

文章编号: 1004 - 7271(2001)03 - 0243 - 05

蜗牛酶降解部分乙酰化甲壳素的动力学

袁 航, 周培根

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要: 使用蜗牛酶对水溶性部分脱乙酰化甲壳素进行降解, 由粘度降低($\Delta 1/[\eta]$)对时间的变化曲线确定降解反应初始速率, 该降解曲线呈非线性, 而用浓盐酸降解的曲线呈现较好的线性。随着甲壳素脱乙酰度的降低, 酶降解反应速率迅速增加, 表明乙酰基对蜗牛酶降解甲壳素起着重要作用。对蜗牛酶浓度和底物浓度对降解反应速率影响的研究表明该酶反应遵照 Michaelis-Menten 动力学。

关键词: 蜗牛酶; 降解; 甲壳素; 初始降解速率

中图分类号: S985.2 . **文献标识码:** A

The kinetics of degradation of partially N-acetylated chitin by snail nut enzyme

YUAN Hang, ZHOU Pei-gen

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

Abstract: Water-soluble chitins with degrees of deacetylation ranging from 60% to 98% were degraded with snail nut enzyme. Initial degradation rate (r) was determined from plots of the viscosity decrease ($\Delta 1/[\eta]$) against time of degradation. The time courses of degradation of chitins with snail nut enzyme were non-linear, while the time courses of degradation of chitins with concentrated hydrochloric acid were linear. The initial degradation rates of chitin with snail nut enzyme increased evidently with increasing content in acetylated units, indicating that acetyl plays an important role in the degradation of chitin. The results from the effects of enzyme concentrations and substrate concentrations on the initial degradation rates showed that this snail nut enzyme-chitin system obeys Michaelis-Menten kinetics.

Key words: chitin; snail nut enzyme; degradation; initial degradation rate

降解甲壳素和壳聚糖的酶可分为专一性水解酶和非专一性水解酶两大类。专一性水解酶主要有甲壳素酶、壳聚糖酶、溶菌酶、和 N-乙酰葡糖胺酶等, 非专一性水解酶主要有蛋白酶、脂肪酶等 37 种酶^[1]。以水溶性甲壳素为底物研究溶菌酶动力学, 结果表明溶菌酶和甲壳素反应体系遵循 Michaelis-Menten 动力学^[2]。综合有关各类非专一水解酶降解甲壳素的报道, 表明这一类酶大都不遵循 Michaelis-Menten 动力学, 无论提高底物浓度还是提高酶浓度, 都可能提高反应速率^[3-5]。如此多的酶都能对甲壳素有降解作用, 然而各类酶似乎并不存在共同的催化基团, 它们的降解作用机制至今仍没有确定。一些学者对之也提出了假设, 日本的学者提出了糖脂模型, 推测起作用机制, 认为底物分子链上的羟基对酶解起重要作用^[6]。已有学者报道了从蜗牛内脏中提出的混合酶对甲壳素有较高的降解作用^[7,8], 本实验以部分

收稿日期: 2001-05-10

第一作者: 袁 航 (1976 -), 男, 河南新乡人, 上海水产大学 2001 届硕士研究生, 专业方向为水生生物资源的利用。

脱乙酰化的水溶性甲壳素为底物,初步研究了蜗牛酶酶解动力学,并与浓盐酸降解甲壳素反应作了比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用甲壳素购自上海鱼品厂,经脱乙酰化反应,得到脱乙酰度 60%~98% 的甲壳素。将部分脱乙酰化甲壳素溶于 0.2M, pH4.2 的醋酸缓冲液,经过滤后滤液作为酶作用底物。蜗牛酶购自漳州叶氏公司。

1.2 方法

甲壳素脱乙酰基采用高温浓碱法(47% NaOH, 90℃, 搅拌反应),控制反应时间得到不同脱乙酰度的甲壳素^[9]。脱乙酰度(DD)的测定采用电位滴定法^[10]。降解液粘度的测定使用乌氏粘度计,所测的相对粘度为某一小段时间的平均相对粘度。所有酶降解反应均是在 35℃、pH 4.2 的条件下进行,浓盐酸降解反应条件是 35℃、 $C_{HCl} = 10M$ ^[11]。

2 结果与讨论

2.1 浓盐酸降解不同脱乙酰度甲壳素进程曲线

将不同脱乙酰度的甲壳素浓盐酸条件下降解,盐酸浓度为 10M,温度为 35℃。结果表明,低脱乙酰度甲壳素降解速率明显高于高脱乙酰度的甲壳素。当脱乙酰度大于 80% 时,基本不发生降解反应。而在脱乙酰度为 63%、66%、73% 的三个样品中,66% 的甲壳素反应速率最快(见图 1)。由此可见,乙酰基的存在影响着甲壳素的降解。同时,由图中我们可以看到,降解速率随时间的变化曲线呈现出较好的线性,因此可推断盐酸降解反应是随机地断裂糖苷键。

2.2 不同脱乙酰度甲壳素酶法降解曲线

在蜗牛酶浓度 0.042mg/mL,甲壳素浓度 0.2g/L,温度为 35℃ 的条件下,蜗牛酶对一系列不同脱乙酰度的甲壳素进行降解,作 $\Delta L/(\eta_{sp}/c)$ 随时间的变化曲线,如图 2 所示。由图可看出:脱乙酰度越低,反应速率越高,由此推测乙酰基的存在可能与酶作用的位点有关。同时,反应速率曲线的曲度说明了降解反应不是随机地降解,而是存在一定的作用位点。其它文章曾报道溶菌酶和纤维素酶降解甲壳素反应均为非随机降解,本实验结果表明蜗牛酶降解甲壳素方式与溶菌酶和纤维素酶类似。

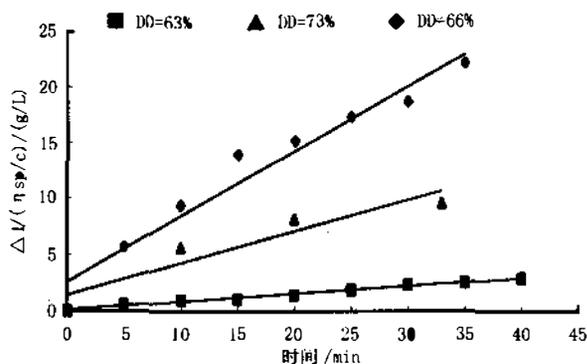


图 1 浓盐酸降解不同脱乙酰度甲壳素时间曲线

Fig.1 Time course of degradation of chitins with different degrees of deacetylation by concentrated hydrochloric acid

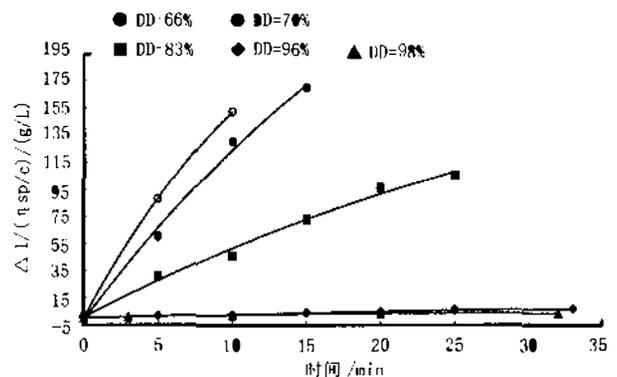


图 2 蜗牛酶降解不同脱乙酰度甲壳素时间曲线

Fig.2 Time course of degradation of chitins with different degrees of deacetylation by snail nut enzyme

2.3 蜗牛酶降解甲壳素动力学分析

实验研究了蜗牛酶浓度和底物浓度对酶反应的影响,结果见图3、图4。

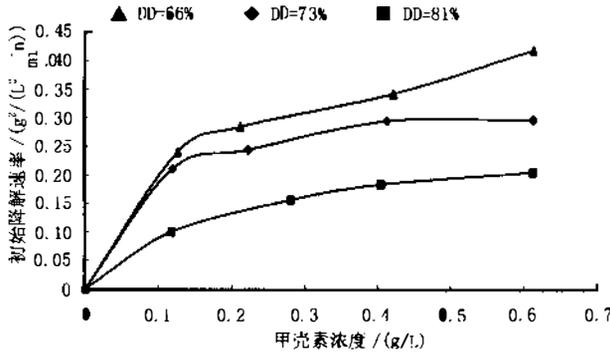


图3 三种不同脱乙酰度甲壳素酶初始降解速率随甲壳素浓度变化曲线

Fig.3 Initial degradation rates of snail nut enzyme on three chemically different chitins as a function of chitin concentration

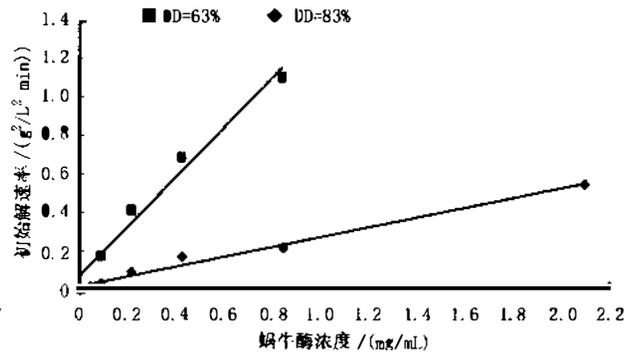


图4 两种不同脱乙酰度甲壳素酶初始降解速率随蜗牛酶浓度变化曲线

Fig.4 Initial degradation rates of snail nut enzyme on two chemically different chitins as a function of snail nut enzyme concentration

图3中说明了甲壳素浓度对蜗牛酶降解速率的影响,实验中蜗牛酶浓度为0.42mg/mL,温度为35℃。对于图中的三个样品(脱乙酰度为66%、73%、81%),当浓度达到0.15g/L~0.2g/L时,反应速率增加幅度均大大减小。当甲壳素浓度继续增加时,酶降解速率只是随之略微增加。这说明该酶降解反应的饱和底物浓度在0.18g/L附近。

图4显示了蜗牛酶浓度对降解速率的影响实验中甲壳素浓度为0.2g/L,温度为35℃。由图可知,降解初始速率随着蜗牛酶浓度的增加成正比增加。

由以上实验结果可以得出结论:以部分乙酰化水溶性甲壳素为底物的蜗牛酶降解反应是遵循Michaelis-Menten动力学的。

表1中列出了不同脱乙酰度甲壳素的脱乙酰度和酶降解初始速率,相对降解速率按DD=98%的甲壳素降解速率为1计算,蜗牛酶浓度为0.42mg/mL,甲壳素的浓度为0.2g/L,温度为35℃。由表中的数据可以明显地看出酶降解初始速率与甲壳素脱乙酰度之间有着非常紧密的关系。随着脱乙酰度的降低,降解初始速率成倍的增长。实验中DD等于66%的底物反应速率为

DD等于98%的底物反应速率的70倍。因此,可推断乙酰基可能与酶反应特定作用位点有关。

表1 不同脱乙酰度甲壳素初始降解速率和相对降解速率的比较

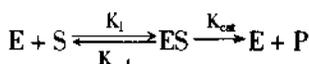
Tab.1 Comparison between initial degradation rates and relative degradation rates of chitins with increasing degree of deacetylation

DD (%)	初始降解速率 (g²/L²·min)	相对降解速率
98	0.060	1
83	1.21	21
70	2.69	45
66	4.24	71

3 酶降解反应 Michaelis-Menten 方程分析

为了更好地理解蜗牛酶降解不同脱乙酰度甲壳素的机理,我们根据实验数据和结果推导了酶降解反应 Michaelis-Menten 方程:

假设酶与产物的逆向反应是可忽略的,则有:



因此,初始降解速率为:

$$r' = k_{cat} \cdot [ES] \quad (1)$$

假设速度常数 k_{cat} 远小于 k_1 和 k_{-1} , 则解离常数为:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \text{ 或 } [ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad (2)$$

我们假设蜗牛酶的活性部位结合甲壳素的 k 个单体。由于已知在部分乙酰化甲壳素的聚合链上, 乙酰化单位(A)和脱乙酰化单位(D)是随机分布的, 因此蜗牛酶可能结合的不同结构总数为: $N = 2^k$, 即从全部脱乙酰化单体 $D-D \cdots D-D$ (k 个) 到全部乙酰化单体 $A-A \cdots A-A$ (k 个)。对于结合并降解 N 种不同底物, 相应地存在 N 种不同的 K_i 和 $k_{cat(i)}$ 。方程(2)变为:

$$[ES] = \sum_{i=1}^N [ES]_i = \sum_{i=1}^N \frac{[E][S]_i}{K_i} \quad (3)$$

将公式3代入1得到:

$$r' = \sum_{i=1}^N (K_{cat(i)} \frac{[E][S]_i}{K_i}) \quad (4)$$

由图3可以看到, 不同脱乙酰度甲壳素的饱和底物浓度相差不大, 均在 $0.18g/L$ 附近, 因此可推断 N 种不同底物的 K_i 值相近。否则, 如果 k_i 相差很大的话, 脱乙酰度高的甲壳素的饱和底物浓度应比脱乙酰度低的甲壳素的饱和底物浓度高出很多。令 $K_1 = K_2 = K_3 \cdots K_N = K_s$, 则方程5简化为:

$$r' = \frac{[E]}{K_s} \sum_{i=1}^N ([S]_i \cdot K_{cat(i)}) \quad (5)$$

总酶浓度 $[E]_t = [E] + [ES]$, 结合2式, 可以得到方程6:

$$r' = \frac{[E]_t \sum_{i=1}^N ([S]_i \cdot K_{cat(i)})}{\sum_{i=1}^N [S]_i + K_s} \quad (6)$$

设每种结合结构的百分比为 F_i , 则 $[S]_i = F_i \cdot [S]$ 代入上式可得:

$$r' = \frac{[E]_t [S] \sum_{i=1}^N (F_i \cdot K_{cat(i)})}{[S] + K_s} \quad (7)$$

由该方程我们可以看出各因素对酶降解反应速率的影响。如果保持总酶浓度和底物浓度不变, 则每种可能的底物分子结构所占的百分比就起到了决定性的作用, 因为对于每种结构, 酶解的反应常数是一定的。这就解释了为什么乙酰基的存在多少对反应速率的影响如此的重大。

4 实验理论基础

根据 Mark-Houwink-Sakurada (MHS) 方程, 可用粘度的降低来表示糖苷键的断裂, 从而计算出酶反应的反应初速度。对于一级反应, 降解反应速率(r')可表示为:

$$r' = \frac{d[S]}{dt} = [S]_0 \cdot \frac{d\alpha}{dt} \quad (8)$$

其中 $[S]_0$ 和 $[S]$ 分别是反应开始和反应时间为 t 时的糖苷键浓度, α 表示糖苷键断裂程度 ($\alpha = 0$ 表示分子量为无穷大, $\alpha = 1$ 表示分子量等于单体的分子量)。

如果用 DP_{i0} 和 DP_{it} 来代表反应开始(时间 0)和某个时间(时间 t) 的平均聚合度, 则对于随机降解一级反应, 成立下式:

$$\Delta \alpha = \frac{1}{DP_{it}} - \frac{1}{DP_{i0}} = k^1 \cdot \Delta t \quad (9)$$

由 MHS 方程可得到下式:

$$[\eta] = K \cdot M_n^a \quad (10)$$

其中 M_n 为平均分子量, K 为常数。

如果假设幂指数 a 和单体分子量 M_0 ($M_n = M_0 \cdot DP_n$) 不随脱乙酰化程度而变化, 由以上三式可得到:

$$K' = \frac{\Delta a}{\Delta t} = \left(\frac{1}{[\eta]_t} - \frac{1}{[\eta]_0} \right) \cdot K \cdot M_0 / \Delta t = \frac{1}{[\eta]} \cdot K \cdot M_0 / \Delta t \quad (11)$$

对于低浓度甲壳素溶液, 我们可以认为比浓粘度近似等于特性粘度 ($\eta_{sp}/c \approx [\eta]$)。由于实验中是在反应初始阶段测量初降解速率, da/dt 近似等于 $\Delta a/t$ 。于是得到下式:

$$r' = k' \cdot [S]_0 \quad (12)$$

实验中我们用 $\Delta 1/(\eta_{sp}/c)$ 对时间作曲线, 求其斜率得到 k 值, k 和 k' 之间可由 $k \approx k'/(K \cdot M_0)$ 相互转换。

参考文献:

- [1] 夏文水, 吴森楠. 甲壳素/壳聚糖水解脱酶的研究进展[J]. 中国海洋药物, 1997, 62: 31-35.
- [2] Ragnhild J Nordtveit, Kjell M Varum, Smidsrud O. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated Chitosans with lysozyme[J]. Carbohydr Polym, 1994, 23: 253-260.
- [3] Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis[J]. Carbohydr Res, 1992, 237: 319-326.
- [4] Muzzarelli R A A, Tomascini M, Ilari P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain[J]. Enzyme Microbial Techn, 1994, 256: 159-165.
- [5] Xia Wenshui, Muzzarelli R A A. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of lipase[A]. Proceedings of the Second Int. Conference on Food Science and Technology[C]. Wuxi: Press of Wuxi University of Light Industry, 1994. 147-157.
- [6] Yalpani M, Pantaleone D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J]. Carbohydr Res, 1994, 256: 159-167.
- [7] Muraki E, Yaku F, Kujima H. Preparation and Crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8[J]. Carbohydr Res, 1993, 2: 219-227.
- [8] 曾宪放, 陈苏陵, 李吉高. 甲壳质和甲壳胺寡聚糖的制备[J]. 中国海洋药物, 1995, 55: 46-51.
- [9] 叶菊招, 冯冰凌, 郎雪梅. 壳聚糖的制备、成膜及其影响因素的研究[J]. 高分子材料科学与工程, 1997, 13: 139-143.
- [10] 林瑞洵, 蒋苏洪, 张慕珊. 脱乙酰度的测定方法[J]. 化学通报, 1992, 3: 39-42.
- [11] Rupley J A. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme[J]. Bioch Bioph Acta, 1964, 83: 245-255.

欢迎订阅 2002 年《生态学报》

《生态学报》是中国生态学会主办的综合性学术刊物, 创刊于 1981 年。主要报道生态学各领域(如: 动物生态、植物生态、微生物生态、农业生态、森林生态、草地生态、土壤生态、海洋生态、淡水生态、景观生态、区域生态、化学生态、污染生态、经济生态、系统生态、城市生态、人类生态等众多学科)的学术论文; 特别欢迎能反映现代生态学发展方向的综述性文章; 创造性研究报告和研究简报; 生态学新理论、新方法、新技术介绍; 生态学重要书刊评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。为促进学术、科研信息的交流, 欢迎踊跃投稿。

《生态学报》多年来受到广大读者的欢迎和赞誉。为进一步适应生态学学科发展和学术交流的需要, 本刊自 2001 年起由双月刊改为月刊, 以加快出版周期, 使《生态学报》更好地为国内外从事生态学研究的科技工作者、广大干部及高等院校师生服务。

《生态学报》为月刊, 每期 128 页, 信息容量约 27 万字。期定价 20.00 元, 年定价 240.00 元。国内统一刊号: CN11-2031/Q; 国际标准刊号: ISSN 1000-0933; 国外发行代号: M670; 国内邮发代号: 82-7。全国各地邮局均可订阅。

《生态学报》编辑部地址: 北京海淀区双清路 18 号 邮政编码: 100085

电话: (010)62941099 E-mail: Shengtaixuebao@sina.com.