

球孢白僵菌胞内几丁质酶的分离纯化及性质*

彭仁旺 黄秀梨

(北京师范大学生物系 北京 100875)

摘 要 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 突变株 CH-1316 细胞裂解液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, DEAE-纤维素层析及凝胶过滤, 分离出一种几丁质酶, 该酶的分子量为 32000; 最适 pH 为 5.0; 最适温度为 40℃; 最适离子强度为 0.2 mol/L NaCl; Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 是该酶的强抑制剂; 该几丁质酶完全不水解纯的片状几丁质, 脱矿几丁质也不是该酶的良好底物; 该几丁质酶水解几丁寡糖, 但不水解几丁二糖; 对几丁五糖以上的寡糖水解速度较快, 而对几丁三糖和四糖水解速度则慢得多。

关键词 球孢白僵菌, 胞内几丁质酶, 纯化和性质

几丁质酶 (Chitinase, EC. 3.2.1.14) 分布在从微生物到高等动植物的几乎所有的生物类群中。60 年代, J. Monreal 检测了 100 种微生物(包括细菌和真菌)产生几丁质酶的情况^[1]。截至 80 年代, 产生几丁质酶的微生物、植物、动物种类大多已被鉴定出来。在这些不同来源的几丁质酶中, 真菌几丁质酶因具有独特的生理功能而受到广泛注目, 但已纯化的真菌几丁质酶并不多。球孢白僵菌是一种广泛应用的真菌, 早在 70 年代, Leopold 就证实球孢白僵菌能合成几丁质酶^[2], 但未见纯化该酶的报道。1993 年, Havukkala 等在球孢白僵菌培养液中检测到两种几丁质酶组分并纯化了其中的一种^[3]。最近我们成功地分离到一株高产几丁质酶的突变株 CH-1316, 从该突变株中, 分离到了两种胞外几丁质酶(另外报道)和一种胞内几丁质酶。胞内几丁质酶和胞外几丁质酶分子量大小不同, 同时在菌体培养液中检测不到胞内几丁质酶的存在, 预计这两种酶参与不同的生理过程。本文报道胞内几丁质酶的纯化及性质的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 为本室保存。实验用菌株经紫外诱变、筛选而获得突变菌株 CH-1316。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(%): 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母浸出液 0.5, KH_2PO_4 0.05, MgSO_4 0.05, KCl 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 6.0。

1.2.2 诱导培养基(%): MgSO_4 0.05, KH_2PO_4 0.05, KCl 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 胶体几丁质 1, pH 6.0^[4]。

* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 7 月 17 日收到。

1.3 主要生化试剂

标准蛋白购自华美生物工程公司;DEAE-纤维素、Sephadex G-25、Sephadex G-100 均为 Whatman 公司产品;胶体几丁质按 Jeuniaux 方法^[9]制备。几丁寡糖参照 Berkeley 法^[6]制备。

1.4 菌株培养

在完全培养基中接种 10^6 /ml 分生孢子悬液,28℃ 振荡培养 3d 后取出菌丝,用蒸馏水洗净,再转移到诱导培养基中继续培养 20~25h。

1.5 几丁质酶活力测定

按 Ohtakara 法^[7],取 1.5ml 胶体几丁质与适当稀释的酶液于 40℃ 反应 1h,上清液中还原糖的量按 DNS 法^[8]测定。一单位酶活力定义为每分钟释放 $1\mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量。

1.6 蛋白质浓度测定

按 Lowry 法^[9]测定。

1.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[10]

采用不连续垂直板状电泳系统,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度 5%,含 0.1% SDS,采用 Tris-HCl 缓冲体系。

2 结果

2.1 几丁质酶的纯化

2.1.1 粗酶液的制备: 按上述培养方法得到的培养物离心,收集菌体,用蒸馏水充分洗涤菌体再离心,然后将菌体悬浮于 0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中。按菌体湿重与石英沙 1:1 的比例加入石英沙,装入研磨器中充分研磨,同时冰浴冷却,显微镜下检查,直至大多数细胞破裂为止。用 0.1mol/L Tris-HCl 适当稀释,冷冻离心 ($5000g$) 5min,除去未破碎的细胞及石英沙,上清液再冷冻离心 ($16000g$) 10min,弃去沉淀,上清液用于提取胞内几丁质酶。为了找到能使几丁质酶沉淀的最适 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度,测试了从 10% 到 80% 的不同饱和度下的沉淀物中几丁质酶活力。结果发现:在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度为

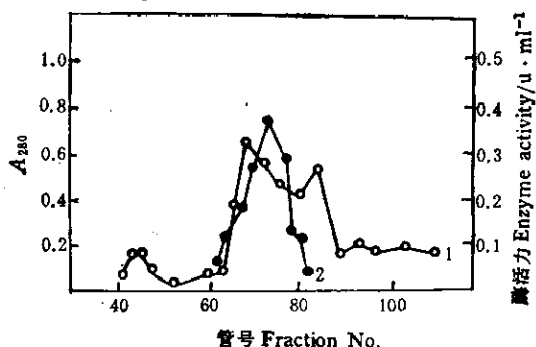


图1 胞内几丁质酶的 DEAE-纤维素柱层析图
Fig. 1 Chromatogram of intracellular chitinase on DEAE-cellulose column

1.吸光度 A_{280} ; 2.酶活力 Enzyme activity.

40% 时,沉淀物中几丁质酶含量最高;在 20% 至 70% 饱和度之间,几丁质酶已大部分沉淀下来。所以,本文选用的沉淀几丁质酶的条件为 20% 和 80% 二次沉淀。

2.1.2 DEAE-纤维素柱层析: 上述 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀物溶于适量的 0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中,经 Sephadex G-25 柱 ($1.2 \times 20\text{cm}$) 层析脱盐,收集有蛋白组分的洗脱液进行 DEAE-纤维素柱层析。按常规方法将 DEAE-纤维素 (DE-52) 装柱 ($2 \times 40\text{cm}$),并用 0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 平衡。

上样后,先用同一缓冲液充分洗涤以除去未被吸附的杂蛋白,再用 0~1.0mol/L NaCl 线性洗脱,收集活性组分供进一步纯化。图 1 为 DEAE-纤维素柱层析曲线。

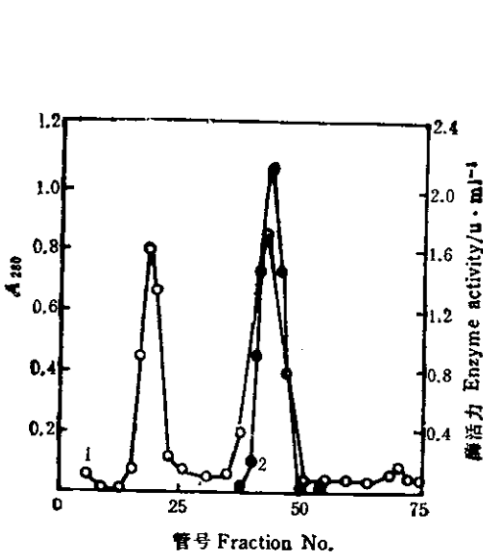


图 2 胞内几丁质酶的 Sephadex G-100 柱层析图

Fig. 2 Chromatogram of intracellular chitinase on Sephadex G-100 column

1.吸光度 A280; 2.酶活力 Enzyme activity.



图 3 几丁质酶的 PAGE 图

Fig. 3 PAGE pattern of intracellular chitinase

A. 5µg 纯几丁质酶 purified chitinase;

B. 20µg 纯几丁质酶 purified chitinase.

2.1.3 Sephadex G-100 柱层析:将收集的有酶活的组分加至已平衡的 Sephadex G-100 柱 (1.8 × 65cm) 上,层析柱的静水压为 10cm 水柱,流速 10ml/h,洗脱液为 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0,含 0.1mmol/L NaCl),分部收集 (4ml/管) 合并有酶活的组分。洗脱曲线见图 2。

上述收集的组分经 PAGE 检验为一条带(图 3),说明几丁质酶已完全纯化。球孢白僵菌胞内几丁质酶的主要纯化步骤见表 1。

表 1 球孢白僵菌胞内几丁质酶的纯化

Table 1 Purification of intracellular chitinase from *Beauveria bassiana*

步 骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	产率 Recovery (%)
Crude enzyme	2779	280	0.07	1	100
DEAE-cellulose chromatography	64	154	2.41	33.5	77
Sephadex G-100 chromatography	6	39	6.5	90.3	19.5

2.2 几丁质酶的性质

2.2.1 分子量:将样品及已知分子量的标准蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后以

相对迁移率对分子量对数作图(图4)。从图中可以查得几丁质酶的分子量约为 32 000。

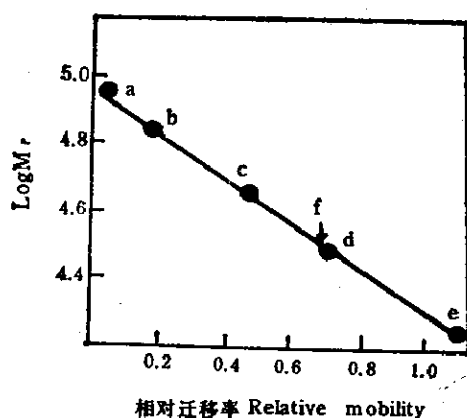


图4 胞内几丁质酶分子量的测定

Fig. 4 Determination of intracellular chitinase Mr. by SDS-PAGE

a: Phosphorylase b(94 000); b: Albumin (67 000); c: Actin (43 000); d: Carbonic anhydrase (30 000); e: TMV coat protein (17 500); f: 胞内几丁质酶 intracellular chitinase.

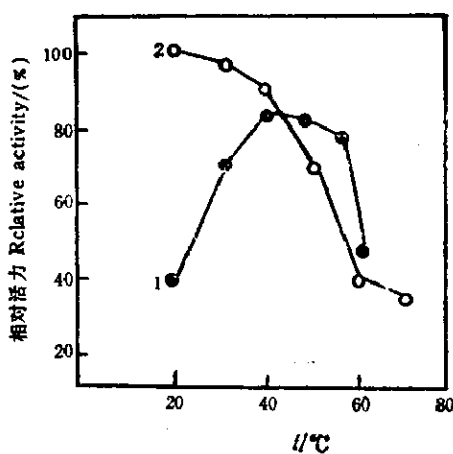


图5 温度对几丁质酶活力及稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity and stability of intracellular chitinase

1. 酶活力 Enzyme activity;
2. 相对稳定性 Relative stability.

2.2.2 温度对几丁质酶活力及稳定性的影响: 将酶与底物于不同温度下保温以测定温度对酶活力的影响,其余条件同标准条件下几丁质酶活力的测定,结果见图5。从20℃至60℃,酶的总活力呈上升趋势。为测定温度对酶蛋白稳定性的影响,先将酶在不同的温度下预保温1h,然后再按标准条件测定剩余的酶活力,以最适条件下的酶活力为100%。由图5可以看出,该酶在20℃至40℃保温1h基本不失活,50℃保温1h活力损失25%左右,70℃保温1h则损失70%以上。由于超过40℃酶蛋白开始不稳定,所以几丁质酶的最适反应温度是40℃。

2.2.3 pH 对酶活力及稳定性的影响: 酶液在不同 pH 的 0.1mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸

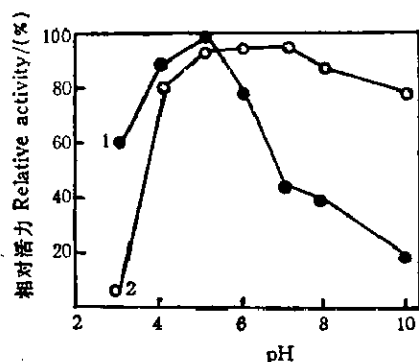


图6 pH 对几丁质酶活力及稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on the activity and stability of intracellular chitinase

1. 酶活力 Enzyme activity;
2. 相对稳定性 Relative stability.

缓冲液 (pH > 8.0 时用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)中保温,分别测定酶活力,得到 pH 对酶活力影响的关系曲线;为了检测 pH 对酶蛋白稳定性的影响,先将酶在不同的 pH 条件下预保温1h,然后再在标准条件下测定剩余的酶活力,结果见图6。胞内几丁质酶的最适 pH 为5.0左右;pH > 10 或 < 2 时,酶活力几乎全部丧失。在 pH 4~10 的范围内,酶蛋白基本保持稳定。

2.2.4 离子强度对酶活力的影响: 在含有不同 NaCl 浓度的磷酸缓冲液中分别测定对应的几丁质酶活力,结果发现

几丁质酶在 0.2mol/L NaCl 存在时活力最大。

2.2.5 金属离子对酶活力的影响: 在酶反应液中分别加入不同的金属离子, 并使其终浓度为 1mmol/L, 然后按标准方法测定酶活力, 结果如表 2。

表 2 金属离子对几丁质酶活力的影响

Table 2 Effect of metallic ions on intracellular chitinase activity

金属离子 Metal ions	相对活力(%) Relative activity
None	100
Co ²⁺	102
Ni ²⁺	102
Mg ²⁺	97
Na ⁺	94
Ca ²⁺	94
Mn ²⁺	88
Zn ²⁺	88
Cu ²⁺	78
Fe ²⁺	46
Hg ²⁺	17

表 3 几丁质酶对不同底物的水解速率

Table 3 Hydrolysis rate of intracellular chitinase on different substrates

底物 Substrates	相对速率(%) Relative rate
胶体几丁质 Colloidal chitin	100
几丁己糖 Chitohexaose	100
几丁戊糖 Chitopentaose	98
几丁四糖 Chitotetraose	74.2
脱矿几丁质 Demineralized chitin	28.8
几丁三糖 Chitotriose	16.6
几丁二糖 Chitobiose	5.2
片状几丁质 Flaked chitin	0

从表 2 中可见, 在所测试的金属离子中, Hg²⁺ 和 Fe²⁺ 则强烈抑制酶活性, 其余离子作用不明显。

2.2.6 几丁质酶底物特异性: 将酶与不同的底物保温, 然后按标准方法测定酶活力, 结果如表 3。

从表 3 可以看出, 胞内几丁质酶对不同底物表现出极大的活性差异。胶体几丁质是酶的良好底物, 脱矿几丁质次之, 而纯的片状几丁质则完全不被水解。同时, 胞内几丁质酶优先水解几丁六糖和五糖, 而几丁四糖、三糖和二糖则随着聚合度的降低, 几丁质酶水解它们的速度也下降。

3 讨论

球孢白僵菌胞内几丁质酶纯化后活力提高了 90 倍, 比已报道的其它真菌几丁质酶的纯化效率高^[1]。pH、温度、离子强度及金属离子对酶活力都有影响, 其中 pH、温度的影响较显著, 这与已报道的真菌几丁质酶^[12]的性质一致。已有报道, 在细菌、真菌及动物中几丁质酶的分子量变化较大, 多在 20 000~80 000 之间^[13], 我们的实验结果表明球孢白僵菌胞内几丁质酶的分子量约为 32 000。

球孢白僵菌胞内几丁质酶对底物分子的大小有一定要求, 同时对不同形态的几丁质的敏感性相差颇大, 这与植物中的麦胚几丁质酶类似。Saburo 等曾报道^[14], 麦胚几丁质酶和底物的亲和常数随底物聚合度提高而增大; 作用于新生态几丁质比天然几丁质活力

高 80 倍。

真菌是几丁质酶的重要来源之一,真菌细胞壁的主要成分是几丁质,它可能在与细胞壁代谢有关的一系列生理过程中发挥作用,所以真菌几丁质酶尤其是胞内几丁质酶的生理功能一直为人们所瞩目。但到目前,只有少数几种来源的真菌几丁质酶被纯化并作了鉴定。本文报道的球孢白僵菌胞内几丁质酶的分离纯化及性质研究无疑为进一步阐明胞内几丁质酶与细胞壁代谢之间的关系奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Monreal J and Reese E T. *Can J Microbiol*, 1969, **15**: 689~696.
- [2] Leopold J. *J Invertebr Pathol*, 1970, **15**: 34~42.
- [3] Havukkala I, Mitamura C, Hirayae K *et al.* *J Invertebr Pathol*, 1993, **61**: 97~102.
- [4] 黄秀梨, 荣倩, 黄德君, 等. 北京师范大学学报(自然科学版), 1987, **23**(4): 76~80.
- [5] Jeuniaux C. *Methods Enzymol*, 1966, **8**: 644~650.
- [6] Berkeley R C W, Brewer S J, Ortiz J M. *Anal Biochem*, 1972, **46**: 687~690.
- [7] Ohtakara A, Mitsutomi M, Uchida Y. *J Ferment Technol*, 1979, **57**(3): 169~177.
- [8] Tsukamoto T, Koga D, Ide A *et al.* *Agric Biol Chem*, 1984, **48**: 931~939.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~275.
- [10] King J, Laemmli U K. *J Mol Biol*, 1971, **62**: 465~477.
- [11] Saburo H, Yamamura Y, Fujii Y *et al.* *J Biochem*, 1989, **105**: 484~489.
- [12] Cabib E. *Advances in Enzymology*, 1987, **59**: 59~101.
- [13] St Leger R J, Cooper R M, Charnley A K. *J Invertebr Pathol*, 1991, **58**: 415~426.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF INTRACELLULAR CHITINASE FROM *BEAUVERIA BASSIANA*

Peng Renwang Huang Xiuli

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract An intracellular chitinase from *Beauveria bassiana* mutant CH-1316 was purified to homogeneous by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-100 chromatography. The enzyme had a molecular weight of 32000. The optimum pH, temperature and ionic strength for activity were 5.0, 40°C and 0.2mol/L NaCl respectively. Hg^{2+} and Fe^{2+} strongly inhibited the activity. The enzyme showed no activity on purified flaked chitin, little activity on demineralized chitin. The enzyme hydrolyses oligosaccharides with different rate. Chitohexaose and chitopenaose were hydrolyzed much faster than chitotetraose and chitotriose. Chitobiose can hardly be hydrolysed.

Key words *Beauveria bassiana*, Intracellular chitinase, Purification and property