微生物学报 34(1):14－19,1994
Acta Microbiologica Sinica

黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)几丁质酶的纯化和性质

陈三凤　李季伦
(北京农业大学生物学院　北京 100094)

摘要　黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)在几丁质的诱导下产生几丁质酶。通过$(NH_4)_2SO_4$沉淀、DEAE 纤维素柱层析、Sephacryl 300 柱层析及 Sephadex G-75 柱层析,从 *Flavobacterium* sp. 培养上清液中分离纯化了几丁质酶。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)纯度分析表明,纯化后的几丁质酶达到了均一的程度。用 SDS-PAGE 测得该酶的分子量约 45000 道尔顿。该酶水解几丁质的最适 pH 为 7.0,最适温度为 50℃, 20℃贮存两年以上仍有活性,水解几丁质的 Km 值为 5.0mg/ml。金属离子对几丁质酶活性影响较大,Ca^{2+}、Co^{2+}和Cu^{2+}对酶有激活作用,而NH_4^+、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}对酶有抑制作用。几丁质酶水解几丁质的产物是几丁质二糖。

关键词　黄杆菌,几丁质酶,纯化与性质

几丁质是广泛分布于自然界的生物多聚物,含量占第二位,仅次于纤维素。几丁质是构成大多数真菌细胞壁的主要成分,同时也大量存在于昆虫和动物的甲壳中[1]。几丁质酶不仅在海产业如:虾壳、螃蟹壳等的处理上有重要应用价值[2],而且由于微生物和植物几丁质酶在离体条件下对真菌的生长都有抑制作用,近年来获得的转几丁质酶基因植物对真菌、甚至线虫和昆虫都具有抗性[3]。因此,几丁质酶的研究日益受到广泛重视。有关微生物几丁质酶的产生在国外已有不少报道,但有关黄杆菌的产酶情况却知之甚少。本文将报道该酶的纯化及一些基本性质。

1　材料和方法

1.1　材料和试剂

1.1.1　菌种 *Flavobacterium* sp. 由本室筛选获得。

1.1.2　DEAE-纤维素 52、超滤膜 YM30 为 Whatman 产品;Sephadex G-75、Sephacryl 300 为 Phamacia 产品;低分子量标准蛋白为中国科学院上海生物化学研究所产品;几丁质单糖、二糖、三糖及四糖为 Sigma 产品。

1.2　黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)产几丁质酶的培养条件

基本上参照参考文献[4]。

1.3　几丁质酶活力的测定

1.3.1　比色法:参照 Pegg G F[5]的方法,一个活力单位(U)被定义为在 37℃下每小时生成 100μg 几丁质单糖所需的酶量。

本文于 1992 年 7 月 31 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

1.3.2 平板检测法：0.25%几丁质+0.8%琼脂糖+0.002%NaN_3铺板后，将酶液加在平板上，保温后观察有无透明圈。用来定性检测酶纯化过程中各个组分的酶活性。

1.4 蛋白质浓度的测定

考马斯亮兰法[6]。

1.5 蛋白质SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳[7]

1.6 几丁质酶作用方式

将纯化的几丁质酶和粗酶液与几丁质在37℃反应不同时间后的酶解产物进行硅胶薄层层析，展层剂为正丙醇：水：NH_4OH(70：30：1)[4]，显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸[8]。

2 结果

2.1 黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)几丁质酶的纯化

2.1.1 硫酸铵沉淀：将培养上清液加热到50℃保持5分钟后，4℃ 6000r/min(MSE离心机，34115-607转头)离心20分钟，弃沉淀，在上清液中慢慢加入固体$(NH_4)_2SO_4$，使饱和度达65%，4℃静置1—2小时后离心(同上)，弃上清，留沉淀。用25mmol/L pH6.3磷酸钾缓冲液溶解沉淀并进行透析。

2.1.2 DEAE-纤维素柱层析：透析液加到预先用上述缓冲液平衡好的DEAE纤维素柱(2.5×20cm)层析。洗脱时用不含和含有0.3mol/L NaCl上述缓冲液分段洗脱，收集有活性部分。

2.1.3 Sephacryl 300柱层析：将有活性部分用超滤膜YM30进行超滤浓缩，浓缩液进行Sephacryl 300柱(2.5×100cm)层析，用25mmol/L pH6.3磷酸钾缓冲液洗脱，收集活性部分。

2.1.4 Sephadex G-75柱层析：将上述有活性部分的洗脱液超滤浓缩后，浓缩液进行Sephadex G-75(2.5×100cm)柱层析，用25mmol/L pH6.3磷酸钾缓冲液洗脱，收集活性部分。

2.1.5 DEAE-纤维素柱层析：将超滤浓缩的活性部分在25mmol/L pH8.6 Tris-HCl缓冲液中透析，继而上到预先用该缓冲液平衡好的DEAE-纤维素柱(2.5×20cm)层析，收集活性部分。洗脱时分别用不含和含有0.3mol/L NaCl的上述缓冲液分段洗脱。

以上各步骤分离纯化结果见表1。

2.2 *Flavobacterium* sp. 几丁质酶的一些基本性质

2.2.1 纯度和分子量测定：纯化后的几丁质酶经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，呈现单一条带，其大小约45000道尔顿(图1)(在Sephadex G-75柱层析过程中，几丁质酶是经过网状结构而被洗脱的)，国外报道的几丁质酶也是单体酶[9—10]。

2.2.2 pH对几丁质酶活性的影响及酶的酸碱稳定性：几丁质酶分别在广范围缓冲液(pH 3 12)[8]中与几丁质反应后测定酶活力(图2)，结果表明在pH7.0时酶活性最高，pH8.0时仍有70%以上的活性。将酶液与不同pH缓冲液在37℃保温3小时后，加入几丁质，并将pH调回到中性，测定酶的酸碱稳定性(图3)。结果表明在pH5—10范围内酶活性不受影响，pH大于10和小于5时酶活性明显下降。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表1 黄杆菌中几丁质酶的提纯

Table 1 Purification of chitinase from *Flavobacterium* sp.

分离步骤 Purification procedure	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	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude enzyme	540.0	1556.00	2.85	—	100
50℃加热 Heat at 50℃	500.0	1500.00	3.00	1.05	96
DEAE-纤维素(pH6.3)柱层析 Chromatography on DEAE-Cellulose(pH6.3)	227.6	738.08	3.25	1.14	47
Sephacryl 300 凝胶过滤 Gel filtration on Sephacryl 300	106.6	465.87	4.39	1.54	30
Sephadex G-75 凝胶过滤 Gel filtration on Sephadex G-75	70.0	357.92	5.70	2.00	23
DEAE-纤维素(pH8.6)柱层析 Chromatography on DEAE-Cellulose	7.0	330.00	47.15	16.5	21

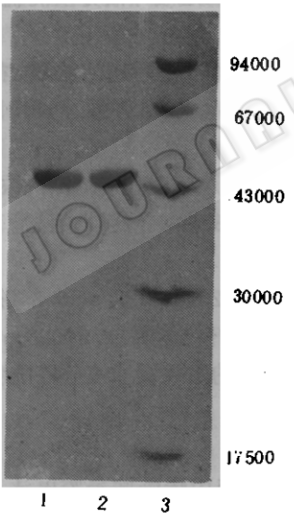

图1 纯化的几丁质酶 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE patern of purified chitinase

1,2. 纯化的几丁质酶 Purified chitinase;

3. 低分子量标准蛋白 Molecular weight markers.

放置30分钟后测酶活力(表2)。Ca^{2+}、Co^{2+}

2.2.3 温度对几丁质酶活性的影响及酶的热稳定性:几丁质酶与底物分别在不同温度下反应后测定酶活性(图4)。在50℃时酶活性最高。把酶液分别在上述不同温度下保温30分钟后,加入几丁质,测定酶的热稳定性(图5)。在60℃时仍有60%的酶活性,高于70℃时酶完全失活。用定性测定酶活性方法测得几丁质酶在4℃和−70℃分别贮存2个月和2年仍然有酶活性。

2.2.4 几丁质浓度对几丁质酶水解速度的影响 Km 的测定:几丁质酶与不同浓度的几丁质反应后测定酶活力,几丁质浓度依次为:0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、和10.0mg/ml。以浓度的倒数1/[s]为横坐标,反应速度的倒数1/[v]为纵坐标作图(图6),测得几丁质酶对几丁质的 Km 为5.0mg/ml。

2.2.5 金属离子对几丁质酶活性的影响:用11种不同金属离子水溶液与等体积几丁质酶混合,使最终离子浓度为5mmol/L,室温下

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

和Cu^{2+}对几丁质酶有激活作用，而Ba^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}和Fe^{3+}等对酶则有抑制作用。

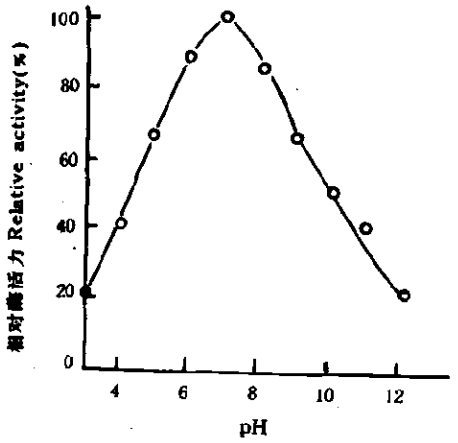

图2　pH 对几丁质酶活性的影响

Fig. 2　Effect of pH on chitinase activity

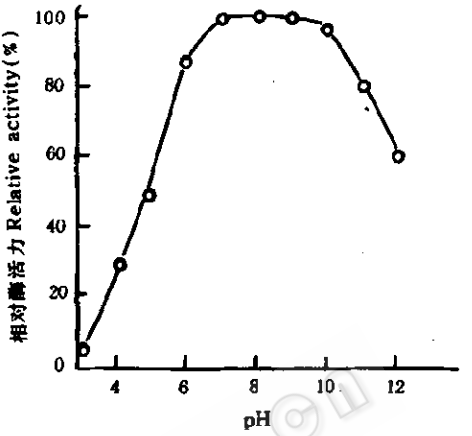

图3　几丁质酶的 pH 稳定性

Fig. 3　Effect of pH on chitinase stability

表2　金属离子对几丁质酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ions on chitinase activity

金属离子 Metal ions	相对活性(%) Relative activity
空白对照	100
NH_4^+	60.22
K^+	67.51
Na^+	87.51
Mn^{2+}	26.55
Ba^{2+}	45.20
Mg^{2+}	51.69
Zn^{2+}	109.03
Co^{2+}	126.55
Ca^{2+}	136.44
Cu^{2+}	140.45
Fe^{3+}	50.87

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

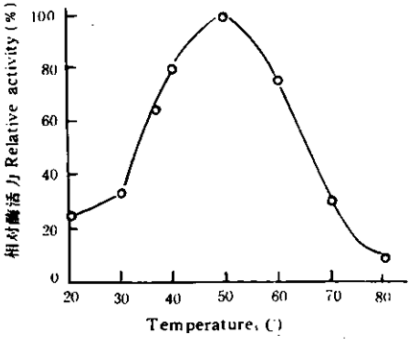

图4 温度对几丁质酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on chitinase activity

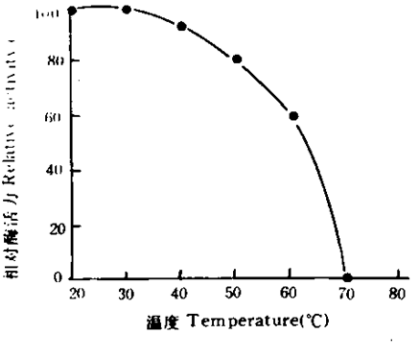

图5 几丁质酶的热稳定性

Fig. 5 Effect of temperature on chitinase stability

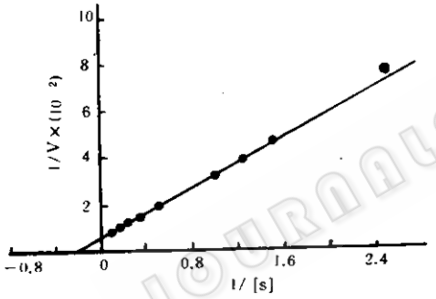

图6 几丁质酶的 Lineweaver Burk 图

Fig. 6 Lineweaver-Burk polts of chitinase

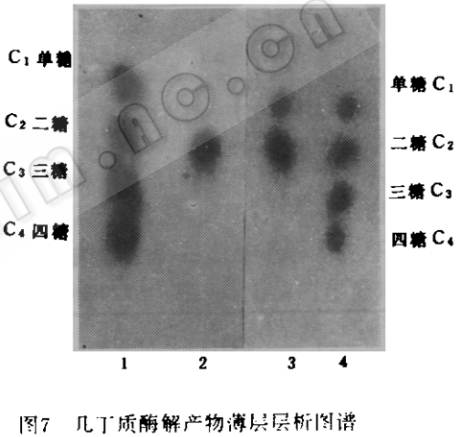

图7 几丁质酶解产物薄层层析图谱

Fig. 7 TLC pattern of enzymatic products of crude enzyme

1,4. 标准几丁质糖(C_1 C_4)Standard sugars(C_1 C_4);

2. 纯酶酶解产物 Enzymatic products of purified enzyme;

3. 粗酶酶解产物 Enzymatic products of crude enzyme.

2.3 水解几丁质的方式

几丁质粗酶和纯酶分别水解几丁质形成的酶解产物，经硅胶薄层层析分析表明，在反应15分钟时就有产物生成。前者生成的产物中有几丁质单糖和二糖，后者只生成二糖(图7)。说明粗酶液中不仅含有几丁质酶，而且也含有几丁质二酶，纯酶只含有几丁质酶。由此可知，*Flavobacterium* sp. 的几丁质酶属于外切酶，与已报道的几种微生物几丁质酶的作用方式相同。

3 讨 论

几丁质酶是一类差异较大的水解酶类，它们的分子量和一些特性因来源不同而有差异。研究最多的是粘质沙雷氏杆菌(*Serratia marcescens*)，它可产生5种不同分子量的几丁

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

质酶：57kD、52kD、48kD、36kD 和21kD[9]。褶皱链霉菌(*Streptomyces plicatus*)有两种几丁质酶，分子量分别为49kD 和69kD[10]。本研究中的黄杆菌也只有单一分子量的几丁质酶。pH 和温度对酶活性的影响基本一致，而对金属离子的反应则有些差异。

参 考 文 献

[1] 黄秀聚. 应用微生物学，1989，3：13—15.

[2] Joshi S *et al*. *Enzyme Microb Technol*，1989，**11**：289—296.

[3] 李思经. 生物技术通讯，1991，6：93.

[4] Roberts W K *et al*. *J G Microbiol*，1988，**134**：169—179.

[5] Pegg G F. *Methods in Enzymology*，1990，**161**：474—479.

[6] Marion M B. *Analytical Biochemistry*，1976，**72**：248—254.

[7] Jean T *et al*. *Analytical Biochemistry*，**178**：362—366.

[8] 朱　俭，等. 基础生物化学. 上海：上海科学技术出版社，1981. 293.

[9] Jonathan D G *et al*. *Mol Gen Genet*，1988，**212**：536—524.

[10] Robb ins P W *et al*. *The Tournal of Biological Chemistry*，1987，**263**(1)：443—447.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF CHITINASE FROM *FLAVOBACTERIUM* SP.

Chen Sanfeng　Li Jilun

(*Beijing Agricultural University*, *Beijing* 100094)

Abstract　A chitinase was isolated from the culture of *Flavobacterium* sp. and purified by means of ammonium sulfate fractionation, column chromatography on DEAE-Cellulose, Sephacryl 300 and Sephadex G-75. The purified chitinase was demonstrated to be homogenous on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight was estimated to be about 45000 by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature for hydrolysis of chitin are 7.0 and 50℃ respectively. Michaelis constant (Km) for chitinase is 5.0 mg/ml. Different metal ions showed adverse effects on the chitinase activity, Ca^{2+}、Co^{2+} and Cu^{2+} increase the chtinase activity, whereas NH_4^+、Ba^{2+}、Mg^{2+} cause inhibition. The enzyme hydrolyses chitin to diacetylchitobiose. It behaves as an exo-chitinase.

Key words　*Flavobacterium* sp.，Chitinase，Purify and properties

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn