

文章编号:1005-8737(2001)03-0077-04

固定化木瓜蛋白酶水解甲壳胺的研究

王海英, 林洪, 叶眉, 薛长湖

(青岛海洋大学水产学院, 山东青岛266003)

摘要:木瓜蛋白酶经戊二醛固定于自制的甲壳质上制成固定化木瓜蛋白酶,其水解甲壳胺的最佳条件是:45℃,pH 4.0的1%的甲壳胺溶液(醋酸缓冲液配置),酶/底物比1:3.5(质量比)。震荡反应24 h后,用超滤器分离不同分子量的甲壳胺低聚糖产物,结果产物中分子量小于10 000的甲壳胺低聚糖得率约为45.55%,分子量小于5 000的约为34.0%,优于游离木瓜蛋白酶水解甲壳胺的效果。此固定化酶可反复使用至少10次以上,总反应时间达192 h,提高了酶的使用效率和酶解效果。

关键词:木瓜蛋白酶;酶固定化;甲壳胺;水解;低聚糖
中图分类号:Q55 **文献标志码:**A

甲壳胺低聚糖具有独特的生理活性和功能性质,在食品、医药行业近年被广泛应用^[1]。甲壳胺低聚糖的获得有酶解法和化学降解法^[2]。由于化学降解存在诸多弊端,而酶解法中专一性降解酶诸如甲壳质酶、甲壳胺酶价格又昂贵。因此,应用非专一性酶降解甲壳胺的研究日渐成为热点¹⁾,木瓜蛋白酶即是其中效果较好的一种。本文在前人研究的基础上^[3],将木瓜蛋白酶固定化以期提高酶解效果和木瓜蛋白酶的使用效率,及降低甲壳胺低聚糖制备成本。

1 材料与方法

1.1 材料

木瓜蛋白酶为 Serva 公司产品,比活为0.4 u/mg。甲壳质为市售,脱乙酰度15%,来源于蟹壳。甲壳胺为市售,脱乙酰度86%,来源于蟹壳。戊二醛(25%)为生化试剂,天津天泰精细化学品有限公司。其余试剂均为分析纯。

收稿日期:2000-11-30

基金项目:高等学校骨干教师资助计划项目

作者简介:王海英(1975-),女,博士生,水产品贮藏与加工专业。

1) 夏文水,等.非专一性水解酶解聚壳聚糖的研究[A].中国甲壳资源研究开发应用学术研讨会论文集[C].1997,194-199.

1.2 方法

1.2.1 50%乙酰化甲壳质的活化制备 取20 g甲壳质剪碎,置于12.5 mol/L NaOH约400 ml中60℃温浴3 h,取出,用蒸馏水充分洗涤至中性,80℃下烘至半干后溶于0.1% HCl中,用NaOH调pH为9,将沉降出的甲壳质用组织绞碎机打碎,水洗至中性,离心,烘干备用,乙酰度约为50%。

1.2.2 固定化木瓜蛋白酶的制备^[3] 称取1 g自制的约50%乙酰化甲壳质载体,加入20 ml 0.1 mol/L pH 6.5的PBS(内含5 mmol/L半胱氨酸,2 mmol/L EDTA,17.5 mg木瓜蛋白酶)溶液,于5℃下吸附15 min,加入5%戊二醛(逐滴加入,边加边搅拌),使其终质量分数在0.7%,再于5℃下交联14 h,取出后用pH 6.5的PBS溶液洗涤,抽干后置蒸馏水中保存。

此条件下制备得到的固定化木瓜蛋白酶以甲壳胺为底物时的活力为2.36 u/g。

1.2.3 粘度测定^[3] 用DNJ-旋转粘度计测定。

1.2.4 固定化木瓜蛋白酶活力测定(以甲壳胺为底物) 在10 ml、1%的甲壳胺溶液中(pH 4.0醋酸缓冲液配置,旋转粘度计测其初始粘度),加入3 g固定化木瓜蛋白酶,于45℃气浴恒温震荡器中反应1 h,再测反应后甲壳胺溶液粘度,计算酶活力单位。

固定化木瓜蛋白酶以甲壳胺为底物时的活力单位定义^[4],指在上述条件下,1 g 固定化木瓜蛋白酶每小时酶促反应降低底物粘度 1×10^{-3} pa·s 的酶量为 1 个酶活力单位,以 u 表示。

1.2.5 产物中低聚糖含量测定^[5] 蒽酮-硫酸法。

1.2.6 产物分离方法^[6] 应用截留分子量为 10 000 和 5 000 的超滤器进行超滤分离。

2 结果与讨论

2.1 固定化木瓜蛋白酶水解甲壳胺最佳条件的筛选

2.1.1 最佳操作 pH 分别取 3 g 制备好的固定化酶(相当于游离酶 28.51 mg),加入 30 ml pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0 的 1% 的甲壳胺醋酸缓冲溶液。25℃ 条件下,于气浴恒温振荡器中反应 24 h,抽滤取得滤液。用旋转粘度计测其粘度变化。

取滤液 2 ml,用相应 pH 的溶剂稀释至 20 ml,用 NaOH 调 pH 至 8,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液用蒽酮-硫酸法测含糖量 S_1 ;同时同样方法将未经水解的原液 pH 调至 8,同上离心,取上清液测含糖量 S_0 ;两者之差 $S_1 - S_0$ 即为水解所得低聚糖含量(表 1)。

表 1 不同 pH 对甲壳胺水解的影响

Table 1 The effect of pH on depolymerization of chitosan

项目 Item	pH			
	3.0	4.0	5.0	6.0
起始粘度/(10^{-3} pa·s) Beginning viscosity	102.5	107.5	57.5	63.1
终止粘度/(10^{-3} pa·s) Ending viscosity	71.5	56.5	32.5	37.5
粘度下降百分率/% Drop percent of viscosity	30.24	47.44	43.48	40.48
产物含寡糖量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Chitooligomers content	78.83	103.19	100.20	83.68

表 1 结果表明,在 pH 4.0 的甲壳胺醋酸缓冲液中固定化木瓜蛋白酶水解甲壳胺的效果最好。

2.1.2 最佳操作温度 将 4 份含 3 g 固定化酶和 30 ml 底物(pH 4.0, 1% 甲壳胺醋酸缓冲溶液)的反应液分别置于 15℃、25℃、35℃、45℃ 下的气浴恒温振荡器中反应 24 h,测其粘度变化。

各取 2 ml 反应液,用 pH 4.0 醋酸缓冲溶液稀释到 20 ml,用 NaOH 调 pH 至 8,4 000 r/min 离心 10 min,测上清中低聚糖含量 S_3 ;同样方法测原始

底物中低聚糖含量 S_2 ;两者之差 $S_3 - S_2$ 为反应所得低聚糖含量(表 2)。

表 2 结果表明,45℃ 水解条件下,甲壳胺溶液粘度变化情况及产物中低聚糖含量均优于其他温度条件。考虑到反应条件的控制及温度升高时酶活下降较快、产物褐变严重等因素,没有选择 45℃ 以上的温度验证,最终将最佳操作温度定为 45℃。

表 2 不同温度对甲壳胺水解的影响

Table 2 The effect of temperature on depolymerization of chitosan

项目 Item	温度/℃ Temperature			
	15	25	35	45
起始粘度/(10^{-3} pa·s) Beginning viscosity	107.5	107.5	107.5	107.5
终止粘度/(10^{-3} pa·s) Ending viscosity	76	67	64	45
粘度变化百分率/% Drop percent of viscosity	29.3	37.7	40.4	58.1
低聚糖含量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Chitooligomers content	89.77	158.96	177.72	247.95

2.1.3 酶/底物操作最佳比例 分别取 10、20、30、40 g 固定化酶(其中含纯酶约 95、190、285、380 mg),加入 100 ml 1% 的 pH 4.0 的甲壳胺醋酸缓冲溶液,即在酶/底物比例分别为 1:10.5、1:5.3、1:3.5、1:2.6 时,置 45℃ 的气浴恒温振荡器中反应 48 h,隔一定时间测其粘度变化(图 1)。

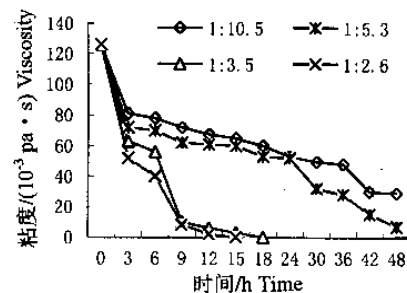


图 1 不同酶/底物比例下底物粘度下降情况

Fig. 1 Decrease of substrate viscosity with different ratio of immobilized papain/substrate

由图 1 可见,在酶/底物比例达 1:3.5、1:2.6 时反应体系水解速度显著高于酶/底物比为 1:10.5、1:5.3 时,又 1:3.5 和 1:2.6 比例下反应体系水解速度相差不大,因此确定 1:3.5 为最佳酶/底物比例。

2.2 固定化木瓜蛋白酶水解甲壳胺的使用时限

将 30 g 固定化酶加入 100 ml pH 4.0、1% 的甲

壳胺溶液中,于 45℃ 气浴恒温振荡器中反应,每隔 6 h 测其粘度,粘度值降至零后,更换新底物,并测其活力变化,如此反复操作 9 次(表 3)。结果显示,此固定化酶连续操作总反应时间达 192 h 后,固定化木瓜蛋白酶对甲壳胺的水解能力虽有所下降,但仍可持续使用,亦即此固定化酶的操作周期至少为 192 h。这一实验结果已优于 Riccardo 报道^[3]的 169 h。

表 3 固定化酶水解甲壳胺连续操作效果

Table 3 The result of chitosan depolymerization by immobilized papain with continuous conduction $10^{-3} \text{pa} \cdot \text{s}$

批次 Batch	时间/h Duration					酶活力/($\text{u} \cdot \text{g}^{-1}$) Enzym activity
	0	6	12	18	24	
1	93.5	51.0	9.0	0.0	—	2.33
2	92.0	50.0	7.5	0.0	—	2.27
3	92.5	51.5	8.5	0.5	—	2.18
4	87.0	49.5	6.0	0.0	—	2.16
5	94.0	55.0	11.0	0.7	0.0	2.00
6	89.5	53.5	11.0	2.5	0.0	1.97
7	95.5	60.0	14.0	3.5	0.0	1.83
8	92.0	59.0	14.2	4.0	0.2	1.69
9	90.5	60.1	21.5	12.6	5.3	1.66

2.3 水解产物的分析

将 30 g 固定化酶加入 100 ml pH 4.0、1% 的甲壳胺溶液中,于 45℃ 下置气浴恒温振荡器中反应 24 h 后,滤出反应液,置超滤器中,在不断搅拌的情况下于 4 kg 压力下过 10 000 分子量的超滤膜,取少量滤液用蒽酮-硫酸法分析其中甲壳胺低聚糖含量;其余滤液继续同样条件下过 5 000 分子量的超滤膜,同样取滤液分析其中甲壳胺低聚糖含量。同样,将游离木瓜蛋白酶和甲壳胺底物以 1:10 的比例在 pH 4.0、45℃ 下进行反应,24 h 后,同样将产物经截留分子量为 10 000 和 5 000 的超滤膜进行产物分离,并测其甲壳胺低聚糖含量(表 4)。

表 4 水解产物得率

Table 4 The ratio of depolymerized production

项目 Item	分组 Group	
	A	B
分子量范围 Range of molecular weight	<10 000	<5 000
固定化酶粗产品得率/% Crude production/immobilized papain	45.55	34.00
游离酶粗产品得率/% Crude production/soluble papain	38.32	30.20

比较可知,游离木瓜蛋白酶水解底物 24 h 后,10 000 分子量以下的甲壳胺低聚糖得率为 38.32%。这一结果低于固定化酶水解 48 h 之后的得率。而且,游离木瓜蛋白酶只能使用 1 次,约 1 mg 酶水解 1 ml 1% 的底物溶液;而固定化酶可以至少使用 10 次,大约每毫克酶可水解至少 3.5 ml 1% 的底物。

木瓜蛋白酶经固定化后,无论是水解效果还是酶利用效率均得到明显提高。这一结果为固定化酶水解甲壳胺,生产甲壳胺低聚糖的工业化提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 夏文水,吴炎楠.甲壳素/壳聚糖水解酶的研究进展[J],中国海洋药物杂志,1997,(2):31-35.
- [2] Yaipani M, Pantaleone D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J], Carbohydrate Research, 1994, 256: 159-175.
- [3] Riccardo A A Muzzarelli, Marco Tomassetti, Pierluca Ilari. Depolymerization of chitosan with the aid of papain[J], Enzyme Microb Technol, 1994, 16, (2): 110-113.
- [4] 罗九甫.酶和酶工程[M].上海:上海交通大学出版社,1996. 205-213.
- [5] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].浙江:浙江大学出版社,1994. 17-18.
- [6] 严希康.生化分离技术[M].上海:华东理工大学出版社,1996. 99-111.

Study on depolymerization of chitosan by immobilized papain

WANG Hai-ying, LIN Hong, YE Mei, XUE Chang-hu

(Department of Food Technology & Engineering, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Glutaric aldehyde as cross linking agent was used to immobilize papain on chitin. The optimum conditions for depolymerizing chitosan by the immobilized papain were as follows; temperature 45℃, pH 4.0, and the weight ratio of immobilized papain to substrate was 1:3.5. After 24 h's reaction with stirring, the ultrafil-

tration was used to isolate the chitooligomers into different ranges of molecular weight. The yield rate of chitooligomers with molecular weight below 10 000 was 45.55% to total substrate, and 34% below molecular weight 5 000. The immobilized papain could be used at least 10 times repeatedly, and the total reaction time was more than 192 h, which is longer than 182 h reported previously. When the free papain was used to depolymerize chitosan, the yield rate of chitooligomers with molecular weight below 10 000 was 38.32%. The free papain could be used only once. The result indicated that the depolymerization efficiency of immobilized papain was obviously higher than that of free papain.

Key words: papain; enzyme immobilization; chitosan; depolymerization; chitooligomers

欢迎订阅 2002 年《水产科技情报》

《水产科技情报》杂志创刊于 1973 年,是由上海市水产研究所、上海市水产技术推广站、上海市水产学会主办的技术类期刊。近年来,《水产科技情报》先后被列为“全国水产、渔业核心期刊”、“上海市科技类核心期刊”,并在上海市、全国优秀科技期刊以及全国优秀水产报刊的历次评比中连续获奖。编辑部还在 1996~1997 年度、1998~1999 年度荣获上海市广告业重信誉、创优质服务先进单位称号。

本刊辟有综述、淡水养殖、海水养殖、水产资源、饲料研究、水产品加工、病害防治、渔业环境、渔业经济、水产捕捞等栏目以及以水产养殖为主的专题讲座。2001 年第 1 期又新增了《观赏鱼和水族生态》专栏,以满足读者对休闲渔业日益增长的需求。为进一步适应渔业生产的需要,本刊今后将逐步增加对渔业实用生产技术的报道,适当报道具有实用价值的科研成果及动态信息。

本刊为双月刊,大 16 开,48 页,国内外公开发售。邮发代号:4-204,定价 4.00 元,全年 24.00 元。请读者及时到当地邮局办理 2002 年度订阅手续,如果邮局订阅不便或漏订,也可直接汇款到编辑部。

编辑部地址:上海市佳木斯路 265 号 邮政编码:200433 联系电话:021-65483215

传真:021-65489796 联系人:侯妙福。

本刊承接各类渔业商品广告,涂塑封页,彩色、双色、单色插页设计独到,制作精良,欢迎中外企业惠顾。

欢迎订阅 2002 年《水利渔业》

《水利渔业》是由水利部中国科学院水库渔业研究所主办的水产技术刊物,主要栏目包括:研究与探索、名特优新、增殖养殖、营养与饲料、病害防治、捕捞加工、资源与环境、水产综述、渔业经验、水产信息等。本刊以实用技术为主,技术与经济并重,兼顾信息交流,对水产科研、渔业开发、技术推广、知识更新、渔业致富有实用价值,适合广大科研、推广、教学、生产和管理的水产工作者阅读。

本刊系中国水产核心期刊,湖北省一级优秀期刊,水利部优秀期刊,全国水产系统优秀期刊,中国自然科学核心期刊,《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》全文收录,《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊全文收录,已连续三次被评为湖北省优秀期刊。本刊为双月刊,大 16 开,56 页,国内外公开发售。国内统一刊号 CN42-1247/S,国际标准刊号 ISSN1003-1278,欢迎广大新老朋友到邮局订阅。

邮发代号:38-76。每期定价 5.00 元,全年 6 期 30.00 元。本刊欢迎读者汇款到编辑部邮购。

地址:湖北省武汉市武昌雄楚大街 578 号《水利渔业》编辑部 邮政编码:430079

联系电话:027-87803555 欢迎各企事业单位刊登广告。