



- [设为首页](#)
- [加入收藏](#)
- [联系我们](#)
- [投稿须知](#)

2008年3月4日星期二

[网站首页](#)[同兴广告](#)[企业名录](#)[行业资讯](#)[技术文章](#)[网络刊物](#)[在线订购](#)[编读互动](#)

站内搜索:

类别:

全部类别



全部范围



搜索



点击下载读者调查表

会员登录

用户名:

密码:

验证码:

 589f

登陆

注册

相关文章

- 非淀粉多糖酶对蛋鸡玉米一杂...
- 饲用纤维素复合酶在舍饲牦牛...
- 非淀粉多糖类酶制剂在大麦饲...
- 稻谷专用酶制剂对肉鸭生长性...
- 酶制剂在水产动物饲料中的应...
- 葡萄糖氧化酶产生菌的快速筛...
- 非淀粉多糖酶制剂的研究进展...
- 脂肪酶的研究进展及其在饲料...
- 植酸酶磷当量的研究
- 饲用木聚糖酶生产菌株的筛选...

合作伙伴



多酶交替降解壳聚糖及其酶解产物分子量分布的研究

作者:李专 胡远亮 梁运祥

期号:2007年第10期

摘要 用纤维素酶和甘露聚糖酶对壳聚糖进行交替降解,对酶的降解产物用Sephadex G100凝胶色谱柱进行分离,分析水解产物的相对分子量分布。研究表明,先用纤维素酶水解24 h,再用甘露聚糖酶水解24 h,可将分子量为100万左右的壳聚糖部分完全降解,产物相对分子量主要分布在10 000 Da以下。

关键词 壳聚糖;甘露聚糖酶;纤维素酶;凝胶色谱
中图分类号 Q814.4

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,是迄今发现的唯一的天然碱性多糖,能溶于醋酸等有机酸,具有良好的生物相容性,且无毒,可生物降解。壳聚糖分子中有胺基和羟基,容易进行化学改性和修饰,因此在医药、纺织、饲料、食品、化工、生物、农业等众多领域具有重要的应用价值[1-3]。但是,由甲壳素脱乙酰化制得的壳聚糖分子量大,具有紧密的晶体结构,不溶于普通溶剂,只能在某些酸性介质中溶解,这使其应用受到了极大限制。此外,分子量对壳聚糖性质也有很大影响,不同分子量的壳聚糖性质差异很大,有时甚至表现出截然相反的特性,而壳聚糖的许多独特功能只有在分子量降低到一定程度才表现出来。降解壳聚糖的方法主要有物理、化学和酶降解法。酶降解法通常优于其它方法,这是由于酶法降解可特异性地、选择性地切断壳聚糖的 β -1,4糖苷键,降解过程和降解产物的分子量易于被控制,且条件温和。

目前,国内研究多用单一酶或是用混合酶直接降解壳聚糖,用多酶交替降解却不多见。本试验用甘露聚糖酶和纤维素酶交替降解壳聚糖,再用凝胶渗透色谱直接测定壳聚糖的相对分子量分布[4]。

1 材料与试剂

1.1 菌种

里氏木霉(Trichoderma reesei) FT04-18和短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus) FB04-25均由华中农业大学发酵工程研究室保藏。

1.2 仪器

752紫外光栅分光光度计(由上海精密科学仪器有限公司生产)、HH-4数显恒温水浴锅(由江苏金坛市荣华仪器制造有限公司生产)、旋转蒸发器(由上海亚荣生化仪器厂生产)、超声波破碎仪(由宁波海曙金达超声波设备有限公司生产)、乌氏粘度计(由成都科析仪器成套有限公司生产)。

1.3 试剂

粉状壳聚糖:脱乙酰 $\geq 90\%$,由国药集团生产。

壳聚糖胶体溶液:在3 g壳聚糖中加入75 ml的1%醋酸溶液,85 °C水浴中放置10 h至完全溶解,再用1%醋酸定溶至100 ml,4 °C冷藏。

葡聚糖分子量标样: Dextran T-10, Mw(分子量)=10 000; Dextran T-40, Mw=40 000; Dextran T-70, Mw=70 000;

Dextran T-500, Mw=500 000。分子量标样均由Pharmacia公司提供。

1.4 培养基

产纤维素酶固体培养基:稻草60 g、麸皮40 g、 KH_2PO_4 0.05 g、 CaCl_2 0.05 g、 MgSO_4 0.25 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g、NaCl 0.1 g、V水:V物料=1:2.2、吐温-80 1%,pH值自然。

产甘露聚糖酶一级种子培养基:胰蛋白胨10 g/l、酵母提取物5 g/l、NaCl 5 g/l,加入2%魔芋精粉,灭菌,pH值7.4。

产甘露聚糖酶二级种子培养基:胰蛋白胨10 g/l、酵母提取物5 g/l、NaCl 5 g/l,加入8%诱导物(诱导物制备:在13%魔芋溶液中加入2%的甘露聚糖粗酶液,46 °C水解1 h,用无水乙醇将其沉淀,干燥,pH值7.4)。



刚果红-麦芽汁-CMC培养基: 麦芽提取物30 ml、琼脂粉15 g、CMC-Na 5 g, 用蒸馏水定容至1 L, 121 °C、30 min灭菌, 趁热加入1 ml刚果红, pH值5.5。

2 试验方法

2.1 粘均分子量测定

壳聚糖分子量的测定方法有粘度法、蒸汽压渗透法、端基分析法和凝胶色谱法等。其中, 粘度法是测定高聚分子量的一种常用方法[5] (粘度法测定方法为: 将0.1 mol/l CH₃COONa+0.2 mol/l CH₃COOH缓冲液用乌氏粘度计, 于25 °C时测定降解之前壳聚糖胶体的分子量, 外推作图法计算粘均分子量M=106万Da)。

2.2 纤维素酶的发酵

通过用紫外线和Co60-γ射线对里氏木霉进行复合诱变,用CMC-刚果红作筛选培养基, 筛选出透明圈直径与菌落直径之比大的菌株, 接种到产酶培养基中作进一步复筛,选育出纤维素酶酶活较高的菌株,接种于固体培养基中,30 °C恒温培养,每24 h测一次纤维素酶酶活。培养4 d时所测得的酶活为993.829 8 U/g,此时酶活最高。纤维素酶酶活的测定方法参照NY/T912—2004。

2.3 甘露聚糖酶的发酵

将短小芽孢杆菌接入一级种子培养基, 37 °C、180 r/min条件下培养48 h,得到甘露聚糖酶的粗酶液。

将短小芽孢杆菌接入二级种子培养基, 34 °C、180 r/min条件下, 每12 h测一次甘露聚糖酶酶活[6, 7],48 h时所测定甘露聚糖酶活为456 U/ml,此时酶活最高。

2.4 用不同酶制剂降解壳聚糖的比较

分别采取不同的处理方式: ①在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入1 ml甘露聚糖酶水解48 h(I); ②在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入1 ml纤维素酶水解48 h(II); ③在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入0.5 ml甘露聚糖酶+0.5 ml纤维素酶水解48 h(III); ④在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中先加入0.5 ml甘露聚糖酶水解24 h, 再加入0.5 ml纤维素酶水解24 h(IV); ⑤在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中先加入0.5 ml纤维素酶水解24 h, 再加入0.5 ml甘露聚糖酶水解24 h(V)。酶解温度为50 °C。

将酶解后的产物用超声波处理, 作用条件为: 振幅39%、脉冲5 s、暂停5 s、作用10 min, 6 000 r/min下离心10 min, 取上清液, 经Sephadex G100柱分离。

2.5 Sephadex G100柱对酶解产物的分离

Sephadex G100柱(1×100 cm)的分离条件: 上样量为1 ml; 体积流量为75 ml/h、2.5 ml/管; 洗脱液为pH值4.6的醋酸-醋酸钠缓冲液; Sephadex G100柱相对分子量标定采用标准分子量葡聚糖Dextran-10、Dextran-40、Dextran-70、Dextran-500; 糖含量采用苯酚-硫酸法测定[8]。

3 结果与讨论

3.1 相对分子质量标准曲线

由于甘露聚糖酶和纤维素酶对壳聚糖都有降解作用, 试验中在相同条件下加入总量相等的酶液对同一壳聚糖体系进行反应, 对水解产物进行凝胶色谱柱分离, 洗脱液分步收集, 并检测洗脱液中的糖含量, 以比较各种条件对壳聚糖的降解程度。试验中选取Sephadex G100柱凝胶介质进行分离, 该介质的机械强度较好, 且可分离5 000~1 000 000分子量范围的多糖, 比较适合壳聚糖的分离要求。

标准分子量葡聚糖在Sephadex G100柱上的分离曲线见图1, 相对分子质量标准曲线见图2, 从图2中可以看出相对分子质量曲线的线性良好。

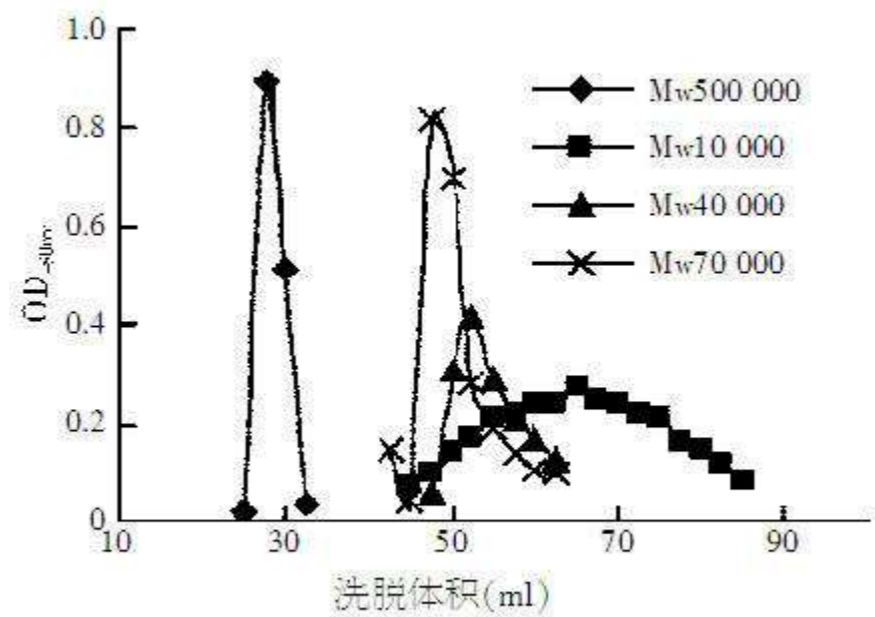


图 1 标准分子量葡聚糖洗脱曲线

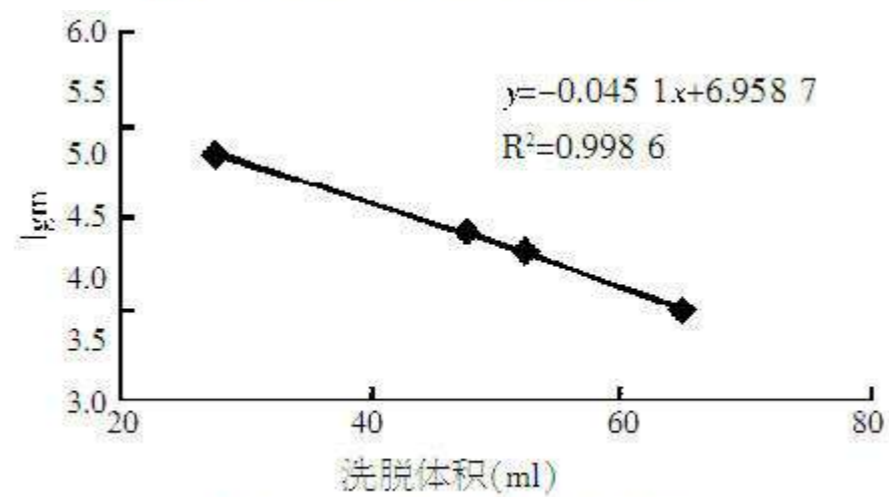


图 2 相对分子量标准曲线

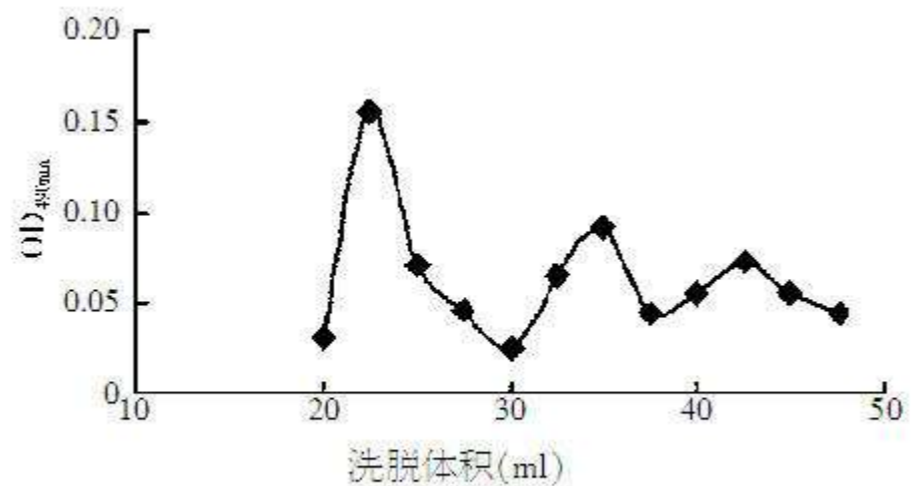


图3 原料壳聚糖相对分子质量分布曲线

由图3中原料壳聚糖的相对分子质量分布曲线可以看出，原料壳聚糖有3个主要的分子量分布峰，第一个峰的相对分子量分布大于 8.8×10^5 ；第二个峰的相对分子量分布在 $4.0 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5$ 之间；第三个峰的相对分子量分布在 1.1×10^5 以下。第一个峰的峰面积最大，主峰位置在洗脱体积22.5 ml处。

3.3 酶解后壳聚糖在Sephadex G100柱上的相对分子质量分布（见图4、5、6、7、8）

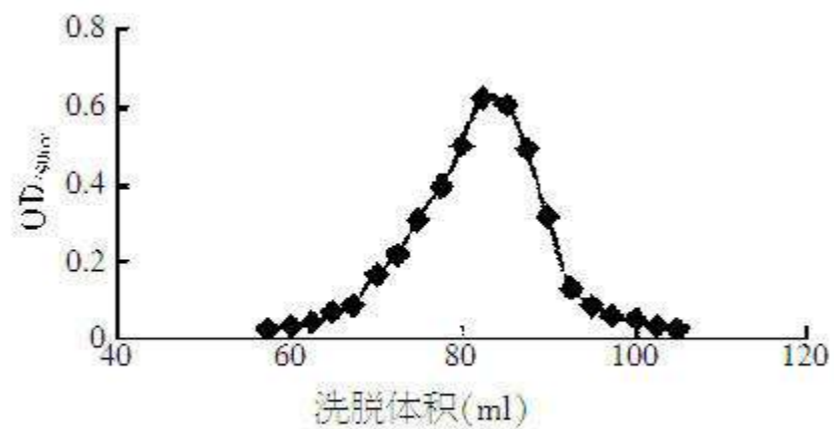


图4 甘露聚糖酶水解 48 h 的相对分子质量分布(I)

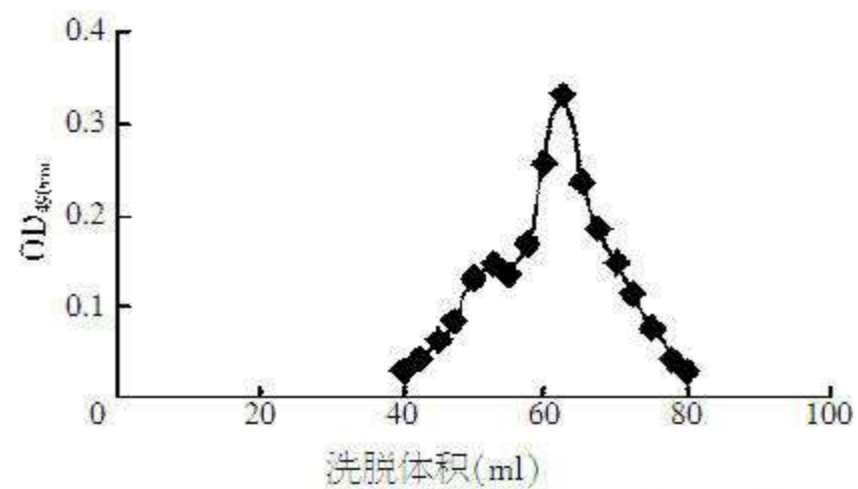


图5 纤维素酶水解 48 h 的相对分子量分布(Ⅱ)

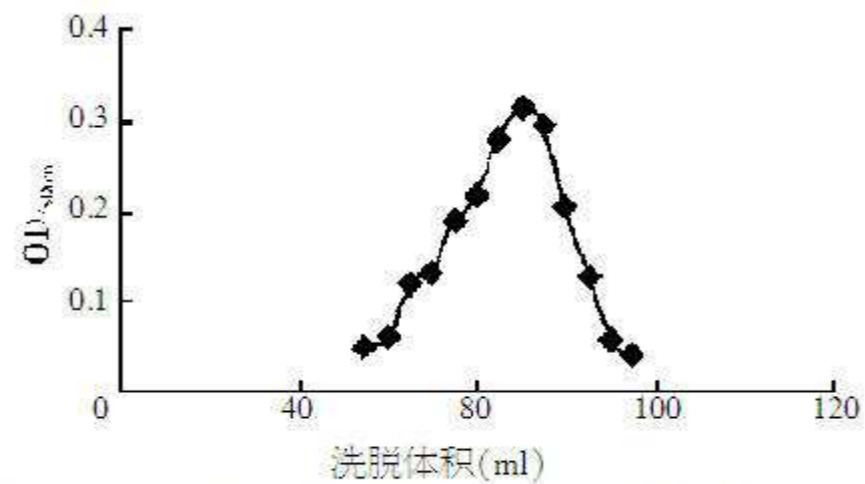


图6 甘露聚糖酶+纤维素酶水解 48 h 的相对分子量分布(Ⅲ)

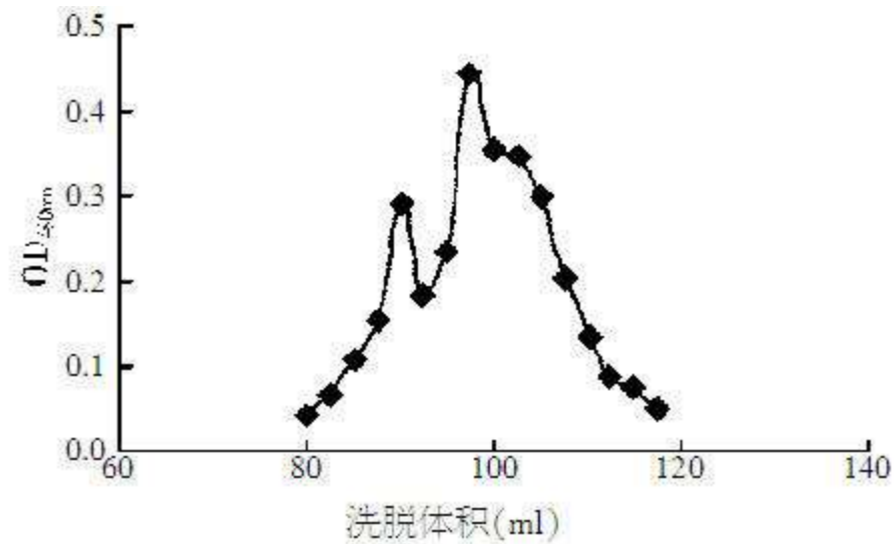


图7 甘露聚糖酶先水解24 h后纤维素酶再水解24 h的相对分子量分布(IV)

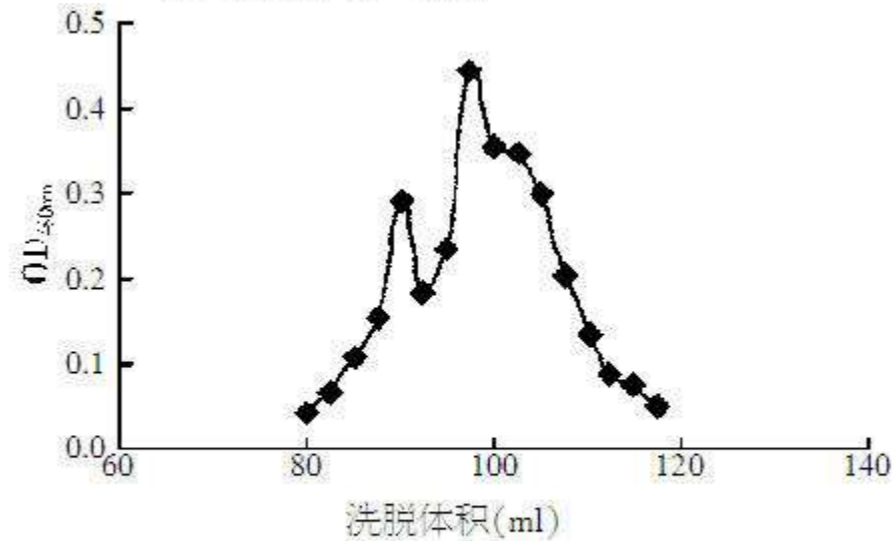


图7 甘露聚糖酶先水解24 h后纤维素酶再水解24 h的相对分子量分布(IV)

由图4可以看出, 甘露聚糖酶水解48 h (I) 后, 壳聚糖底物的高分子部分基本降解。产物的主峰位置移至到洗脱体积82.5 ml处。通过图2的标准曲线可计算出相对分子量分布为 1.7×10^3 左右, 降解得率为96%。

由图5可以看出, 纤维素酶水解48 h (II) 后, 壳聚糖底物的高分子部分基本降解。产物的主峰位置移至到洗脱体积62.5 ml处。在洗脱体积52.5 ml处还出现一杂峰, 说明此时壳聚糖分子量组分不纯。相对分子量分布于 1.4×10^4 左右, 降解得率为87%。

由图6可以看出, 甘露聚糖酶+纤维素酶水解48 h(III)后, 壳聚糖底物的高分子部分基本降解, 产物的主峰位置移至到洗脱体积85 ml处。相对分子量分布于 1.3×10^3 左右, 降解得率为92.6%。

由图7可以看出, 甘露聚糖酶先水解24 h后, 纤维素酶再水解24 h(IV), 壳聚糖底物的高分子部分基本降解, 产物的主峰位置移至到洗脱体积97.5 ml处。但在洗脱体积为90 ml处出现一个杂峰, 说明此时的壳聚糖的分子量组分不纯。相对分子量分布于 4.2×10^2 左右, 降解得率为91.9%。

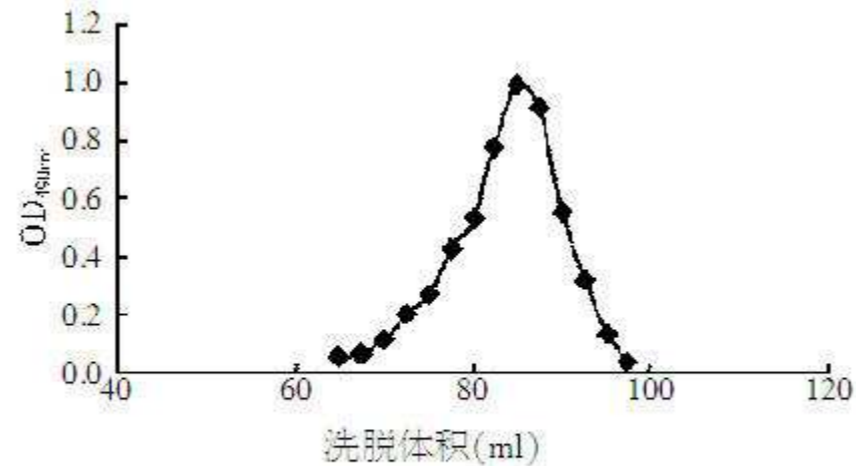


图8 纤维素酶先水解24 h后甘露聚糖酶再水解24 h
的相对分子量分布(V)

由图8可以看出, 纤维素酶先水解24 h后, 甘露聚糖酶再水解24 h(V), 壳聚糖底物的高分子基本降解, 产物的主峰位置移至到洗脱体积85 ml处, 此时的OD值最高, 说明降解程度最好。相对分子质量分布于 1.3×10^3 左右, 降解得率为91.8%。

3.4 分析与讨论

由图4至图8可以看出, 通过降解后分子量和降解得率的比较, 可以看出甘露聚糖酶的降解能力比纤维素酶的降解能力要强。而且, 先用纤维素酶水解后, 再加入甘露聚糖酶水解, 降解效果最好。可能是由于纤维素酶是由内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶和纤维素二糖酶组成的多酶体系, 经过纤维素酶水解后, 其内切型葡聚糖酶使壳聚糖内部的甘露聚糖酶的作用位点暴露, 使其降解效果更好。

从凝胶柱测得的底物分子量比粘度法测得的粘均分子量小得多, 粘度法和凝胶渗透色谱法都是基于聚合物的流体力学体积, 与分子量、链的柔韧性及与溶剂的相互作用有关。此外, 由于Sephadex G100柱的分子量标准曲线采用的是葡聚糖分子, 葡聚糖分子结构与壳聚糖的分子结构之间有一定的差异, 虽然都是无规律的线性分子, 但壳聚糖是2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖和少量的N-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖通过 β -1, 4糖苷键连接的直链多糖, 葡聚糖是葡萄糖通过 α -1, 4糖苷键连接的直链多糖, 两者与Sephadex G100柱的吸引力不同。凝胶柱测得的水解产物分子量分布, 虽然不能真实地反映相对分子质量大小, 但它们之间的相互比较能说明酶水解效果。

本试验是用酶法阶梯降解壳聚糖, 与单纯的酶法降解相比有一定的创新, 且操作简单, 易于控制, 在饲料、食品等工业上有良好的应用前景。

参考文献

- 1 刘晓,杜昱光,白血芳.壳聚糖诱导小麦种胚细胞抗脱氧化雪腐镰刀菌烯醇抑制的效应[J].植物学报,2001,43(4):370~374
- 2 严淑兰,陆大年.降解壳聚糖用于棉的抗皱整理[J].染整技术,2001,23(3):13~17
- 3 Chung Y S, Lee K K, Kin J W. Durable Press and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabrics with a Citric Acid and Chitosan Treatment[J]. Tex. Res., 1998,68(10):772~775
- 4 姚汝华.微生物工程工艺原理[M].广州:华南理工大学出版社,2003.297~309
- 5 唐振兴,石陆娥,易喻.壳聚糖及其降解分子量的测定[J].化工技术与开发,2004,33(6):38~39
- 6 姚冬生,黄小葵,刘大岭,等. *Armillariella tabescens* EJLY2098 β -甘露聚糖酶的诱导、纯化及酶学性质分析[J].中国生物工程杂志,2006,26(7):57~63
- 7 李剑芳,张静娟,郭敏辰,等.酸性 β -甘露聚糖酶固态发酵工艺与粗酶性质[J].食品科学,2006,27(5):143~147
- 8 张志军,刘建华,李淑芳,等.灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J].食品工业科技,2006,27(2):193~195

(编辑: 高雁, snowyan78@tom.com)

评论

发表
评论



*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址: 沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编: 110036 投稿: E-mail: tg@feedindustry.com.cn 广告: E-mail: ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部: (024) 86391926 (传真) 编辑二部: (024) 86391925 (传真) 网络部、发行部: (024) 86391237 总编室: (024) 86391923 (传真)