

不结球白菜叶片壳聚糖酶的理化特性研究

陈惠萍^{1,2}, 徐朗莱¹

(1. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 华南热带农业大学 农学院, 海南 儋州 571737)

摘要:通过不结球白菜叶片壳聚糖酶对壳聚糖的降解,研究了温度、pH、时间及金属离子等对此壳聚糖酶的影响。结果表明,壳聚糖酶的最适温度为 45℃,最适 pH 为 5.5,酶促反应速度在 6 h 内达到最大值; Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 对壳聚糖酶促反应分别起到促进和抑制的作用。经薄板层析分析证实,壳聚糖酶降解壳聚糖为低聚物。

关键词:不结球白菜;壳聚糖酶;最适温度;最适 pH;低壳聚糖

中图分类号:Q945

文献标识码:A

文章编号:1000-3096 (2006)05-0036-04

壳聚糖是几丁质脱乙酰化后的产物,其溶解性虽比几丁质有很大提高,但也只能在某些酸类介质中溶解,因此其应用还是受到很大限制。壳聚糖酶是分解壳聚糖的专一性酶,是 20 世纪 70 年代初期发现的一种新酶。虽然在高等植物中尚未发现壳聚糖的存在,但壳聚糖酶却广泛存在于单子叶和双子叶植物的不同组织中^[1]。它可以降解壳聚糖为壳寡糖,壳寡糖是指 2~10 个氨基葡萄糖以 β 1,4-糖苷键连接而成的低聚糖,比壳聚糖具有更高的生物活性,更易被植物体吸收利用。欧阳寿强等^[2]研究表明,壳聚糖处理不结球白菜后,能有效地改善其农艺形状及提高品质。因此,要弄清壳聚糖直接处理不结球白菜叶片后,是否诱导了壳聚糖酶的产生及壳聚糖酶是否降解了壳聚糖,然后通过壳寡糖起作用。作者对壳聚糖酶的一些基本特性进行研究,为今后研究壳聚糖直接施用于蔬菜作物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖由南京农业大学生命科学学院生化研究室张益民老师提供,粘均分子质量为 5.03×10^5 。不结球白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* (L.) Makino) 品种矮杂 1 号种子由南京农业大学园艺学院侯喜林老师提供。

1.2 分析方法

1.2.1 壳聚糖溶液的配制

1 g 壳聚糖溶解于 100 mL 0.2% 的乙酸钠溶液,用 NaOH 溶液调节 pH 至 5.6 (壳聚糖在此 pH 值下具有最大的活性^[3])。

1.2.2 壳聚糖酶液的提取

称取 1.00 g 不结球白菜叶片,加入 3 mL 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.2) 研磨,于 10 000 r/min 离心 30 min,上清液即为粗提壳聚糖酶液。

1.2.3 还原糖浓度的测定

采用 DNS 法^[4]。吸取 1 mL 反应液和 5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,并加蒸馏水至 25 mL,然后沸水中反应 5 min,冷却后于 520 nm 处测其吸光度 A 值。以葡萄糖溶液作为标准溶液。

1.2.4 还原糖薄板层析

根据 Yoon 等^[5]人的方法稍加改进。将壳聚糖溶液与壳聚糖酶粗提液作用后的反应液置于蒸发皿中,于 80℃ 水浴中将水蒸发,并用 95% 的乙醇将反应物中的糖提取,在铺好的薄板上点上样品,20 μ L/点。流动相为乙酸乙酯:甲醇:乙酸:水按 12:3:3:2 的体积比例混合,显色剂为茚三酮溶液。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖酶活性在不同反应时间内的变化

从不结球白菜叶片中提取壳聚糖酶,并将其与 10 g/L 的壳聚糖分别作用 2, 6, 10 h 后,检测到了酶活性,结果如图 1。其中反应 6 h 时,相对的酶活性最高,比对照增加 1.5 倍,而在 10 h 时酶活性仅比对照增加 0.3 倍。即反应进行 6 h 后,还原糖质量浓度变

收稿日期:2004-03-24;修回日期:2004-06-20

作者简介:陈惠萍(1964-),女,广东澄海人,博士,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:hpchen@sina.com;徐朗莱,通讯作者,博导,E-mail:xulanglai@njau.edu.cn

化缓慢。其原因是由于降解产物中底物质量浓度过高,从而对酶促反应产生抑制作用,表明了不结球白菜叶片中存在壳聚糖酶,并且壳聚糖可以被壳聚糖酶降解为低壳聚糖。

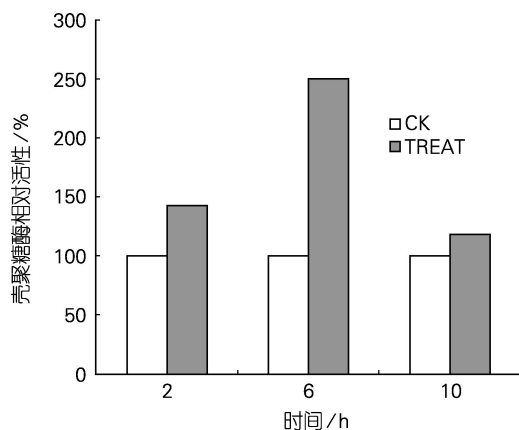


图1 不同反应时间内壳聚糖酶的活性变化

Fig. 1 Changes of chitosanase activity in different times

2.2 温度对壳聚糖酶促反应的影响

将质量浓度为 10 g/L 的壳聚糖溶液 7 份(5 mL/份)与 7 份(1 mL/份)从不结球白菜叶片中提取的壳聚糖酶溶液充分混合,分别置于 25,30,35,40,45,50 和 55 °C 水浴中保温 1 h,然后分别测定不同温度下反应液中的还原糖质量浓度,从图 2 可以看出,壳聚糖酶在 45 °C 下催化壳聚糖生成的还原糖最多,即不结球白菜叶片中的壳聚糖酶降解壳聚糖的最适温度是 45 °C,且壳聚糖酶活性在 30~40 °C 范围内,变化较缓,当温度超过 45 °C,活性又较快丧失。

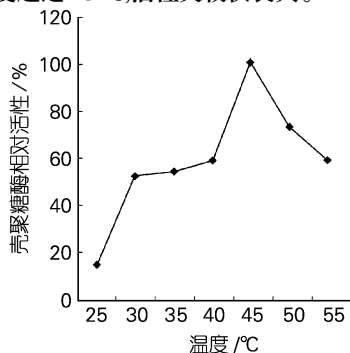


图2 不同反应温度下壳聚糖酶的活性变化

Fig. 2 Changes of chitosanase activity in different temperatures

2.3 pH 值对壳聚糖酶促反应的影响

分别将 6 份 5 mL 壳聚糖溶液(10 g/L),6 份 pH 分别为 4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5 的醋酸缓冲液(2 mL/份)和 6 份从不结球白菜叶片中提取的壳聚糖酶溶液(1 mL/份)充分混合,均置于 45 °C 水浴中保温 1 h,测其还原糖质量浓度。从图 3 可见,在 pH 5.5 时,壳聚糖酶发挥了最大的酶活,在 pH 4.5~5.5 时,相对酶活迅速上升,在 pH 5.5~6.0 时,相对酶活大幅度下降。

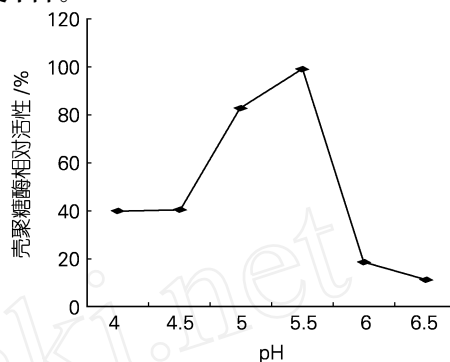


图3 不同 pH 壳聚糖酶的活性变化

Fig. 3 Changes of chitosanase activity in different pH values

2.4 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 对壳聚糖酶活性的影响

在 3 份壳聚糖酶液(1 mL/份)中分别加入 1 mL 蒸馏水(CK)、1 mL 10 mmol/L Mn^{2+} 溶液和 1 mL 10 mmol/L Cu^{2+} 溶液,随之各加入 5 mL 10 g/L 壳聚糖溶液和 2 mL pH 5.5 的乙酸缓冲液,于 45 °C 水浴保温 1 h,测还原糖的质量浓度。结果表明(图 4)10

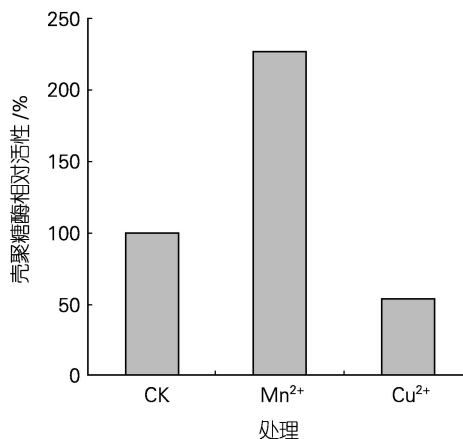


图4 不同金属离子对壳聚糖酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different ions on the chitosanase activity

mmol/L Mn^{2+} 使壳聚糖酶活性提高了 1.3 倍,而 Cu^{2+} 则使壳聚糖酶活性下降了 46 %。因此,在反应液中加入一定量的 Mn^{2+} 可以加快酶促反应速度。

2.5 壳聚糖经壳聚糖酶作用后降解为低壳聚糖

将从不结球白菜叶片中提取的壳聚糖酶与 10g/L 壳聚糖溶液作用后,将反应液置于蒸发皿中,于 80 °C 冰浴中将水蒸发,并用 95 % 的乙醇将反应物中的糖提取,跑薄板层析,经显色处理后,显示单纯 10g/L 壳聚糖溶液在板上没有出现糖点(图 5 中 1) 不加壳聚糖提取液的显示 1 个糖点(图 5 中 2) 而 10g/L 壳聚糖与壳聚糖酶液的反应液则显示 3 个糖点(图 5 中 3)。说明壳聚糖处理不结球白菜叶片后,经过壳聚糖酶的作用降解为低聚物,再通过低壳聚糖对不结球白菜叶片起生理作用。



图 5 壳聚糖降解产物的薄板层析分析

Fig. 5 Analysis of thin - board chromatography of decomposed products of chitosan

3 讨论

通过对不结球白菜叶片壳聚糖酶降解壳聚糖的研究,表明用壳聚糖处理不结球白菜叶片后,壳聚糖被降解为壳寡糖。因此,壳聚糖对不结球白菜所起的作用可能是通过壳聚糖酶来实现的,这点对阐明壳聚糖调节不结球白菜的作用时,显得相当重要。并确定了壳聚糖酶降解壳聚糖的最适 pH 和温度分别为 5.5 和 45 °C;酶活性在反应 6 h 达到最大值,其后随反应时间的延长呈现下降的趋势。某些金属离子在壳聚糖酶的酶促反应中起作用,如 Mn^{2+} 对壳聚糖酶的降解具有一定的促进作用,而 Cu^{2+} 对该酶降解则有抑制作用。这可能是因壳聚糖能与重金属离子结合形成比较稳定的复合物,从而产生底物抑制作用,使酶促反应速度大大降低的结果。

参考文献:

- [1] 张来虎,赵玉清,范圣第,等. 壳聚糖酶的研究进展[J]. 化学通报,1999, 5:32-35.
- [2] 欧阳寿强,徐朗莱. 壳聚糖对不结球白菜营养品质和某些农艺形状的影响[J]. 植物生理通讯, 2003, 39 (1):21-24.
- [3] El Ghaouth A, Ponnampalam R, Castaigne F, *et al.* Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes [J]. *Hort Science*, 1992, 27 (9):1 016-1 018.
- [4] Miller L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1987, 31: 426-431.
- [5] Yoon H G, Kim H Y, Kim H K, *et al.* Thermostable chitosanase from bacillus purification characterization and reaction patterns[J]. *Biosci Biotechnol*, 2001, 65 (4):800-809.

Studies on chemical and physical characters of chitosanase from non-heading Chinese cabbage leaves

CHEN Hui-ping^{1,2} , XU Lang-lai¹

(1. College of Life Science , Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095 ,China; 2. College of Agronomy , South China Tropical Agriculture University , Danzhou 571737 , China)

Received : Mar. ,24 ,2004

Key words : non-heading Chinese cabbage ; chitosanase ; optimal temperature ; optimal pH ; chitooligosaccharides

Abstract : The effects of temperature , pH , time and metal ion on chitosanase activity from non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino) leaves were investigated. The results show that the optimal temperature and pH are 45 °C and 5.5 in degrading chitosan respectively. Otherwise , analysis of thin-board chromatograph revealed that chitosan was decomposed into chitooligosaccharides by chitosanase.