第 12 卷第 2 期　　上 海 水 产 大 学 学 报　　Vol.12，No.2
2003 年 06 月　　JOURNAL OF SHANGHAI FISHERIES UNIVERSITY　　June，2003

文章编号：1004－7271(2003)02－0152－06

大豆种子几丁质酶的诱导及对壳聚糖降解的研究

赵光远，陈海华

（江南大学食品学院，江苏 无锡　214036）

摘　要 大豆种子经甲壳低聚糖处理后发芽，其体内的几丁质酶活力比发芽前提高了 46 倍，比发芽的大豆提高了 1.3 倍。大豆种子经甲壳低聚糖处理后发芽的提取物作用于 DD 值为 71.1% 的壳聚糖 15min，可使其乙酸盐溶液的 VDP 值达 60% 以上。初步纯化的大豆几丁质酶可降解壳聚糖释放还原糖且较适合降解 DD 值低的壳聚糖，其作用于 DD 值 71.1% 的壳聚糖 37.5h 可得到平均聚合度为 4-5 的水溶性甲壳低聚糖，得率为 40% 左右。

关键词 大豆种子；几丁质酶；发芽；壳聚糖

中图分类号：TS201.2　　**文献标识码**：A

Study on the induction of soybean chitinase and the application of chitinase to the depolymerization of chitosan

ZHAO Guang-yuan，CHEN Hai-hua

（*College of Food Science*，*Southern Yangtze University*，*Wuxi*　214036，*China*）

Abstract：The activity of chitinase in soybean increased by 46 times after being germinated which had been treated by chitooligosaccharide than before being germinated，and increased by 1.3 times than germinated which was untreated by chitooligosaccharide. After the abstraction of germinated soybean which treated by chitooligosaccharide acted with chitosan of DD 71.1% for 15 minutes，it can raise the VDP of acetate salt solution to more than 60%. Soybean of primary purification can free reduced sugar and is easier to degrade chitosan whose DD is lower，and when it acted on chitosan of DD 71.1% for 37.5 hours，it produced water-soluble chitosin whose average DP is 4-5，and its yield is about 40%.

Key words：soybean；chitinase；germinate；chitosan

甲壳低聚糖克服了甲壳素和壳聚糖不溶于水的缺点，易吸收，有抗菌、抗肿瘤和提高植物防御能力等功能。近年来，与用不同脱乙酰度(degree of deacetylation DD)的壳聚糖为底物经酶降解制备甲壳低聚糖相关的研究如酶的选育、酶对壳聚糖降解的进程和产物物化参数、酶降解反应器系统已成为热点，涉及的酶有微生物来源的壳聚糖酶[1]、微生物来源的几丁质酶[2]、麦芽脂酶[3]、溶菌酶[4]、木瓜蛋白酶[5]、纤维素酶和半纤维素酶[6]等。植物几丁质酶(chitinase)(EC3.2.1.14)广泛存在于高等植物中，分布于植物的茎叶种子和愈伤组织中，并可诱导产生，已从多种植物中提取出来并加以研究。几丁质酶分为内切

收稿日期：2002-11-05

作者简介：赵光远，(1973－)，男，河南泌阳人，在读博士生，研究方向为食品生物技术。E-mail：guangyuan-zhao@163.com

酶和外切酶，已研究的多为几丁质内切酶且研究集中于其在植物受到病原菌及害虫侵袭时所起的防御作用。由于几丁质的不溶性，研究者多用改性几丁质、胶态几丁质（用浓酸处理得到）等作为酶的底物酶解反应进程研究。研究表明，植物几丁质酶可切开以上底物中的 GlcNAc－GlcNAc[7]。1984 年 Scott A.W 等[8]从未发芽的大豆中提取纯化出了内切几丁质酶，它可能存在同功酶。其平均分子量为 31600，最适 pH 范围为 3.3～4.0。Colantuoni.D 等[9]从发芽的大豆中提取纯化出了几丁质酶。但他们都未研究几丁质酶对壳聚糖的降解。

1　材料与方法

1.1　主要试验材料

1.1.1　壳聚糖 A、B

购自浙江玉环生化有限公司，脱乙酰度（DD）分别为 71.1%和 85.2%。将低脱乙酰度壳聚糖 A 在 85℃～90℃用氢氧化钠处理 5h，静置过夜，再处理 4h，制得壳聚糖 C（DD＝88.5%）。壳聚糖的纯化按文献[10]：壳聚糖用稀乙酸（2%V/V）配成 1.5～2.0%的溶液，过滤，加入 1mol/L 氢氧化钠调 pH 7.5，放置 3h，洗至中性，用异丙醇洗两次，减压干燥。甲壳低聚糖按文献[11]自己制备：8g 纯化的壳聚糖 A 加 100mL 5%的双氧水，90℃反应 30min，再用 10%氢氧化钠调至中性，过滤，滤液加 3 倍乙醇，过夜，离心，用乙醇洗，减压干燥，制得甲壳低聚糖。

1.1.2　大豆（*Glycine hispida* Max）

购自无锡青山农贸市场

1.2　试验方法

1.2.1　几丁质酶的诱导

大豆用 3%次氯酸钠表面消毒，然后分以下四组处理

第一组：大豆 90g 浸泡 2h，不发芽。

第二组：大豆 90g 浸泡 10h，25℃发芽 3d。

第三组：大豆 90g 浸泡 10h，用制备的甲壳低聚糖的水溶液（1%W/V）50ml 处理 5min，25℃发芽 3～6d。

第四组：大豆 90g 浸泡 10h，用不同脱乙酰度的壳聚糖溶解于稀乙酸（1%V/V）或溶解于不同 pH 值的乙酸钠缓冲液而得到的 50mL 溶液（1%W/V）处理 5min，在 25℃发芽 3d。

1.2.2　粗酶液的制备

1.2.1 中的大豆加 300mL 水和 400mL 的 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液（pH 4.6），组织捣碎机匀浆，7200r/min离心 20min，上清液即为粗酶液。

1.2.3　几丁质酶的初步纯化

粗酶液 100mL，加 39g 硫酸铵（60%饱和度），搅拌 1h，7200r/min 离心 20min，上清液对蒸馏水 4℃透析 2d，定容至 50mL，作为液态初步纯化几丁质酶。

1.2.4　几丁质酶酶活测定

壳聚糖 A 溶于稀乙酸（1%V/V）配成 1%（W/V）的壳聚糖溶液，用 5%碳酸氢钠溶液调 pH 值为3.8，以此壳聚糖溶液为底物[12]。取 0.9mL 壳聚糖 A 溶液加 0.1mL 待测酶液，同时以 0.9mL 壳聚糖 A 溶液加0.1mL灭活酶液为对照，37℃反应 60min，按文献[13]用 DNS 法测还原糖。定义 1h 产生 1μmol 的还原糖（以 N-乙酰胺基葡萄糖计）所需酶量为一个单位 U。

1.2.5　大豆几丁质酶对壳聚糖降解能力的表征

测还原糖产生量　壳聚糖的稀乙酸溶液加一定量的酶液，反应后用 DNS 法（以 N－乙酰胺基葡萄糖为标样）测反应液中还原糖含量。

壳聚糖溶液粘度降低表征　壳聚糖 A 分别溶于稀乙酸（1%V/V）和乙酸钠缓冲液配成 1%（W/V）

的溶液。分别取上述壳聚糖 A 溶液 60mL 加入旋转粘度计(同济大学机械仪器厂)中 27℃恒温后,加预先 27℃恒温的 3mL 酶液,立即计时,27℃反应 15min,用旋转粘度计测反应物各时间段粘度。对照以水代替酶,其余条件相同。

粘度降低百分比(VDP) = (对照粘度 – 反应物反应 15min 粘度/对照粘度) × 100%

壳聚糖 C 溶于的稀乙酸(1% V/V)中配成 1%(W/V)的溶液(用碳酸氢钠调 pH 4.5),取 9.5mL 上述溶液加入奥氏粘度计中 37℃恒温 10min,加 0.5mL 预先恒温至 37℃的酶液,快速测定开始及每隔 5min 时间段的流过时间(s)。以 0.5mL 水代替纯化的提取物,同样条件按文献[14]测其开始及每隔 5min 时间段的流过时间。

粘度降低百分比(VDP) = (对照流过时间 – 反应物反应 30min 流过时间/对照流过时间) × 100%

1.2.6 水可溶性甲壳低聚糖得率和平均聚和度的测定

大豆几丁质酶作用于壳聚糖后的酶解液加热使酶失活,测其体积,计为 T mL。取 1mL 用 6mol/L 盐酸完全水解后用 DNS 法测还原糖(以胺基葡萄糖为标样),计为 C(μmol/mL)。

用 5% 氢氧化钠溶液调酶解液 pH 值 8.5,用滤纸过滤(目的在于去除热变性的酶和没被水解的壳聚糖),滤液即为水可溶性甲壳低聚糖,测其体积,计为 t mL,其平均聚和度用端基分析法测定:取 1mL 滤液测其还原糖含量,计为 A_2(μmol /mL)(DNS 法测,以 N-乙酰胺基葡萄糖为标样);另取 1mL 滤液完全水解后 DNS 法测还原糖量(用胺基葡萄糖为标样),计为 A_1(μmol /mL),则透过液中甲壳低聚糖平均聚合度(DP)为[15]

$$DP = A_1/A_2 \quad (1)$$

$$\text{甲壳低聚糖得率} = A_1 \times t/C \times T \quad (2)$$

1.2.7 制备甲壳低聚糖

5g 壳聚糖 A 溶于 450mL 的 1%(V/V)乙酸中(用碳酸氢钠调 pH 4.0),加初步纯化酶 43mL,共反应 37.5h。

反应结束,共 500mL,按 1.2.6 中方法测定水可溶性甲壳低聚糖得率和平均聚合度。

2 结果与讨论

2.1 大豆几丁质酶的诱导

2.1.1 不同诱导方法对大豆种子提取物中几丁质酶活力的影响

大豆经发芽、甲壳低聚糖和壳聚糖处理后发芽,其提取物中几丁质酶活力见表 1。

表 1 不同状态大豆的提取物中几丁质酶活力

Tab.1 Chitinase activity in the extraction of soybean treated in different conditions

处理方法	酶活(U/mL)[a]	提取物[b] 总酶活 U
第一组(不处理)	0.36	230
第二组(发芽[c])	7.1	4544
第三组(甲壳低聚糖处理后发芽)	16.8	10752
第四组(壳聚糖 A[d] 处理后发芽)	7.9	5056

a:定义每小时产生 1μmol 的还原糖(以 N – 乙酰胺基葡萄糖计)所需酶量为一个单位 U;b:提取物总体积为 640mL;c:发芽时间为 3d;d:壳聚糖 A 溶液浓度(见实验部分),pH 为 4.2。

大豆不发芽,体内生理活动不旺盛,几丁质酶活力最低。大豆经甲壳低聚糖处理后发芽,几丁质酶活力最高,是不发芽大豆的 47 倍,比发芽大豆也提高了 1.3 倍。其次是大豆经壳聚糖 A 处理后发芽,其几丁质酶活力为不发芽大豆的 22 倍,但只比发芽大豆提高了 0.1 倍。大豆发芽 3d 后,几丁质酶活力是不发芽大豆的 20 倍。三种条件下提取物中几丁质酶对壳聚糖乙酸盐溶液粘度降低百分比(VDP)分别为 64.5%、56.3%、55.6%(结果未列出)。可见酶活力大小与之对壳聚糖乙酸盐溶液粘度降低百分比

(VDP)相一致。则诱导强弱顺序为 :甲壳低聚糖处理后发芽 > 壳聚糖 A 处理后发芽 > 未经处理而发芽，但后二者的差别不显著。

2.1.2　诱导时间对大豆种子提取物中几丁质酶活力的影响

大豆种子经甲壳低聚糖处理后发芽，提取物中几丁质酶活力变化及其对壳聚糖乙酸盐溶液(pH 3.9)粘度降低百分比(VDP)见图 1、图 2。

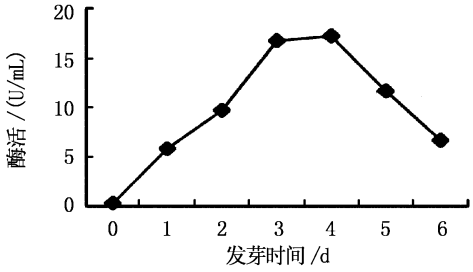

图 1　大豆提取物中几丁质酶活力随发芽时间的变化

Fig.1　The effect of germinating time on chitinase activity of soybeans

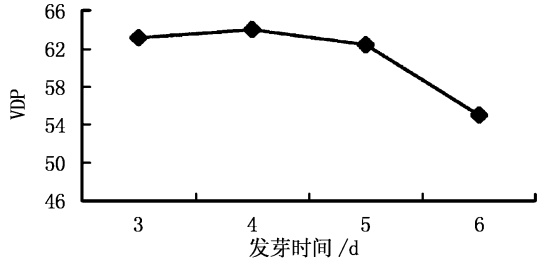

图 2　大豆发芽时间(天)与其提取物酶降低壳聚糖醋酸盐溶液粘度

Fig.2　The effect of germinating time on VDP of chitosan soultion made by soybean chitinase

大豆经甲壳低聚糖处理后发芽第 4 天几丁质酶活力达最高值 17.2U/mL(图 1)，其提取物对壳聚糖乙酸盐溶液作用的 VDP 也达最高值 64.1%(图 2)，发芽超过 4d，酶活及酶提取物对壳聚糖乙酸盐溶液作用的 VDP 都降低，大豆开始腐烂，所以诱导以 3 ~ 4d 为宜。另外，发芽温度高于 30℃豆子也易腐烂。

2.1.3　壳聚糖脱乙酰度对诱导效果的影响

壳聚糖 A、B 和 C(脱乙酰度 DD 分别为 71.1%、85.2%和 88.5%)按实验 1.2.1 部分对大豆处理，诱导后的大豆的提取物对壳聚糖乙酸盐溶液作用的 VDP 以壳聚糖 A 的最高，为 62.8%，以壳聚糖 C 的最低，为 61.4%(表 2)。大豆的提取物对壳聚糖乙酸盐溶液作用的 VDP 可反映大豆中几丁质内切酶活力的高低，由此知如用壳聚糖对大豆中几丁质内切酶诱导，应选择脱乙酰度(DD)低的壳聚糖。

表 2　壳聚糖脱乙酰度(DD)对诱导效果的影响

Tab.2　The effect of DD of chtosan used as inducer on the activity of induced chitinase

诱导物		对壳聚糖乙酸盐溶液
壳聚糖	脱乙酰度 DD(%)	作用的 VDP
壳聚糖 A	71.1	62.8
壳聚糖 B	85.2	61.9
壳聚糖 C	88.5	61.4

注：壳聚糖醋酸盐溶液的 pH 为 3.8 ~ 4.0

2.1.4　pH 值对诱导效果的影响

壳聚糖 A 分别溶解于 pH 值为 4.0、5.0、6.0 和 7.0(用水代替缓冲液) 的缓冲液制成 1%(W/V)的诱导液，各用 50mL 此溶液处理大豆 5min，大豆在 25℃发芽 3d，诱导后的大豆制得的几丁质粗酶液 3mL 对 60mL 壳聚糖 A 的乙酸盐溶液作用的 VDP(用旋转粘度计测得)以诱导液 pH 为 5.0 和 6.0 的较高(分别为 64.2%和 64.0%)，而 7.0 最低(55.6 %)(图 3)。pH 值过低，不利于大豆发芽，体内生理活动受抑制，几丁质内切酶合成量低。当 pH 为 7.0 时壳聚糖不溶于水，故诱导效果较差。

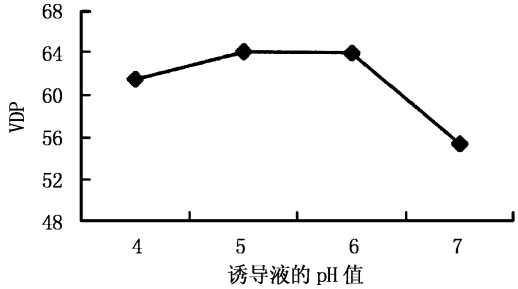

图 3　壳聚糖诱导液的 pH 值对诱导效果的影响

Fig.3　The effect of pH chtosan on the activity of chitinase induced

2.2 初步纯化的几丁质酶对壳聚糖的降解作用

2.2.1 pH 值对初步纯化几丁质酶活力的影响

由表 3 结果知初步纯化几丁质酶在 pH 4.0 的活力大于在 pH 4.5 的。

表 3 pH 值对初步纯化几丁质酶活力的影响

Tab.3 The effect of pH value on the activity of chitinase primarily purified

初步纯化几丁质酶来源	酶活 U/mL	
	pH 4.0	pH 4.5
未处理直接发芽的大豆	0.54	0.24
甲壳低聚糖诱导的大豆	0.86	0.54
壳聚糖诱导的大豆	0.72	0.22

注 酶活测定底物为脱乙酰度 88.5% 的壳聚糖 C,其余条件同实验部分

2.2.2 初步纯化几丁质酶降低壳聚糖乙酸盐溶液粘度

对壳聚糖降解能力强的初步纯化几丁质酶来自经过诱导的大豆,由未发芽大豆制备的几丁质粗酶与经过诱导的大豆制备的几丁质粗酶对壳聚糖 C 乙酸盐溶液的 VDP 相差 1.6 倍(见表 4)。

表 4 初步纯化几丁质酶对壳聚糖醋酸盐溶液的 VDP

Tab.4 The effect of chitinase activity on the VDP of chitosan acetate solution

初步纯化几丁质酶来源	壳聚糖醋酸盐溶液粘度(流动时间表征)降低百分率 VDP
未发芽大豆	16.0%
未处理直接发芽的大豆	25.0%
甲壳低聚糖诱导的大豆	25.6%
壳聚糖诱导的大豆	24.9%

注 测试条件见 1.2.5

图 4 中曲线 A 是壳聚糖 C 乙酸盐溶液在几丁质初步纯化酶(来自甲壳低聚糖诱导的大豆)作用下其粘度(用在奥氏粘度计中的流动时间表示)随时间变化的过程曲线,曲线 B 为对照。由曲线 A 的形状知壳聚糖乙酸盐溶液的粘度随时间延长而降低,壳聚糖分子量逐渐变小。反应的初始的 20min 内壳聚糖乙酸盐溶液粘度急剧下降,而 25min 后趋缓,这符合酶促反应动力学规律。

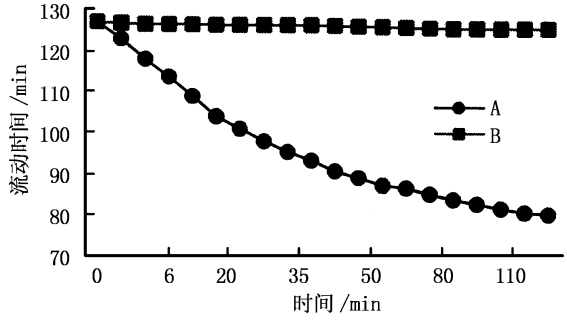

图 4 壳聚糖醋酸盐溶液粘度随时间变化的曲线

Fig.4 The effect of reaction time on the viscostiy of chitosan acetate solution

2.2.3 初步纯化几丁质酶降解壳聚糖产生还原糖

图 5 是还原糖产生量同酶促反应时间关系图,所用酶同图 4。由图知随反应时间延长,还原糖产生量增加。但壳聚糖底物 DD 值小的 A 在相同反应时间内还原糖产生量要比 DD 值大的 C 要高,即聚糖底物脱乙酰度越小,酶解反应产生的还原糖越多,当酶作用于 DD 值为 95% 的壳聚糖时,酶解反应产生的还原糖比 DD 值为 88.5% 的 C 更少(结果未列出)。所以大豆几丁质适合降解脱乙酰度 DD 小的壳聚糖,要求被切的糖苷键一侧或两侧为 GlcNAc。壳聚糖脱乙酰度 DD 越小,酶切位点越多,产物平均聚合度越小 壳聚糖脱乙酰度 DD 越大,酶切位点越少,产物平均聚合度越大。

2.2.4 甲壳低聚糖的制备

5g 壳聚糖 A 溶于 450mL 1%(V/V)乙酸中(用碳酸氢钠调 pH 4.0),加初步纯化酶 43mL,共反应

37.5h，得到的甲壳低聚糖平均聚合度 DP 为4.78 – 5.29，得率：41.7% 。

3　讨论

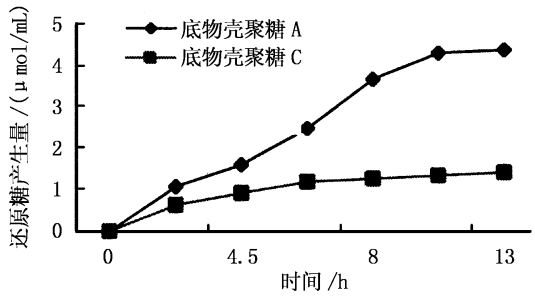

图 5　还原糖产生量同酶促反应时间的关系

Fig.5　The effect of reaction on the production of reducing sugar

经诱导的大豆的几丁质酶酶活(基于测还原糖产生量)是未经诱导的大豆的 46 倍，而其对壳聚糖乙酸盐溶液的 VDP 不足未经诱导的大豆的几丁质酶的 2 倍，由此推测大豆经诱导产生内切几丁质酶的同时，其他属于几丁质酶系的酶如 N – 乙酰胺基葡萄糖酶(Acetyiglucosaminidase)、胺基葡萄糖酶(glucosaminidase)[16]和几丁二糖酶(chitobiase)[8]也被诱导产生，这些酶可从壳聚糖的一端 1 次切 1 ~ 2 个残基下来，这样，在有限的时间里壳聚糖的聚合度不会显著降低，宏观表现即为粘度不会急剧降低，而有还原力的组分却大量产生从而被测为高的酶活力。为确认这些酶存在与否，可用它们的专一性底物来测酶活。

为探明几丁质的具体作用方式，可进一步分离纯化其酶解产物，然后分析其糖残基的组成、在产物分子中的排列顺序及产物分子的构型和构象。

参考文献：

[1] Jeon Y J, Kim S K. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41: 133 – 141.

[2] Aiba S I. Preparation of N-acethylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation[J]. Carbohydrate Research, 1994, 265: 323 – 328.

[3] 夏文水, Riccardo A A. 脂肪酶解聚壳聚糖及其衍生物的研究[J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(1): 1 – 5.

[4] Riccaedo Muzzarelli. Depolymerization of methyl pyrrolidinone chitosan by lysozyme[J]. Carbohydrate Polymers, 1992, 19: 29 – 34.

[5] Riccardo A. A. Muzzarelli. Depolymerization of chitosan with the aid of papain[J]. Enzyme MicrobTechnol, 1994, 16: 111 – 114.

[6] Einosuke M, Fumiko Y, Hiroyuki K. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6 – 8[J]. Carbohydrate Research, 1993, 239: 227 – 237.

[7] Quang K H, Cathy M H, Elaine B L, et al. Antifungal Proteins from Plants[J]. J Biological Chemistry, 1992, 267(10): 6635 – 6640.

[8] Scoot A W and John P Z. Chitinase from Soybean Seeds: Purification and Some Properties of the Enzyme System[J]. J Agric Food Chem, 1984, 32: 1284 – 1288.

[9] Colantuoni D, Popper L, Knorr D. Chitinase from germinated soybean[J]. Agro-Food Ind. Hi-Tech, 1992, 3(2): 24 – 29.

[10] 林瑞洵，蒋苏洪，张慕珊. 脱乙酰度测定方法[J]. 化学通报, 1992, 3: 39 – 42.

[11] 李邦良，高仕瑛，乔新惠，等. 甲壳低聚糖的制备及分析[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(6): 29 – 32.

[12] Ho-Geun Y, Ulrich Z, Dietrich K. Thermostable Chitosanase from Bacillus sp. Strain CK4: Its Purification, Characterization, and Reaction Patterns [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(4): 802 – 809.

[13] 张惟杰. 复合多糖研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 10 – 11.

[14] Akira O. Viscosimetric Assay for Chitinase[J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 426 – 430.

[15] 邬建敏. 光度法测定甲壳低聚糖的平均相对分子质量[J]. 化学世界, 2001, 6: 293 – 295.

[16] Powning R F, Irzykiewicz H. Stydies on the Chitinase System in Bean and Other Seeds[J]. Comp Biochem Physiol, 1965, 114: 127 – 138.