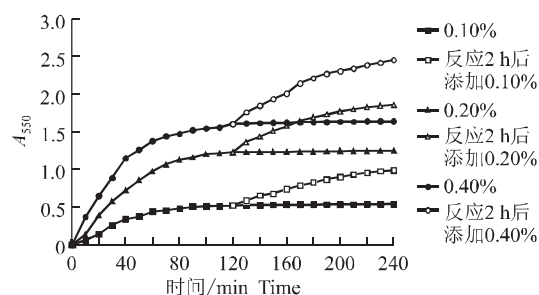


图6 酶催化2 h后增加相同的底物对九孔鲍褐藻酸酶酶活性影响的动力学曲线 (pH 7.0、45℃和酶溶液 0.25 U_A/mL)

Fig.6 Progress curves for *Haliotis diversicolosa aquatilis* lyase acting on alginate with different substrate concentration (pH 7.0, 45℃, enzyme concentration 0.25 U_A/mL)

表明,在2 h后体系中产物的生成量变化很小。2 h后加入新的酶,产物的生成量有所增加,但是经过不到1 h,与最初的体系表现出相同的趋势。

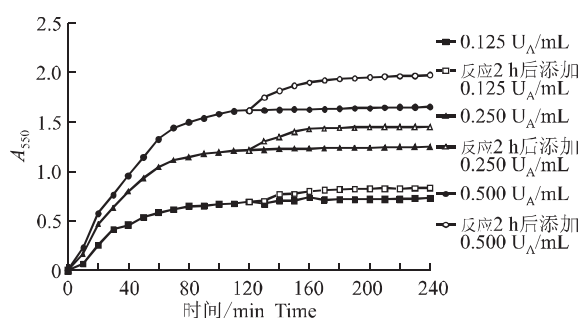


图8 酶催化2h后增加相同的酶单位对九孔鲍褐藻酸酶酶活性影响的动力学曲线 (pH 7.0、45℃和褐藻胶溶液 0.20%)

Fig.8 Progress curves for different *Haliotis diversicolosa aquatilis* lyase concentration acting on 0.20% alginate (pH 7.0, 45℃)

2.5 金属离子对酶活力的影响

在显著性水平 $\alpha = 0.01$ 的前提条件下进行差异显著性分析,结果表明大多数的金属离子对酶活力都有影响(表 1)。Co²⁺、Ca²⁺、Al³⁺、Pb²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺、NH₄⁺、K⁺、Ba²⁺、Ca²⁺和 Fe³⁺存在着显著的促进作用($P < 0.01$),其中 Co²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、NH₄⁺

和 Pb²⁺的促进作用最强,其促进作用可以相应地达到对照组的 162.5%、148.3%、135.7%、132.5%和 131.8%;而 Cu²⁺、Ag⁺和 Zn²⁺具有显著的抑制作用($P < 0.01$),当这些离子存在时,酶活力仅相当于对照组的 33%、47%和 50.2%。

表 1 不同金属离子浓度对九孔鲍褐藻酸酶活性的影响 (pH 7.0、45 ℃、褐藻胶溶液 0.20%和酶液 1.25 U_A/mL)

Tab.1 Effect of different cations on activities of *Haliotis diversicoloe aquatilis* lyase (pH 7.0, 45 ℃, alginate 0.20%, enzyme concentration 1.25 U_A/mL)

离子 Ions	来源 Source	相对活力 Relative activity ($\bar{X} \pm SD$)	离子 Ions	来源 Source	相对活力 Relative activity ($\bar{X} \pm SD$)
H ₂ O	—	100	Ca ²⁺	CaCl ₂	127.4 ± 0.02 **
Co ²⁺	CoCl ₂	162.7 ± 0.13 **	Fe ³⁺	FeCl ₃	119.2 ± 0.21 **
Mg ²⁺	MgCl ₂	150.8 ± 0.07 **	Fe ²⁺	FeSO ₄	109.7 ± 0.17
Al ³⁺	Al(NO ₃) ₃	135.7 ± 0.15 **	Mn ²⁺	MnSO ₄	84.9 ± 0.55 **
NH ₄ ⁺	NH ₄ Cl	132.5 ± 0.12 **	Zn ²⁺	ZnSO ₄	50.2 ± 0.11 **
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	131.8 ± 0.19 **	Ag ⁺	AgNO	47.6 ± 0.02 **
K ⁺	KCl	131.2 ± 0.14 **	Cu ²⁺	CuCl ₂	33.7 ± 0.04 **
Ba ²⁺	BaCl ₂	129.4 ± 0.02 **			

注: ** 表示所代表数据与各组之间差异非常显著 ($P < 0.01$)。
Note: Values with “**” mean significantly different ($P < 0.01$) between each two treatments.

2.6 褐藻酸酶降解产物的特性黏度变化

特性黏度是高分子溶液性质的一个重要的参数,通过特性黏度的测定,不仅可以估算高聚物的平均分子量,而且可了解分子链在溶液中的形态以及支化程度等重要信息。本实验采用降解物溶液的黏度变化来估测体系的反应情况(图 9)。特性黏度随时间的变化曲线表明,降解时间在 1 h 之内,降解物溶液的特性黏度呈由快到慢逐渐下降的趋势,而在 1 h 到 2 h 之间这种下降趋势已经非常的缓慢,超过两个小时降解物的特性黏度几乎不再变化。

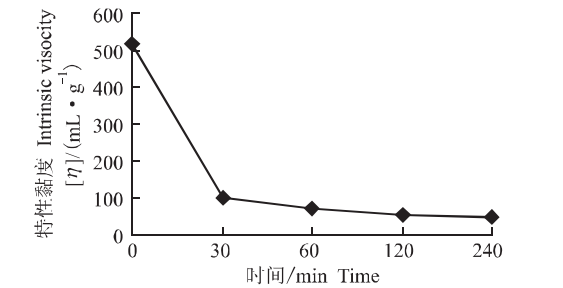


图 9 褐藻胶不同的酶解时间所得产物的黏度曲线
Fig.9 Progress curves for intrinsic viscosity of the degraded product of alginate by *Haliotis diversicoloe aquatilis* lyase

2.7 褐藻酸酶的降解产物的¹H-NMR 分析

图 10 阐明了不同降解时间的褐藻酸钠酶解产物和酸解产物之间的差别。从图 10 - A、B 可以看出,褐藻酸钠分子中的聚甘露糖醛酸首先降解,二聚体 MM 片段逐渐减少,而二聚体 MG、三聚体 GGM 和 MGM 的片段却相应增加,但是在图 B 和图 C 之间,却没有明显差别。与酶解不同的是,在褐藻酸钠的酸解过程中,首先降解的是三聚体 GGM、MGM 和 GGG 片段,而二聚体 GG 和 GM 片段却相应增加。从褐藻酸钠降解物的¹H-NMR 可以得出两个结论: (1) 九孔鲍褐藻酸酶是一种聚甘露糖裂解酶,属于 1,4—β 甘露糖醛酸裂解酶 (EC 4.2.2.3),其主要降解的糖苷键是 M-M; (2) 褐藻酸酶对褐藻酸钠的降解主要发生在 1 h 之内。

3 讨论

3.1 反应条件对褐藻酸酶活力的影响

褐藻酸酶的取得可以有多种途径,不同来源的褐藻酸酶对褐藻酸的酶解方式和性质也不相同。本实验从九孔鲍的内脏中获得了酶的粗提物,并对其性质进行了初步的研究,结果表明,该酶最适温度为 45 ℃,最适 pH 7.0。

底物浓度和酶浓度对酶活力的影响表明褐藻酸钠对褐藻酸酶的活性存在着促进作用,而其酶解产物对该酶的活性具有抑制作用,这两者的作用与浓度具有直接的关系。反应 2 h 达到平衡时加入与起始反应相同量的褐藻酸钠使得底物浓度增加,从而打破了这种平衡,使得促进作用加强,因而又有新的产物的生成,随着褐藻酸钠的减少和产物的增多,反

应体系最终又会达到一种平衡状态。而反应 2 h 达到平衡时加入与起始反应相同量的褐藻酸酶,生成了新的产物,说明反应达到平衡时体系内存有一定量的褐藻酸钠,加入新的酶液使得反应向着降解的方向进行,但随着产物的增加,抑制作用得到增强,直至达到新的平衡。这一结果与 Haugen 等^[11]等研究一致。

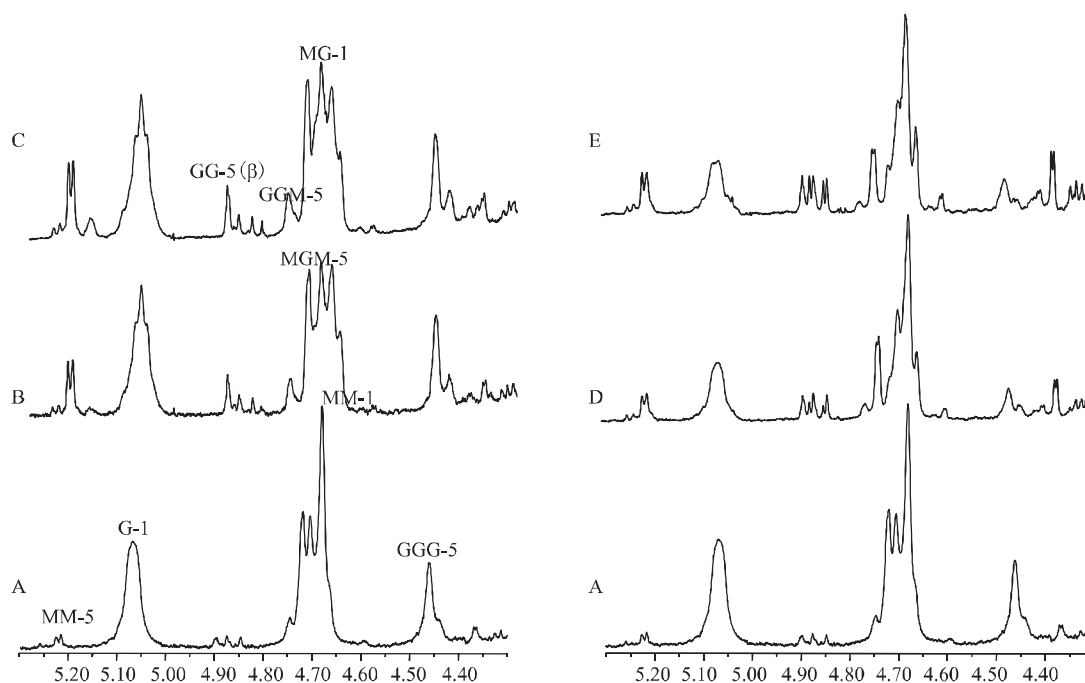


图 10 褐藻胶(A)、酶解褐藻胶 1 h 产物(B)、酶解褐藻胶 4 h 产物(C)、0.1 mol/mL HCl 降解褐藻胶 5 h 产物(D)和 0.1 mol/mL HCl 降解褐藻胶 7 h 产物的¹H-NMR。

Fig. 10 ¹H-NMR of the action of *Haliotis diversicolor aquatilis* lyase or acid on alginate. A alginate; B alginate acted by lyase for 1 h; C alginate acted by lyase for 4 h; D alginate acted by acid (0.1 mol/mL HCl) for 5 h; E alginate acted by acid (0.1 mol/mL HCl) for 7 h.

多种金属离子对酶活力有明显的影响,其中 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力具有明显的促进作用, Ag^{+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 表现出明显的抑制作用。冯蕾等^[12]研究表明,在较低离子浓度时, Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 对反应有显著的促进作用,离子浓度较高时作用不明显, Ag^{+} 和 Pb^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L 时对酶活力就有较强的抑制作用。而杨惠萍等^[8]的研究结果表明,在 0.1 mol/L 的浓度条件下, Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Hg^{2+} 、 Li^{2+} 和 Ba^{2+} 对皱纹盘鲍的褐藻酸酶的活性有显著的抑制作用,但是 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 却没有作用,这可能与所选用离子浓度高低和褐藻酸酶的来源等条件不同有关,其机理还

有待进一步研究。

3.2 褐藻酸酶降解产物的特性黏度变化

假设褐藻酸酶对褐藻酸钠的降解是随机的,随着时间的变化(t),体系的分子量(M)和底物的分子量(M_0)存在下列关系^[16]:

$$1/M = 1/M_0 + kt \quad (1)$$

k 为速率常数。

另外,高聚物溶液的特性黏度 $[\eta]$ 和高聚物分子量 M 之间的关系,通常用带有两个参数的 Mark-Houwink 经验方程^[89]来表示:

$$[\eta] = kM^\alpha \quad (2)$$

参数 α 值在 0.5~1.0 之间变化。

将方程(1)和(2)结合,可以得到下列方程

$$[\eta] = [\eta_0] / (1 + kt)^{\alpha} \quad (3)$$

其中 $[\eta_0]$ 是底物的特性黏度, $[\eta]$ 是水解一段时间 t 后的黏度。

从方程3可以看出,在随机降解的条件下,产物的特性黏度 $[\eta]$ 随着降解时间的延长而逐渐减小,亦即分子量逐渐降低。图9表明褐藻酸酶对褐藻酸钠的降解并非是随机的,它受到反应条件和褐藻酸钠分子结构的影响。这种影响主要表现在两个方面。

(1)产物的反馈抑制作用:褐藻酸钠的酶解产物对酶活性具有抑制作用,随着时间的加长,产物的量逐渐增加,从而阻止了酶对底物的降解作用。

(2)酶降解底物的专一性:褐藻胶是由聚古罗糖醛酸(G)、聚甘露糖醛酸(M)及其交替片段组成。本实验的研究表明九孔鲍褐藻酸酶是一种聚甘露糖裂解酶,只能降解褐藻酸钠大分子中聚古罗糖醛酸片段,而对其他的片段无降解作用。因而褐藻酸钠的古罗糖醛酸和甘露糖醛酸的比值和糖苷键的连接方式影响了褐藻酸酶的对底物的降解作用。

综上,影响九孔鲍褐藻酸酶活性的因素很多,本研究只对其中主要的因素进行了实验,而且是按单因子试验进行的,没有考虑多因子之间的相互作用,因此优化试验有待于进一步进行。另外,褐藻胶低聚糖具有多种生物活性,本实验仅对褐藻胶的酶降解产物进行了特性黏度实验,而其降解产物的分离、制备及其生物活性也有待于系统的研究。

参考文献:

- [1] Gacesa P. Alginates[J]. Carbohydr Polym, 1988, 8: 161-182.
- [2] Thiang Y W, Lori A P, Neal L S. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 289-340.
- [3] Haug A, Larsen B, Smidsrod O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis[J]. Acta Chem Scand, 1966, 20: 183.
- [4] Liu Y, Jiang X L, Cui H, et al. Analysis of oligomannuronic acids and oligoguluronic acids by high-performance anion-exchange chromatography and electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr, 2000, 884 (1): 105-111.
- [5] Nagasawa N, Mitomo H, Yoshii F. Radiation-induced degradation of sodium alginate[J]. Polym Degrad Stab, 2000, 69: 279-285.
- [6] Sutherland I W. Polysaccharide lyase[J]. FEMS Microbiol Rev, 1995, 16: 323-347.
- [7] 杨惠萍, 童圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报, 1998, 22 (4): 345-351.
- [8] Alain H, Claude G, Christine L, et al. NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric block of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase[J]. Carbohydr Res, 1996, 289: 11-23.
- [9] Alain H, Philippe C M, Sylvie G, et al. HPLC analysis of saturated and unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase[J]. Carbohydr Res, 1996, 291: 115-126.
- [10] 吴永沛, 何碧烟. 九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的提取纯化[J]. 海洋科学, 2002, 3 (26): 4-7.
- [11] Haugen F, Koriner F, Larsen B. Kinetic and specificity of alginate lyase: Part I, a case of study[J]. Carbohydr Res, 1990, 198: 101-109.
- [12] 冯蕾, 唐学玺, 王艳玲, 等. 褐藻酸降解酶特性的初步研究[J]. 海洋科学, 2006, 30 (2): 30-33.
- [13] Rinaudo M, Milas M. Enzymic hydrolysis of the bacterial polysaccharide xanthan by cellulase[J]. Int J Macromol, 1980, 2: 45-48.

Degradation effect factors and product analysis of alginate by *Haliotis diversicoloe aquatilis* lyase

WANG Bin¹, GAN Chun-ji², GUAN Hua-shi¹, XIE Miao²

(1. Institute of Marine Drug and Food, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Biotechnology Center of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this experiment, the effect factors on the degradation of alginate and the specificity of alginate lyase from *Haliotis diversicoloe aquatilis* were studied. Temperature and pH strongly affected the enzyme activity, and the enzyme was more stable in an acidity pH at lower temperature than in an alkalinity pH at higher temperature. The optimal temperature and pH value of the lyase were 45 °C and 7.0, respectively. The K_m and V_{max} values of the lyase were 0.211 mg/mL and 0.209 U_A/min in phosphate buffer, respectively; but they were 0.189 mg/mL and 0.258 U_A/min in Tris-HCl buffer, respectively. Thus the enzyme is considerably more efficient in Tris-HCl buffer than in phosphate buffer. The progress curves indicated that an apparent endpoint level of maximal conversion was reached within 2 h. This level was not only affected by the initial substrate concentration, but also dependent on the enzyme dose. The activity was raised slowly when sodium alginate concentration reached 0.3% and decreased with the increase of enzyme doses. Although the system have been reached the equilibrium level, but an addition of new substrate can lead immediately to an increased formation of product. The enzyme present cannot be considered inactivated or irreversibly inhibited. It should also be noted that the reaction induced by substrate addition at 2 h progressed at a much lower rate than the initial one and the reaction was too slow to reach a stable endpoint within the recorded period. This effect can only be explained by a reduced amount of enzyme accessible to the new substrate. A doubling of the enzyme concentration after 2 h could make curves approach those of the same total enzyme dose given initially. Thus, the apparent endpoint levels were unaffected by a multistep addition of enzyme as long as the final total dose was consistent. The reason may be that the product inhibited the enzyme activity and the reduction of substrate concentration. The effect of the ion indicated that the activity of lyase was activated by Co^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ , especially Co^{2+} and Mg^{2+} , which has increased by 62.7%, 50.8%, respectively. But Cu^{2+} , Ag^+ and Zn^{2+} significantly inhibited the enzymatic activity ($P < 0.01$); the activity was inhibited by 76.3%, 52.4% and 49.8%, respectively. The decrease of the viscosity with the time was due to the enzymatic degradation of alginate. It indicated that the change of $[\eta]$ isn't linear dependence; the viscosity of the solution almost reached an equilibrium level after 1 h. It may be explained by the strong, reversible product inhibition and the reduction of the substrate; on the other hand, the ratio of mannurate to guluronate in alginate also affected the mechanism of hydrolysis. ¹H NMR monitoring of the degradation of a commercial alginate sample found that M block was attacked with the fraction of MM dimmers decreased while the fraction of MG dimmers, GGM and MGM trimmers increased after epimerization. It indicated that the alginate lyase from *Haliotis diversicoloe aquatilis* was a kind of mannuronate (EC 4.2.2.3). But there is no obvious difference between alginate acted by the lyase for 1 h and alginate acted by the lyase for 4 h, it indicated that a majority of the polymer chains have alternated their structures during the first 1 hour. Compared with the degradation of alginate by enzyme, the GGM, MGM and GGG were first decreased and the GG and GM increased when the alginate was reduced by the acid (0.1 mol/L HCl). [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 659 – 666]

Key words: *Haliotis diversicoloe aquatilis*; alginate lyase; degradation