

纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖的动力学研究*

周桂¹ 何子平² 邓光辉¹ 黄在银¹ 谭学才¹

(¹ 广西民族大学化学与生态工程学院 南宁 530006)

(² 广西农业科学院 南宁 530006)

摘要 采用还原糖测定法,研究了纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖过程中酶反应动力学参数,比较了以壳聚糖为底物的纤维素酶与淀粉酶的催化反应动力学特性。研究表明,反应最适温度均为 50 ℃;最适 pH 值为 5.4;纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖米氏常数 K_m 值分别为:1.68 mg/ mL、0.17 mg/ mL;最大酶反应速度 V_{max} 分别为:1.24 mg · L⁻¹ · min⁻¹、1.22 mg · L⁻¹ · min⁻¹。

关键词 壳聚糖降解 纤维素酶 淀粉酶 酶反应速度

中图分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 3096(2003)11 - 0059 - 04

低聚水溶性壳聚糖具有良好的水溶性、吸湿保湿性以及抗菌、抑菌、提高机体免疫、抗肿瘤、降低血压、吸附胆固醇等功能。因而有极为广阔的应用前途。近年来,低聚水溶性壳聚糖的研究已引起各国学者的关注,壳聚糖降解的主要方法包括化学降解法、物理降解法和酶降解法。酶法降解因条件温和、选择性高、易于控制、污染小、产物安全性好,而越来越引起重视和关注。酶法水解壳聚糖制备壳寡糖已成为甲壳素领域的一个研究热点^[1]。目前已发现 30 多种专一或非专一性酶可用于壳聚糖的降解反应,专一性水解酶主要是指壳聚糖酶;非专一性水解酶如脂肪酶、溶菌酶、蛋白酶、聚糖酶等^[2-4];非专一性水解酶由于来源广,成本低,受到广泛的关注。纤维素酶与淀粉酶是两种常见的聚糖酶,有关纤维素酶或淀粉酶非专一性降解壳聚糖的研究已有报道,但对纤维素酶与淀粉酶的非专一性降解壳聚糖的比较研究未见报道。

本文研究比较了纤维素酶与淀粉酶的非专一性降解壳聚糖的动力学参数与催化特性,为利用非专一性纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖制备壳寡糖提供重要的参考数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

纤维素酶:上海化学试剂公司生产,酶活力大于或等于 1 500 U/g。

淀粉酶:上海化学试剂公司生产,酶活力大于或等于 2 000 U/g。

壳聚糖:脱乙酰度 83.97%,平均分子量 4.9×10^4 。

1.2 方法

1.2.1 氨基葡萄糖标准曲线的绘制 准确称取 10 g 铁氰化钾,溶解于 1 000 mL 0.5 mol/L Na₂CO₃ 溶液,贮于棕色试剂瓶中备用。准确配制 2 mg/mL 的氨基葡萄糖溶液,在带塞子试管中分别加入 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 氨基葡萄糖溶液,再分别加入 1.5 mL 铁氰化钾溶液,定容至 10 mL。

1.2.2 还原糖浓度及酶反应速度的测定^[5] 在具塞的试管中加入 5 mL 经酶降解后的壳聚糖溶液,用 0.5 mol/L NaOH 溶液调节其 pH 至 7~8,加入 1.5 mL 1.00 g/100 mL 的碱性铁氰化钾溶液,蒸馏水定容至 10 mL,混合均匀,试管加塞后,沸水浴反应 15 min,冷却,用蒸馏水定容至 20 mL。过滤反应液,在 420 nm 波长,以光径为 0.5 cm 的比色皿测吸光值 A_{420} ,再测出以蒸馏水代替壳聚糖酶解液的碱性铁氰化钾显色

* 广西壮族自治区教育厅资助项目。

第一作者:周桂,出生于 1969 年,讲师,主要从事壳聚糖的生物转化与利用研究。E-mail:zhouguigx@hotmail.com

收稿日期:2003 - 08 - 25;修回日期:2003 - 09 - 18

剂溶液的光密度 A_{420} , 算出 $\Delta A_{420} = A_{420} - A_{420}$, 根据 ΔA_{420} , 由标准曲线即可查出还原糖浓度, 以单位时间内还原糖浓度的变化表示酶反应速度。

1.2.3 温度对酶促反应速度的影响实验 在 30~80 °C 的范围内, 于 5 mL 0.5% 壳聚糖溶液 (pH=4) 中加入一定量的纤维素酶溶液和淀粉酶溶液, 用 pH=4 的缓冲溶液定容至 10 mL, 置于不同温度的恒温水浴中反应 1 h 后比色测定还原糖浓度及酶反应速度。

1.2.4 pH 值对酶促反应速度的影响实验 取 pH=3.6~5.8 的 0.5% 壳聚糖醋酸盐溶液 5 mL, 分别加入一定量的纤维素酶溶液和淀粉酶溶液, 用醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 10 mL, 于 50 °C 下反应 1 h, 然后比色测定还原糖浓度及酶反应速度。

1.2.5 反应时间对酶促反应速度的影响实验 将 pH=5.4, 浓度为 0.25 g/100 mL 壳聚糖醋酸-醋酸钠缓冲液分别与一定量的纤维素酶与淀粉酶于 50 °C 反应, 反应体系中纤维素酶与淀粉酶浓度均为 0.400 mg/mL。每隔一定时间取样, 比色测定还原糖浓度及酶反应速度。

1.2.6 酶浓度对酶促反应速度的影响实验 分别在 pH=5.4, 浓度为 0.25 g/100 mL 壳聚糖醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 加入不同量的纤维素酶溶液与淀粉酶溶液, 于 50 °C 温度下反应 1 h, 然后各取反应液进行比色测定还原糖浓度及酶反应速度。

1.2.7 底物浓度对酶促反应速度的影响实验 取不同浓度的壳聚糖溶液 (pH=5.4), 分别加入一定量的纤维素酶液与淀粉酶溶液, 保持纤维素酶液与淀粉酶溶液的体系浓度为 0.400 mg/mL, 于 50 °C 温度下反应 1 h 后各取反应液进行比色测定还原糖浓度及酶反应速度。

2 结果与讨论

2.1 温度对酶促反应速度的影响

从图 1 可以看出, 酶反应时间为 1 h 时, 在 30~50 °C 间, 随着温度的升高, 酶反应速度增大; 50 °C 时, 纤维素酶与淀粉酶反应速度均达最大值; 而在 50~80 °C 时则逐渐降低, 温度超过 50 °C, 纤维素酶与淀粉酶均因为酶蛋白部分变性失活而使酶反应速度降低。可见纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖的最适温度均为 50 °C。

2.2 pH 值对酶促反应速度的影响

从图 2 可知, 纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖的最适 pH 均为 5.4。但 pH 值在 3.6~5.8 时, 纤维素酶反应速度受 pH 值的影响显著, pH 偏离最适 pH 5.4, 酶反应速度显著降低。淀粉酶反应速度也受 pH 值的影响, 但没有纤维素酶那么显著, pH 偏离最适 pH 5.4, 酶反应速度变化不大, 这说明淀粉酶的 pH 适应性比纤维素酶大。

2.3 反应时间对酶促反应速度的影响

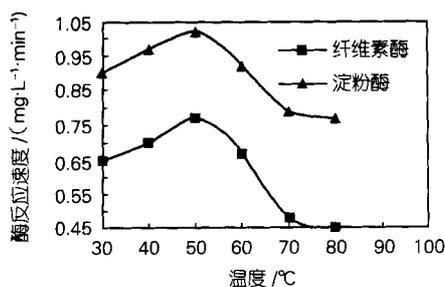


图 1 温度对酶反应速度的影响

Fig.1 Effect of temperature on reaction velocity

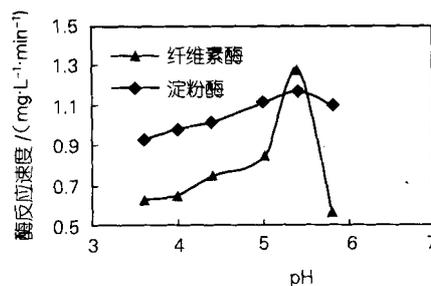


图 2 pH 对酶反应速度的影响

Fig.2 Effect of pH on reaction velocity

由图 3 及图 4 可知, 反应在 0~5 h 内, 随着反应时间的延长, 纤维素酶与淀粉酶酶解产物的还原糖浓度逐渐增加, 5 h 后, 还原糖的浓度增加缓慢, 最后趋于平稳。0~60 min 之间, 随着反应时间的延长, 纤维素酶与淀粉酶解产物的还原糖浓度呈线性增加, 线性

方程分别为: $Y=0.4721X+7.6047$, $R^2=0.9952$, $Y=0.1643X+59.143$, $R^2=0.9987$ 。说明纤维素酶与淀粉酶酶解壳聚糖的酶反应速度在 0~60 min 内保持恒定。60 min 以后, 由于产物的抑制、酶的部分变性失活等因素的影响, 酶反应速度逐渐降低。为了正确确

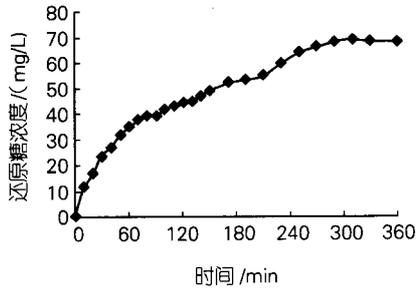


图3 反应时间对纤维素酶反应速度的影响
Fig.3 Effect of reaction time on reaction velocity

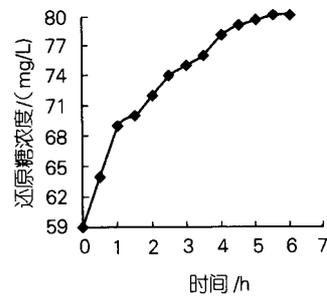


图4 反应时间对酶反应的影响
Fig.4 Effect of reaction time on reaction velocity

定酶反应速度并避免以上因素的干扰,测定纤维素酶与淀粉酶解壳聚糖的酶反应速度时,酶反应时间以60 min 以内为宜。

2.4 酶浓度对酶促反应速度的影响

由图5可以看出,当壳聚糖的浓度为0.25 g/100 mL时,纤维素酶浓度在0.01~0.27 mg/mL 范围内,随着酶浓度的增加,纤维素酶反应速度呈线性增加,

线性方程为: $Y=3.9943X+0.0788$, $R^2=0.9955$ 。

由图6可以看出,当壳聚糖的浓度为0.25 g/100 mL时,淀粉酶浓度在0.05~0.25 mg/mL 范围内时,随着淀粉酶浓度的增加,酶反应速度呈线性增加,线性方程为: $Y=2.08X+0.172$, $R^2=0.9967$ 。说明当底物足够过量时,酶反应速度与酶浓度成正比例关系。

2.5 底物浓度对酶促反应速度的影响

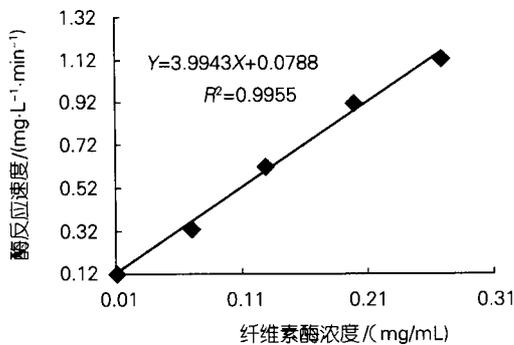


图5 纤维素酶浓度对酶反应速度的影响
Fig.5 Effect of cellulase enzyme concentration on reaction velocity

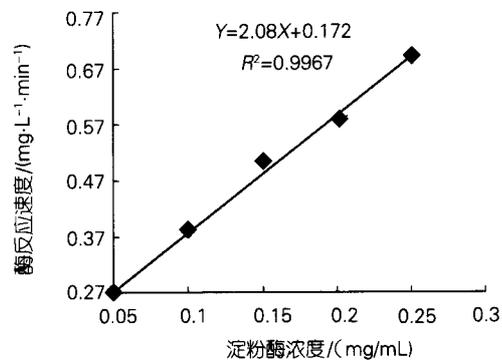


图6 淀粉酶浓度对酶反应速度的影响
Fig.6 Effect of amylase enzyme concentration on reaction velocity

纤维素酶浓度为0.400 mg/mL时,壳聚糖浓度在0.25~2.0 mg/mL 范围内时,随着壳聚糖浓度的增加,酶反应速度呈线性增加,线性方程为: $Y=0.2338X+0.2182$, $R^2=0.9959$ 。壳聚糖浓度大于2.0 mg/mL 以后,酶反应速度增加缓慢,趋于稳定。淀粉酶浓度为0.400 mg/mL,壳聚糖浓度在0.05~0.75 mg/mL 时,随着壳聚糖浓度的增加,酶反应速度呈线

性增加,线性方程为: $Y=0.4652X+0.7178$, $R^2=0.9939$ 。壳聚糖浓度大于0.75 mg/mL 以后,酶反应速度增加缓慢,趋于稳定。说明在低底物浓度时,酶反应速度与底物浓度成正比例关系,高底物浓度时,酶与底物的结合逐渐达到饱和,酶反应速度增加不显著,直到酶与底物的结合饱和,酶反应速度不再增加。

从图 7 及图 8 可看出, Line weaver - Burk 法双倒数作图, 双倒数图呈直线, 由此可知, 纤维素酶与淀粉酶对壳聚糖的降解属米氏酶的特性, 符合米氏方

程规律。双倒数图的横坐标与纵坐标截距分别为米氏常数的倒数 ($1/K_m$) 与最大酶反应速度的倒数 ($1/V_{max}$)。

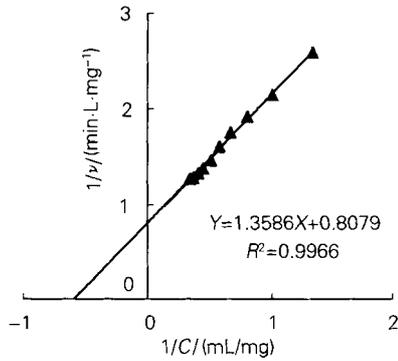


图 7 反应速度与壳聚糖浓度的双倒数图
Fig.7 Double reciprocal plot of reaction velocity versus chitosan concentration

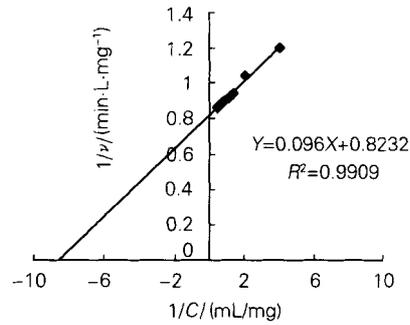


图 8 反应速度与壳聚糖浓度的双倒数图
Fig.8 Double reciprocal plot of reaction velocity versus chitosan concentration

所以纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖的米氏常数 K_m 分别为: 1.68 mg/ mL 、 0.17 mg/ mL , 最大酶反应速度 V_{max} 分别为: $1.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $1.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。纤维素酶与淀粉酶降解壳聚糖的米氏方程 $v = V_{max} \cdot C_s / (K_m + C_s)$ (C_s 为底物浓度) 分别为: $v = 1.24 \cdot C_s / (1.68 + C_s)$ 、 $v = 1.22 \cdot C_s / (0.17 + C_s)$ 。纤维素酶米氏常数 K_m 大于淀粉酶, 说明纤维素酶与壳聚糖的亲合力小于淀粉酶。

3 结论

纤维素酶与淀粉酶作为催化壳聚糖降解的非专一性酶, 能有效地催化壳聚糖降解。得出了降解过程中最适温度为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$; 最适 pH 值为 5.4 ; 淀粉酶降解壳聚糖的 pH 适应性优于纤维素酶; 纤维素酶与淀粉酶对壳聚糖的降解属米氏酶的特性; 淀粉酶与壳聚糖的亲合力大于纤维素酶。有关淀粉酶与纤维素酶降解壳聚糖的机理有待进一步研究。

参考文献

- 1 You J J, Shahidif, K. S. Preparation of chitin and chitosan chitooligosacchrides and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, 2000, 16(2): 159 - 176
- 2 Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. Unusual susceptibilities of chitosan to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr Res*, 1992, 237: 325 - 332
- 3 Yalpani M, Pantaleone D. An examination of the unusual susceptibilities of a minoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr Res*, 1994, 256: 159 - 175
- 4 You J J, Kim S. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochem*, 2000, 5(6): 623 - 632
- 5 周桂, 黄在银, 谭学才, 等. 溶菌酶对海洋生物高分子壳聚糖的降解研究. *海洋科学*, 2002, 26(3): 53 - 56

(下转第 67 页)

(上接第 62 页)

ENZYME KINETICS OF AMYLASE AND CELLULASE ON HYDROLYZING CHITOSAN

Zhou Gui¹ He Zi - Ping² Deng Guang - Hui¹ Huang Zai - Yin¹ Tan Xue - Cai¹

(¹ College of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi Minzu University, Nanning, 530006)

(² Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007)

Received: Aug., 25, 2003

Key Words: Chitosan, Amylase, Cellulase, Hydrolysis

Abstract

The enzyme kinetics of amylase and cellulase on hydrolyzing chitosan were studied in detail in this paper by investigating the effects of reaction temperature, pH, time, substrate and enzyme concentration on the hydrolytic rate. Both enzymes had the same optimum temperature of 50 °C and similar optimum pH of 5.4. The K_m values of amylase and cellulase were 1.68 mg/mL and 0.17 mg/mL, and their maximum reaction velocity, i.e. V_{max} , were 1.24 mg · L⁻¹ · min⁻¹ and 1.22 mg · L⁻¹ · min⁻¹ respectively.

(本文编辑:张培新)