

疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究

郭润芳 李多川* 王 荣

(山东农业大学环境生物系 泰安 271018)

摘 要 采用硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子层析、Phenyl-Sepharose 疏水层析等步骤获得了凝胶电泳均一的疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)几丁质酶。经 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析测得纯酶蛋白的分子量在 48~49.8kD 之间。该酶反应的最适温度和最适 pH 分别为 55℃和 4.5,在 pH4.5 条件下,该酶在 50℃以下稳定;65℃的半衰期为 25min,70℃保温 20min 后,仍保留 24%的酶活性。其 N-端氨基酸序列为 AQGYLSVQYFVNWAI。金属离子对几丁质酶的活性影响较大, Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Ba^{2+} 对酶有激活作用; Ag^{+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶有显著的抑制作用;以胶体几丁质为底物的 K_m 和 V_{max} 值分别为 9.56mg/mL 和 22.12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。抗菌活性显示,该酶对供试病原菌有不同程度的抑制作用。

关键词 嗜热真菌, *Thermomyces lanuginosus*, 几丁质酶, 纯化, 性质

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)02-0270-05

几丁质酶(EC3.2.1.14)催化几丁质水解产生 N-乙酰氨基葡萄糖单体或低分子量的几丁寡糖,该酶广泛分布于生物体内,包括细菌、真菌、高等植物、昆虫和一些脊椎动物中^[1]。许多病原真菌和昆虫以几丁质作为细胞壁或外骨骼的基本结构成分,因此几丁质酶被广泛应用于植物病虫害的生物防治中,而且将外源几丁质酶基因转入植物,可以大大提高植物抗病虫害侵害的能力^[2~3]。另外,由于几丁质酶的专一性,其酶切产物比较固定,对于制备寡糖十分有利。在国外,几丁质酶还用来进行几丁质废物的处理^[4]。尽管已经分离了许多种几丁质酶,相关的基因也已克隆和表达,但有关热稳定性几丁质酶的研究却很少。目前仅从极端耐热古细菌 *Thermococcus chitonophagus*、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 以及细菌 *Bacillus* BG-11、*Streptomyces* OPC520 等^[5~8]中分离到热稳定几丁质酶,而来源于真菌的热稳定几丁质酶还未见报道。

疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)是一种广泛分布的嗜热真菌,是真核生物中生长上限温度很高的一种真菌,从该菌中已分离了多种嗜热酶,如热稳定的蛋白酶、糖化酶及木聚糖酶等^[9~11]。本文报道了从嗜热真菌(*T. lanuginosus*)中纯化出热稳定性较高的几丁质酶,并对它的生化特性进行了初步研究,以期为进一步开发和利用几丁质酶提

供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基和培养条件

1.1.1 菌种 疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)由本实验室分离并保存。

1.1.2 培养基 参考 Di Pietro^[12]的方法,并加以改进。每升含 K_2HPO_4 0.87g, KH_2PO_4 0.68g, KCl 0.2g, NH_4NO_3 1g, MgSO_4 0.2g, Yeast extract 4g, 胶状几丁质 10g, 用自来水、蒸馏水为 1:3 的溶液定容至 1000mL, 调 pH 值为 6.5。103.5kPa 下灭菌 30min。

1.1.3 主要试剂 Yeast extract 为 Oxoid LTD 产品; DEAE-Sepharose 和 Phenyl Sepharose 为 Pharmacia 产品; 甲壳素、考马斯亮蓝、SDS、Glycin 和 TEMED 等购自 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白购自上海升正生物技术有限公司。

1.1.4 培养条件 将活化的菌种接种到含固体培养基 PDA 的培养皿中, 50℃培养 7d 后, 用含 1%吐温-80 的无菌水洗下孢子, 以每瓶 10^6 孢子量接种到含 75mL 液体培养基的 250mL 摇瓶中。在水浴恒温摇床(120r/min, 50℃)上培养 7d 后, 过滤, 8000r/min 离心 10min, 上清液即为粗酶液。

1.2 酶活性测定

酶活性测定采用 DNS 法^[13], 反应体系: 0.5mL

基金项目 国家自然科学基金(30270013, 30170013) 国家 863 计划(2003AA241162)

* 通讯作者。Tel: 86-538-8249071 E-mail: lide20@sdaa.edu.cn

作者简介 郭润芳(1969-)女, 河北怀安人, 山东农业大学植保学院博士生, 主要从事嗜热酶学研究。E-mail: runfang@163.com

收稿日期 2004-05-31, 修回日期 2004-08-02

(2.5% W/V)胶态几丁质(悬浮于 0.05mol/L、pH5.0 的醋酸缓冲液),250 μ L 酶液,50 $^{\circ}$ C 保温 2h。用 DNS 法测定上清液中的还原糖量。酶活力单位(U)定义:每分钟水解几丁质产生 1 μ mol 还原糖所需的酶蛋白量。

1.3 酶的分离纯化

酶的分离纯化参见文献[10]。诱导培养 7d 后的粗酶液进行饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析、Phenyl-Sepharose 疏水柱层析。层析结束收集活性部分,对活性管的酶液用 Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L,pH8.0)透析除盐,然后 SDS-PAGE 确认纯度。

1.4 蛋白质纯度和分子量测定

SDS-PAGE 分析几丁质酶纯度和亚基大小,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%,以 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白为标准蛋白。采用凝胶过滤层析法测定其分子量,具体方法参照文献[14]。

1.5 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[15],以牛血清白蛋白为标准蛋白测定。

1.6 N-端氨基酸测定

由上海基康生物技术有限公司采用 PROCISE cLC 蛋白测序系统(Applied Biosystems)测定。

1.7 抗菌活性的鉴定

采用 Young 等^[16]的方法。抗菌活性实验在无菌条件下进行。用无菌水配制病原菌的孢子悬浮液(10⁵~10⁶ 孢子/mL),取 5 μ L 上述悬浮液、5 μ L PDB 培养基、50 μ L 酶液混合,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 12h 后,观察并记录抑制孢子萌发和芽管伸长的百分数。对照以无菌水代替酶溶液。供试病原菌菌株为烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)。

将病原菌接种于直径为 9.0cm 的 PDA 平板上,于 28 $^{\circ}$ C 培养 2~4d,在菌苔周围 1.0cm 处打 3 个孔(d=0.5cm),每孔加一定量的酶液,对照以等量的无

菌水代替,继续培养 2~4d,观察抑菌情况。供试病原菌菌株为小麦纹枯菌(*Rhizoctonia cerealis*)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)。

2 结果

2.1 酶的分离纯化

粗酶液经饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀、DEAE-Sepharose 阴离子柱层析和 Phenyl-Sepharose 疏水层析后,所得样品的比活力为 35.51U/mg,纯化倍数 10.62 倍,活力回收率为 1.42%(表 1)。将纯化过程中各步的酶液进行 SDS-PAGE 检测(图 1)。图中泳道 4 为培养 7d 后的粗酶液,该菌经胶体几丁质诱导培养后,一种几丁质酶大量产生。泳道 2 为 DEAE-Sepharose 阴离子柱层析后的酶带,经 DEAE-Sepharose 阴离子柱层析后大量的杂蛋白被去除。收集有几丁质酶活性的酶液进行疏水层析,经 Phenyl-Sepharose 层析后,酶液经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(泳道 1),表明纯化后的几丁质酶为单一组分,已达到电泳纯。

如图所示,纯酶和标准蛋白经 SDS-PAGE 测定,该酶分子量约为 48kD(图 1)。采用凝胶过滤层析法测得该酶的分子量为 49.8kD,说明该酶为单聚体。

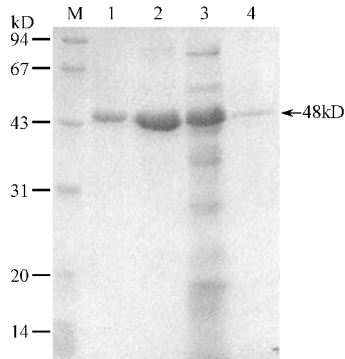


图 1 纯化的热稳定几丁质酶的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE pattern of purified thermostable chitinase
M. Molecular weight markers;1.Purified chitinase;2.DEAE-Sepharose chromatography 3.(NH₄)₂SO₄ precipitation 4. Crude extract.

表 1 疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化

Table 1 Purification of thermostable chitinase from <i>T. lanuginosus</i>					
Steps	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity(U/mg)	Yield/%	Purification/Fold
Crude extract	809.80	2707.04	3.34	100	1
80%(NH ₄) ₂ SO ₄	60.92	624.46	10.25	23.07	3.07
DEAE-Sepharose	20.40	369.28	18.10	13.64	5.97
Phenyl-Sepharose	1.08	38.36	35.51	1.42	10.62

2.2 酶学性质研究

2.2.1 酶反应最适温度和热稳定性 :在不同温度下检测酶活性 测得酶的最适作用温度为 55℃。将酶液在不同的温度下分别保温一定的时间后 ,立即在 0℃冰浴中冷却 ,然后在 50℃下测酶活 ,以剩余的酶活性作为评价酶的热稳定性的指标。结果显示 , *T. lanuginosus* 几丁质酶在 50℃以下是稳定的 ;60℃保温 1h 后 ,残留酶活性为 85% ;65℃的半衰期为 25min ;70℃保温 20min ,残留酶活性为 24% ,表明 *T. lanuginosus* 几丁质酶具有较高的热稳定性。

2.2.2 最适反应 pH 和 pH 稳定性 :在不同的 pH 值缓冲液中检测酶活性 酶的最适 pH 值为 4.5。将适量酶液与不同 pH 缓冲液在 50℃预处理 1h 后 ,调整 pH 为 5.0 ,标准条件下测酶活 ,在 pH3.0 ~ 9.0 之间 *T. lanuginosus* 几丁质酶较稳定 ;pH 值为 2.5 时 ,仍有 70% 的原酶活性 ,说明该酶是一种耐酸几丁质酶。

2.2.3 不同金属离子对酶活性的影响 :在酶与底物的反应体系中 ,加入不同的金属离子 ,使其终浓度为 0.05mol/L ,以不加金属离子的酶活为 100% ,测定其酶活 (表 2) 。多种金属阳离子对该酶的活性都有较大的影响 ,其中 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 对酶有激活作用 , Ca^{2+} 能提高 1.7 倍的酶活性 ;一些重金属离子如 Ag^{+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶有显著的抑制作用 ; Mg^{2+} 对酶活有一定的影响。

表 2 各种金属离子对 *T. lanuginosus* 热稳定几丁质酶活性的影响

Table 2 Effects of different metallic ions on thermostable chitinase activity from <i>T. lanuginosus</i>			
Metallic ion	Relative activity/%	Metallic ion	Relative activity/%
Cu^{2+}	4.96	Mn^{2+}	50.9
Ba^{2+}	128.9	K^{+}	130.4
Mg^{2+}	70.9	Na^{+}	145.59
Ca^{2+}	170	Ag^{+}	0
Zn^{2+}	39.5	Hg^{2+}	1.32
Fe^{2+}	15.5	H_2O	100

2.2.4 几丁质酶的反应动力学曲线 :以不同浓度的胶体几丁质为底物 ,与纯化的几丁质酶反应 ,在标准条件下测定酶活力。几丁质浓度依次为 0.0、0.4、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0mg/mL ,以浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标 ,反应速率的倒数 $1/V$ 为纵坐标作 Lineweaver-Burk 图(图 2) 。几丁质酶的 K_m 为 9.56mg/mL , V_{max} 为 22.12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

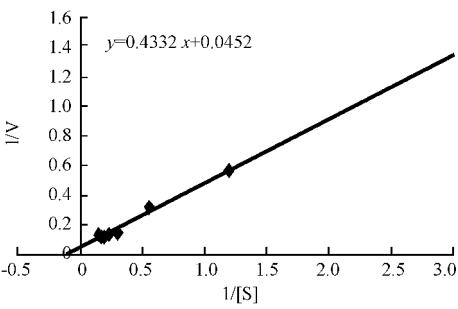


图 2 *T. lanuginosus* 几丁质酶的 Lineweaver-Burk 图
Fig.2 Lineweaver-Burk's plot of *T. lanuginosus* chitinase

2.3 N-端氨基酸序列测定

采用 Edman 降解法测定 N 端 15 个氨基酸 ,序列为 AQGYLSVQYFVNWAI。与 GenBank 中真菌几丁质酶的氨基酸序列进行 Alignment ,结果发现 *T. lanuginosus* 几丁质酶与 *Aspergillus fumigatus* (GenBank accession AY217660) 、*Coniothyrium mintansi* (GenBank accession AF285086) 几丁质酶的氨基酸序列有较高的同源性 (73.3%) ,和生防菌 *Trichoderma harzianum* (GenBank accession X79381) 及 *Aphaeladium album* (GenBank accession X64104) 几丁质酶的氨基酸序列的同源性分别达 53.3%、46.6%。

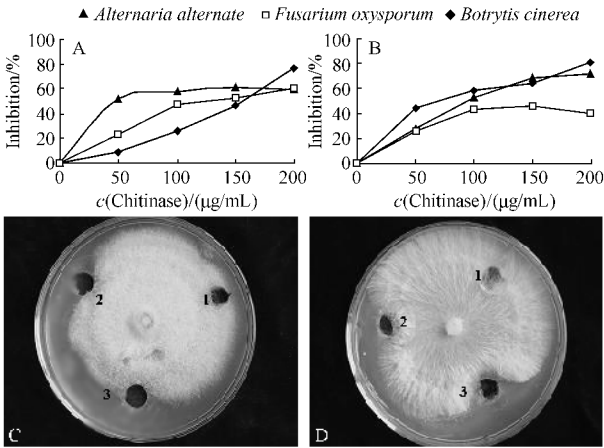


图 3 *T. lanuginosus* 几丁质酶对不同病原真菌的影响

Fig.3 Effect of chitinase from *T. lanuginosus* on different pathogenic fungi

A Inhibition of spore germination ; B Inhibition of germ tube elongation ;
C Inhibition of *R. cerealis* growth ; D : Inhibition of *S. rolfii* growth .

1. Steril water 2. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chitinase 3. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chitinase .

2.4 酶的抗菌活性

设置不同浓度的酶液对每一供试病原菌株做抑菌活性测定 结果表明该热稳定几丁质酶对串珠镰刀菌、烟草赤星病菌、番茄灰霉病菌的孢子萌发、芽管伸长有不同程度的抑制作用(图 3-A、B) 。在几丁质酶浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对串珠镰刀菌孢子萌发芽

管伸长的抑制率为 40% ~ 60%、对番茄灰霉病菌孢子萌发、芽管伸长的抑制率达 60% ,对烟草赤星病菌孢子萌发、芽管伸长的抑制率达 80%。

从 PDA 平板上也观察到几丁质酶浓度为 200 μ g/mL 时对小麦纹枯病菌、齐整小核菌的菌丝生长有一定的抑制作用(图 3-C、D)。

3 讨论

几丁质在自然界的储量极其丰富 ,仅次于纤维素 ,要有效利用这些丰富的有机物 ,热稳定性几丁质酶的应用意义很大。本研究在室温条件下分离纯化了嗜热真菌(*Thermomyces lanuginosus*)的胞外几丁质酶组分 ,纯化了 10.62 倍 ,纯化倍数相对较低 ,这在其它真菌几丁质酶的纯化中也观察到同样的现象^[17] ,原因可能是经胶状几丁质诱导后几丁质酶大量产生 ,而其它蛋白量较少 ,因而纯化倍数较低。该酶有较高的热稳定性和较广的酸性范围 ,能在酸性和高温环境中发挥作用 ,这是国内外首次报道从嗜热真菌中分离到对热稳定的几丁质酶。尽管比来源于细菌的几丁质酶热稳定性较低 ,但它是已报道的热稳定性最高的真菌几丁质酶^[5,17,18]。除了重金属离子 Ag⁺、Hg²⁺ 完全抑制酶的活性外 ,其它离子对几丁质酶活性的影响不大 ,这些生理特性赋予了 *T. lanuginosus* 几丁质酶在几丁质的生物转化及其它生物技术中有极大的应用优势。

几丁质酶被普遍认为是一种与重寄生、抗病防卫反应有关的酶 ,许多生防菌株通过产生几丁质酶来降解病原菌细胞壁^[19] ,但由于常温菌产生的几丁质酶热稳定性差 ,易失活 ,其货架时间短 ,这就限制了它在田间的广泛应用。本实验中纯化的热稳定性几丁质酶对多种病原真菌的孢子萌发和芽管伸长均有不同程度的抑制作用 ,预示了其在生物防治方面也有着非常诱人的应用前景。

目前该热稳定性几丁质酶基因的克隆正在进行中 ,有望将该基因导入中温菌 ,构建高效表达该几丁质酶的工程菌株 ,并能在常温和短时间内高效产生几丁质酶 ,降低能耗 ,提高经济效益。

参 考 文 献

[1] Muzzarelli R A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci* , 1997 , **53** :131 - 140.
[2] Lorito M , Sheridan L W , Irene G F , *et al.* Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *PNAS* , 1998 , **95** :7860 - 7865.

[3] Wang X , Ding X , Gopalakrishnan B , *et al.* Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem Mol Biol* , 1996 , **26** :1055 - 1064.
[4] Patil R S , Ghormade V , Deshpande M V. Chitinolytic enzymes : an exploration. *Enzyme Microb Technol* , 2000 , **26** :473 - 483.
[5] Andronopoulou E , Constantinos E. Purification and characterization of a new hyperthermostable , allosamidin insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Extremophiles* , 2003 , **7**(1) :43 - 53.
[6] Takeshi T , Toshiaki F , Tadayuki I. Different cleavage specificities of the dual catalytic domain in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biological Chemistry* 2001 , **276**(38) :35629 - 35635.
[7] Bhushan B. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *J Appl Microbiol* , 2000 , **88**(5) :800 - 808.
[8] Tsujibo H , Hatano N , Endo H , *et al.* Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermotolaceus* OPC-520 and cloning of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* , 2000 , **64**(1) :96 - 102.
[9] Duochun L , Yijun Y , Chongyao S. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol Res* , 1997 , **101**(1) :18 - 22.
[10] Duochun L , Yijun Y , Youliang P , *et al.* Purification and characterization of extracellular glucoamylase from the thermophilic *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol Res* , 1998 , **102**(5) :565 - 572.
[11] Schlacher A , Holzmam K , Hayn M , *et al.* Cloning and characterization of the gene for the thermostable Xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus*. *J Biotechnol* , 1996 , **49** :211 - 218.
[12] Di P A , Lorito M , Hayes C K , *et al.* Endochitinase from *Gliocladium virens* : isolation , characterization , and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* , 1993 , **83**(3) :308 - 313.
[13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* , 1951 , **31** :426 - 428.
[14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 1970 , **227** :680 - 688.
[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 1976 , **72** :248 - 259.
[16] Young J K , Byung K H. Purification , N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology* , 1996 , **48** :417 - 432.
[17] Guoqing X , Chunsheng J , Ju Z , *et al.* A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Eur J Biochem* , 2001 , **268** :4079 - 4085.
[18] 徐 同 , 柳良好 . 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用 . 植物病理学报 , 2002 , **32**(2) :97 - 102.
[19] Lorito M , Harman G E , Hayes C K , *et al.* Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* : antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* , 1993 , **83**(3) :302 - 307.

Purification and properties of a thermostable chitinase from thermophilic
fungus *Thermomyces lanuginosus*

GUO Run-fang LI Duo-chuan* WANG Rong

(Department of Environmental Biology , Shandong Agricultural University , Tai'an 271018 ,China)

Abstract: A thermostable extracellular chitinase from culture supernatant of a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* was purified to SDS-PAGE homogeneity , by using ammonium sulfate fraction , DEAE-Sepharose Fast flow chromatography , Phenyl-Sepharose Fast Flow chromatography . A molecular mass of the purified enzyme was between 48 ~ 49.8kD determined by SDS-PAGE and gel filtration chromatography . The chitinase exhibited optimum catalytic activity at pH 4.5 and 55℃ respectively . It was thermostable at 50℃ and retained 24% activity after 20min at 70℃ . The half life time of the enzyme at 65℃ was 25min . Different metal ions showed different effects on the chitinase activity . Ca^{2+} , Ba^{2+} , Na^{+} , K^{+} enhanced the enzyme activity , whereas Fe^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} caused obvious inhibition . The K_m and V_{\max} values of chitinase on colloidal chitin were 9.56mg/mL and 22.12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectively . The chitinase showed antifungal activity against tested fungi to different degree .

Key words : Thermophilic fungus , *Thermomyces lanuginosus* , Chitinase , Purification , Properties

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30270013 , 30170013) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2003AA241162)

* Corresponding author. Tel 86-538-8249071 ;E-mail : lidc20@sdau.edu.cn

Received date : 05-31-2004

(上接 263 页)

序号	会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人
8	第 3 届农用微生物产品(微生物肥料)技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9 月	200	北京	李俊 010-68918702
9	第八届全国分析微生物学术研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	9/10 月	100	湖南 吉首	宋亚军 010 - 66948562
10	2005 国际干扰素与细胞因子学术大会	中国微生物学会干扰素专业委员会	10 月 20 ~ 24 日	400	上海	焦炳华 , 021-65493936 范中善 , 021-25070306-8022
11	第十届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	福州	关雄 0591-3789259
12	第十届全国微生物学教学研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会、普及与教育工作委员会、农业微生物学专业委员会	8 月	100	哈尔滨	王立群 徐风花 0451-55190519 55190951
13	生物制品发展现状研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	10 月	150	昆明	李德富 010-67024325
14	第五届全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	150	海南/ 福建	黎高翔 010-62643074
15	2005 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 ~ 12 月	300	待定	王旭 010-62554677
16	微生物基因组学研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会 湖北武汉华中农业大学农业微生物学国家重点实验室	12 月	100	武汉	喻子牛、孙明 027-87283455
17	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会 2005 年学术年会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	待定	150	广东	王琴 010-62158844-3265