

产气肠杆菌几丁质酶的分离纯化及性质研究

唐亚雄 赵 建 丁诗华 刘世贵 杨志荣*

(四川大学草原生物防治工程国家专业实验室 成都 610064)

摘 要: 从自然罹病死亡的草原毛虫 (*Gynephora ruoergnesis*) 体内分离到一株产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) , 它在几丁质的诱导下能产生较高活性的几丁质酶。发酵液经硫酸铵盐析、DEAE 纤维素柱层析和 Sephadex G-100 柱层析分离出几丁质酶。用 SDS-PAGE 测得该酶的分子量为 42.5kD。水解几丁质的 K_m 值为 2.88mg/mL^{-1} 。酶反应的最适温度为 55°C , 最适 pH 值为 6.0 , 金属离子对几丁质酶活性影响较大 , 其中 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶有较强的激活作用 , 而 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 则有较强的抑制作用。

关键词: 产气肠杆菌 , 几丁质酶 , 纯化 , 酶学性质

中图分类号 : Q814 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-6209 (2001) 01-0082-05

几丁质 (Chitin) 是 N-乙酰-D-葡萄糖胺以 β -1,4 糖苷键连接起来的直链多聚物。几丁质构成大多数真菌的细胞壁 , 它也大量存在于昆虫和动物体表及消化道上 , 是真菌病害和农林害虫有效防治的限制因素之一^[1]。几丁质酶 (Chitinase, EC3.2.1.14) 分布广泛 , 几乎从微生物到高等动植物所有的生物类群中都有分布^[2]。尽管有关微生物几丁质酶的产生情况国内外已有不少报道^[3~10] , 但是有关产气肠杆菌的产酶情况却知之甚少。本实验室从生防工程出发 , 分离到一株能产生较高活性几丁质酶的产气肠杆菌 , 该菌所产酶液对于真菌病害和农林害虫的生物防治具有潜在的应用价值。本文就该酶的纯化及其性质的研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

由本室从自然罹病死亡的草原毛虫体内中选择分离 , 并鉴定为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)^[10]。

1.2 产气肠杆菌产几丁质酶的培养条件

平板培养基: 胶状几丁质 0.5g , 酵母粉 0.05g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.17g , KH_2PO_4 0.14g , 琼脂 1.8g , 用水定容到 100mL , pH7.5。

摇瓶产酶优化培养基: 蛋白胨 0.47g , 牛肉膏 0.18g , 酵母粉 0.01g , 几丁质 0.34g , NaCl 0.18g , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.035g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g , KH_2PO_4 0.05g , 用水定容到 100mL , pH7.6。

摇瓶发酵产酶条件: 38°C 150r/min 往复式摇床振荡培养 38h , 收集发酵液。

* 通讯作者

作者简介: 唐亚雄 (1971-) 男, 四川岳池人, 博士生, 现从事分子生物学研究。

收稿日期: 1999-11-15, 修回日期: 2000-05-13

1.3 主要生化试剂

胶体几丁质制备参照 Roberts 等^[11]的方法略有改进。DEAE-纤维素 32、Sephadex G-100均为 Whatman 公司产品, SDS 为日本进口分装, 丙烯酰胺、牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品, 巯基乙醇为 E. merk 公司产品, Tris 为 Promega 公司产品, N, N'-亚甲基双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 几丁质酶活力测定

参照 Antonio 和 Masarus 方法^[12, 13] 0.5mL 胶体几丁质与适当稀释的酶液 0.5mL 于 50℃ 水浴反应 1h, 用 DNS 法^[14]测定。一个酶活力单位(U)被定义为在 50℃ 下每分钟释放出相当于 1 μ gN-乙酰葡萄糖胺(NAG)的还原糖所需要的酶量。

1.5 蛋白质含量测定

按 Bradford 法^[15]进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.6 电泳分析

采用垂直板状电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) \ SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)均按标准方法^[16]进行。

1.7 酶的分离和纯化

1.7.1 硫酸铵盐析 将培养液于 4℃ 10 000r/min 离心 30min, 上清液经超滤浓缩后, 慢慢加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 90% 饱和度, 4℃ 过夜后 10 000r/min 离心 30min, 弃上清液, 收集沉淀, 用 pH8.0、0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液溶解沉淀并用该缓冲液彻底透析。

1.7.2 DEAE-纤维素(DE 32)柱层析 将彻底透析后的酶样品直接上经上述缓冲液平衡过的 DEAE-纤维素层析柱(2.5cm \times 20cm), 用含 0~0.8mol/L NaCl 线性梯度的缓冲液洗脱, 流速为 30mL/h, 收集酶活性部分。

1.7.3 Sephadex G-100 柱层析 将上述收集的酶液, 用 pH6.0 的 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液充分透析, 经 PEG 20 000 浓缩到一定体积后, 上样于经该缓冲液平衡过的 Sephadex G-100 柱(2.5cm \times 100cm), 用同一缓冲液洗脱, 流速为 10mL/h。收集酶活力高的洗脱液, 并将酶液经该缓冲液充分透析后, 用 PEG 20 000 浓缩到一定体积贮存于 4℃ 以备。

1.8 酶学性质

1.8.1 分子量测定 将样品及已知分子量的标准蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后以相对迁移率对分子量对数作图, 从图中可以求出该几丁质酶的分子量。

1.8.2 动力学常数 K_m 值的测定 酶液与不同浓度的几丁质反应后测定其酶活力。用 Lineweaver-Burk 作图法求出该酶对底物的 K_m 值^[11~13]。

1.8.3 温度对几丁质酶活性及酶的热稳定性的影响 在不同温度下按常规法测定其酶活力。酶液在不同温度下保温 30min 后仍按常规法测定其对应的酶活力。

1.8.4 pH 对几丁质酶活性及酶对酸碱的稳定性影响 分别以 pH3~12 的缓冲溶液配制底物和稀释酶液, 按常规法测定其酶活力。此外, 将酶液与上述不同 pH 缓冲液在 50℃ 下保温 4h 后, 按常规法测定其对应的酶活力。

1.8.5 金属离子强度对几丁质酶活性的影响 在含有不同 NaCl 浓度缓冲液中, 按常规

法分别测定其对应的几丁质酶活力。

1.8.6 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 5mmol/L ,然后按常规法测定其酶活力。

2 结果

2.1 产气肠杆菌几丁质酶的分离和纯化

产气肠杆菌几丁质酶的分离纯化结果见表 1。粗酶液经硫酸铵盐析、DEAE-纤维素柱层析、Sephadex G-100 柱层析后 ,所得样品比活力为 17650U/mg ,纯化倍数为 15.22 ,活力回收率为 17%。该酶样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 1) ,表明纯化的几丁质酶为单一组分 ,已达到电泳纯。

表 1 产气肠杆菌几丁酶的纯化

Table 1 Purification of chitinase from *Enterobacter aerogenes*

Purification procedure	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity /(U/mg)	Purification fold	Activity recovery / %
Crude extract	590.00	6.84×10^5	1.16×10^3	1.00	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	250.24	5.13×10^5	2.05×10^3	1.77	75
DEAE-cellulose chromatography	49.86	3.31×10^5	6.64×10^3	5.72	48
Sephadex G-100 Chromatography	6.59	1.16×10^5	1.77×10^4	15.22	17

2.2 产气肠杆菌几丁质酶的一些酶学性质

2.2.1 分子量 :根据该酶在 SDS-PAGE 电泳中的迁移行为 ,通过作图法求出其分子量为 42.5kD(图 2)。

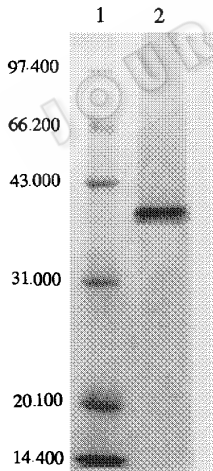


图 1 纯化的几丁质酶 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE pattern of purified chitinase ;

- 1. Molecular weight markers ;
- 2. Purified chitinase.

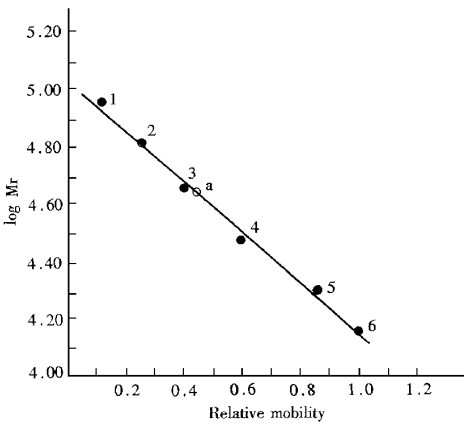


图 2 SDS-PAGE 测定

Fig. 2 Molecular weight determination of chitinase by SDS-PAGE Standard protein

- 1. Rabbit phosphorylase K(97400) ;
- 2. Bovine serum albumin(66200) ;
- 3. Rabbit actin(43000) ;
- 4. Bovine carbonic anhydrase(31000) ;
- 5. Trypsin inhibitor(20100) ;
- 6. Hen egg white lysozyme(14400) ;

2.2.2 动力学 K_m 值 :用 Linewear-Burk 作图法求得该酶对胶体几丁质的 K_m 值为 2.88mg/mL(图 3)。

2.2.3 温度对酶活性及酶的热稳定性的影响 :实验结果表明 ,该酶的最适反应温度为 55℃ ,该酶在 35℃ ~55℃ 保温 4h 后基本不失活 ,高于 70℃ 时酶活力几乎丧失 ,说明该酶对高温敏感(图 4)。

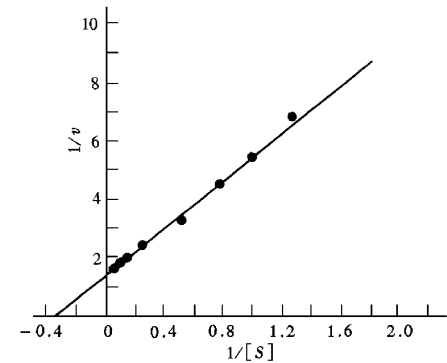


图 3 几丁质酶的 Linewear-Burk 图
Fig.3 Linewear-Burk polts of chitinase

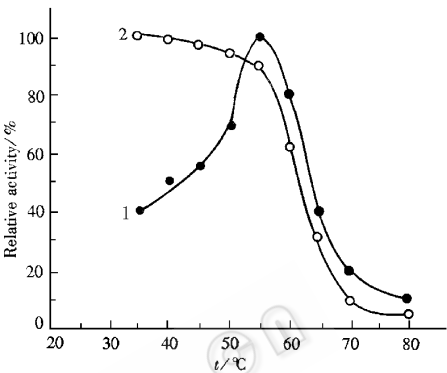


图 4 温度对几丁质酶活力及稳定性的影响
Fig.4 Effect of temperature on the activity and stability of chitinase
1. Enzyme activity ;
2. Relative stability.

2.2.4 pH 对酶活性及酶的酸碱稳定性的影响 :实验结果可知 ,该酶的最适 pH 为 6.0 ,该酶在 pH>9 或 pH<4 时 ,酶活力明显下降 ,在 pH4~9 内 ,酶蛋白基本保持稳定(图 5)。

2.2.5 离子强度对酶活力的影响 :实验表明 ,该酶的 0.2mol/L NaCl 存在时活力最大。

2.2.6 金属离子对酶活力的影响 :结果见表 2。多种金属阳离子对该酶都有不同的影响 ,其中 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活力有比较明显的激活作用 ,而 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 则有明显的抑制作用。

表 2 金属离子对几丁质酶活性的影响

Table 2 Effect of meta lions on chitinase activity

Meta lions [*]	Relative activity/%
Control	100.0
Hg ²⁺	15.2
Co ²⁺	20.0
Mg ²⁺	37.5
K ⁺	65.2
Fe ²⁺	67.2
Cu ²⁺	80.0
Na ⁺	85.0
Ag ⁺	95.4
Fe ³⁺	114.0
Mn ²⁺	140.0
Ca ²⁺	150.0
Ba ²⁺	153.0
Zn ²⁺	166.0

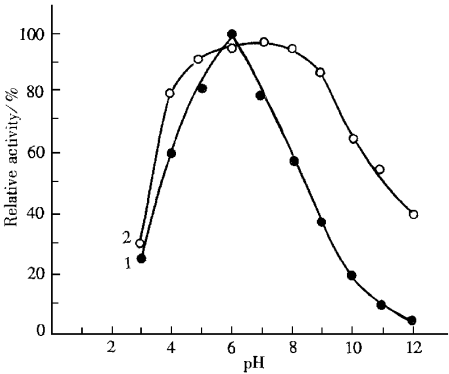


图 5 pH 对几丁质酶活力及稳定性的影响
Fig.5 Effect of pH on the activity and stability of chitinase
1. Enzyme activity ; 2. Relative stability.

* 5mmol/L

3 讨论

几丁质酶是一类差异较大的水解酶类,许多文献已报道了不同来源的几丁质酶的分离纯化及性质研究。但有关从自然罹病死亡的草原毛虫体内分离到的产气肠杆菌的几丁质酶的分离纯化及性质研究未见报道。本文与已有的报道相比较,在酶的分子量、酶反应的最适温度、最适 pH 值以及金属离子对酶活力的影响等方面有差异。这些差异的产生,可能与因不同菌株所产酶的性质有所不同,也可能与分离纯化条件不尽相同等相关,这些都有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] 黄秀梨,项伯衡.北京师范大学学报,1981,2:91~94.
[2] Monerale J, Reese E T. *Can J Microbiol*, 1969, 15: 689~696.
[3] 陈三凤,李季伦,裘维蕃.植物病理学报,1992,22(4):323~327.
[4] 夏国庆,马应伦,贾新成.真菌学报,1996,15(4):306~308.
[5] 陈三凤,李季伦.微生物学通报,1993,20(3):156~160.
[6] 彭仁旺,黄秀梨.微生物学报,1995,35(6):427~432.
[7] 彭仁旺,管考梅,黄秀梨.微生物学报,1996,36(2):103~108.
[8] 杨文博,冯波,佟树敏.微生物学通报,1997,24(2):84~88.
[9] 陈三凤,李季伦.微生物学报,1994,34(1):14~19.
[10] 杨家惠,杨志荣,刘世贵,等.四川大学学报,1997,34(5):693~698.
[11] Roberts W, Selitrennikoff C. *J G Microbio*, 1988, 34:169~176.
[12] Antonio R, Ulrich M, Roland B, et al. *J Bacterial*, 1992, 174(11):3450~3454.
[13] Masaru M, Akira O, Tamo F, et al. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(4):871~877.
[14] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.第二版.北京:高等教育出版社,1997.
[15] Bradford M M. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248~254.
[16] Ausubel F M, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John wileg & Sons Inc. 1997. 10.2.4~10.6.8.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF CHITINASE FROM
ENTEROBACTER AEROGENES

Tang Yaxiong Zhao Jian Ding Shihua Liu Shigui Yang Zhirong
(National laboratory of Grassland Biological Control, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract : A bacterium producing chitinase was isolated from the dead body of *Gymnophora ruoergensis*. A chitinase was isolated from the culture of *E. aerogenes* and purified by means of ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, and Sephadex G-100 column gel filtration. The purified chitinase showed homogeneity on the native polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight was estimated to be about 42.5kD by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for hydrolysis of chitin were 6.0 and 55℃ respectively. Michaelis constant was 2.88mg/mL. Different metal ions showed different effects on the chitinase activity, The chitinase activity was enhanced by Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} and was strongly inhibited by Hg^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} .

Key words : *Enterobacter aerogenes* Chitinase Isolation and purification Properties