

链霉菌 S01 菌株几丁质酶的纯化及性质

杨文博 冯 波* 佟树敏

(南开大学微生物学系 天津 300071)

摘要 由链霉菌(*Streptomyces* sp.) S01 菌株产生的几丁质酶(Chitinase)经硫酸铵盐析、DEAE 纤维素柱层析、Sephadex G-100 柱层析分离纯化后,得到 SDS-PAGE 均一样品。用 SDS-PAGE 测得纯化后的几丁质酶分子量为 41Ku,用 PAGEIEF 测得等电点 PI 为 5.4。酶反应的最适 pH 值为 6.0,最适温度为 50℃,在 pH5.0~9.0、温度 30~50℃时酶活性比较稳定。在相当于 0.1mol/L NaCl 的离子强度下酶活性最高。金属离子中的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶有较强的激活作用,而 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 则有强烈的抑制作用。S01 菌几丁质酶对胶体几丁质的 K_m 及 V_{max} 分别为 $0.91mg \cdot ml^{-1}$ 和 $262.13\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ 。

关键词 几丁质酶,链霉菌 S01 菌株

几丁质(Chitin)是大多数真菌细胞壁和甲壳类动物外骨骼的主要成分。自然界中几丁质的生成量每年约为 100 亿吨左右,仅次于纤维素,占生物聚合物贮量的第 2 位。许多细菌、放线菌和真菌能产生几丁质酶,可以将几丁质分解成几丁质单糖——N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)。其中放线菌被认为是主要的几丁质酶产生菌^[1]。近十几年来,国外对皱折链霉菌(*Streptomyces plicatus*)、灰色链霉菌(*S. griseus*)、拟橄榄绿链霉菌(*S. olivaceoviridis*)和红霉素链霉菌(*S. erythraeus*)等菌株几丁质酶的酶学性质进行了许多研究工作^[2~4,10]。

本文对自行筛选的链霉菌 S01 菌株几丁质酶进行了纯化和酶学性质的检测,与上述已报道的链霉菌几丁质酶相比均有不同程度的差异。

1 材料与方法

1.1 菌种

由本室自土样中分离,初步鉴定为链霉菌(*Streptomyces* sp.),编号为 S01 菌株。

1.2 摇瓶产酶培养基(%)

几丁质(过 60 目样筛)1.5,蛋白胨 0.2,酵母粉 0.2, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, $ZnSO_4$ 0.0001,

pH7.2~7.5 0.15MPa 灭菌 30min。

1.3 摇瓶发酵产酶

500ml 锥形瓶装产酶培养基 50ml, 28℃ 150r/min 往复式摇床振荡培养 7d,收集发酵液。

1.4 试剂

几丁质(购自南开大学高分子研究所), DEAE-纤维素(DE32, Whatman 产品), Sephadex G-100(瑞典进口分装), SDS(电泳纯,日本进口分装),已知分子量标准蛋白质、载体两性电解质(购自中科院上海生化所),其它试剂均为国产分析纯。

1.5 几丁质酶活力测定

参照 Antonio 和 Masaru^[4,5] 方法,在 0.5ml 胶体几丁质^[6]底物中(浓度为 1mg/ml),加入适当稀释的酶液 0.5ml,(底物及酶液均用 pH6.0 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酶缓冲液配制)50℃ 水浴反应 1h,用 DNS 法^[7]测定产生的 NAG 的量,同法以 NAG 绘制标准曲线。酶活力定义为:在上述反应条件下,每分钟释放出 $1\mu g$ 相当 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)的还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力

* 现在工作单位:天津师范大学生物系

1996-05-13 收稿

单位。

1.6 蛋白质测定

Lowry 法^[8]和测定 A_{280} , 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.7 酶的分离和纯化

1.7.1 硫酸铵盐析: 发酵液于 4℃ 10000×g 离心 30min, 上清液经 PEG 20000 浓缩 5~7 倍后, 缓慢加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4℃ 过夜。4℃ 10000×g 离心 30min 收集沉淀, 溶于少量 pH8.0 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液中, 再经同样缓冲液透析。

1.7.2 DEAE-纤维素(DE32)柱层析^[3,10] 透析后酶样品加入到经上述缓冲液平衡过的 DEAE-纤维素层析柱($\phi 1.5 \times 18\text{cm}$)上端, 流速 0.1ml/min, 用该缓冲液洗至 A_{280} 不变, 改用 pH4.0 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液, 流速 0.5ml/min, 洗至 A_{280} 不变, 再用 0.5mol/L NaCl 洗脱, 流速 0.5ml/min。分部收集, 分别测定各管 A_{280} 及酶活力, 合并酶活性峰各管的酶液, 测定合并酶液的蛋白量及酶活力。

1.7.3 Sephadex G-100 柱层析^[11] 上述合并酶液经 PEG 20000 浓缩至 1ml, 对 pH6.0 的 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液透析后, 加至预先用该缓冲液平衡过的 Sephadex G-100 层析柱($\phi 1.3 \times 50\text{cm}$)上端, 用同样的缓冲液洗脱, 流速 0.07ml/min, 分部收集, 分别测定各管 A_{280} 及酶活力, 合并酶活性峰各管的酶液, 测定合并酶液的蛋白量及酶活力。

1.8 酶学性质

1.8.1 酶分子量测定: SDS-PAGE 电泳法^[11]。电泳后用不同蛋白质分子量对数对 R_f 值作图, 求出 S01 菌几丁质酶的分子量。

1.8.2 酶的等电点(pI)测定: 凝胶电聚焦电泳法^[12]。

1.8.3 酶的 K_m 值及 V_{max} 测定^[12] 在 pH6.0 的 0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸缓冲液中, 以胶体几丁质为底物, 用 Lineweaver-Burk 作图法求出该酶对底物的 K_m 值及 V_{max} 。

1.8.4 温度对酶活力的影响: 在不同温度下按常规法测定酶活力。

1.8.5 酶的热稳定性: 酶液在不同温度下保温 30min 后按常规法测定酶活力。

1.8.6 pH 对酶活力的影响: 分别以下列不同 pH 值的缓冲液配制底物和稀释酶液, 按常规法测定酶活力。pH3~8(0.1mol/L Na_2HPO_4 -0.05mol/L 柠檬酸), pH9.0~11.0(0.05mol/L 甘氨酸-NaOH)。

1.8.7 酶的 pH 稳定性^[9] 用上述不同 pH 的缓冲液在 50℃ 下保温 6h 后, 按常规法测定酶活力。

1.8.8 离子强度对酶活力的影响^[10] 在 pH6.0 的 0.01mol/L Na_2HPO_4 -0.005mol/L 柠檬酸缓冲液中加入不同量的 NaCl, 制备出不同离子强度的缓冲液, 用来配制底物和稀释酶液, 分别测定不同 NaCl 浓度中的酶活力。

1.8.9 金属离子对酶活力的影响^[14] 用 $1 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 的各种金属离子溶液(除 AgNO_3 和 PbAc 外, 其它均为金属氯化物)与酶液在 50℃ 保温 30min 后, 以未加金属离子的酶液为对照, 测定酶活力。

2 结果

2.1 S01 菌几丁质酶的分离和纯化

2.1.1 硫酸铵盐析: 发酵液在盐析过程中出现一些上浮物, 经检测无酶活性, 视为杂蛋白, 弃去。加入硫酸铵至 80% 饱和度, 基本上已将酶蛋白沉淀出, 经离心、透析后获得了几丁质酶的粗酶样品。

2.1.2 几丁质酶的柱层析纯化: 粗酶液经 DEAE 纤维素柱层析后出现 3 个峰(图 1)第 1 峰为穿过峰, 蛋白质浓度高, 酶活力低, 主要为杂蛋白。第 2 峰为吸附峰, 酶蛋白集中, 酶活力高。第 3 峰无酶活性, 仍为杂蛋白。收集吸附峰(35~42 管), 进行 Sephadex G-100 柱层析, 洗脱曲线表明(图 2), 主峰中的酶蛋白集中, 酶活力高, 是样品中的几丁质酶。经两次柱层析, 已将 S01 菌的几丁质酶基本纯化。所得样品的比活力为 $10.02 \times 10^3 \text{ u/mg}$,

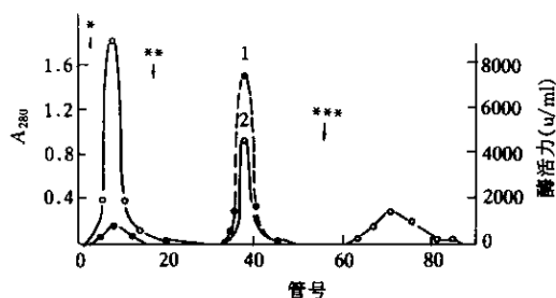


图1 DEAE-纤维素柱层析分离 S01 菌几丁质酶

1. 酶活力 2. A_{280}

* 流速 0.1ml/min, 洗脱液 pH8.0

** 流速 0.5ml/min, 洗脱液 pH4.0

*** 流速 0.5ml/min, 洗脱液 0.5mol/L NaCl

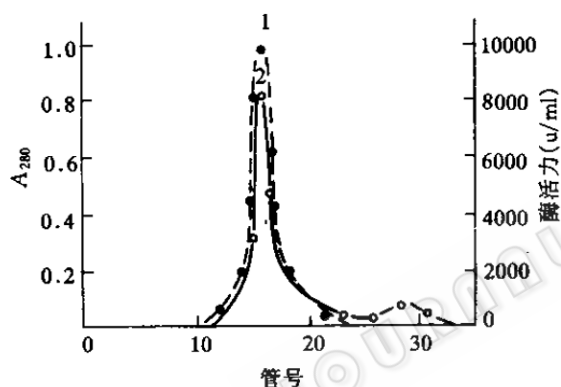


图2 Sephadex G-100 柱层析分离 S01 菌几丁质酶

1. 酶活力 2. A_{280}

收率 10.7%，提纯了 12 倍。各步提纯结果列于表 1。

表 1 S01 菌几丁质酶的各步进纯结果

提纯步骤	总酶活力 ($\times 10^3$ u)	总蛋白 量 (mg)	比活 ($\frac{u}{mg}$) ($\times 10^3$)	收率 (%)	提纯 倍数
S01 发酵上清液	411.3	489.6	0.84	100	1.0
硫酸分级盐析	244.3	121.5	2.01	59.4	2.4
DEAE-纤维素 柱层析	87.19	13.2	6.6	21.2	7.8
Sephadex G-100 柱层析	44.01	4.4	10.02	10.7	12.0

2.2 S01 菌几丁质酶的酶学性质

2.2.1 酶的分子量: 经 SDS-PAGE 电泳后, 从图 3 可以看出, 酶蛋白呈一条蛋白带, 表明 S01 菌的几丁质酶为单一组分。用标准的不同蛋白质分子量对数对 Rf 值作图, 求出酶样品的分子量为 41 Ku。

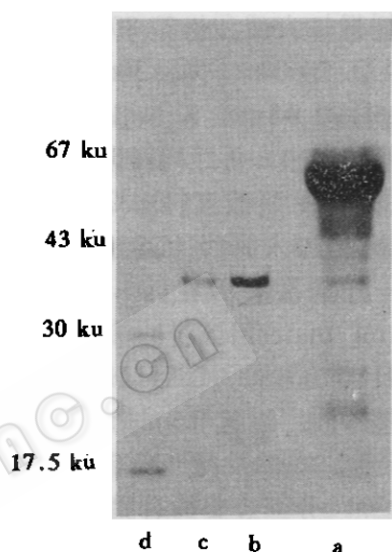


图3 S01 菌几丁质酶纯化的 SDS-PAGE 结果

a. S01 菌发酵液经硫酸盐析后的粗提蛋白

b. 经 DEAE-纤维素柱层析提纯后的 S01 菌几丁质酶

c. 经 Sephadex G-100 柱层析提纯后的 S01 菌几丁质酶

d. 标准分子量蛋白: 67Ku 牛血清白蛋白, 43Ku 肌动蛋白, 30Ku 碳酸酐酶, 17.5Ku TMV 外壳蛋白

2.2.2 酶的等电点: 用凝胶电聚焦电泳法测得 S01 菌几丁质酶的等电点 pI 为 5.4。

2.2.3 酶的动力学常数: 用 Lineweaver-Burk 作图法求得 S01 菌几丁质酶对胶体几丁质的 K_m 值为 0.91mg/ml, V_{max} 为 262.13 μ mol $\cdot$ min $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$ 。

2.2.4 温度对酶活力及其稳定性的影响: 结果表明(图 4), 酶的最适反应温度为 50 $^{\circ}$ C, 经 30 ~ 90 $^{\circ}$ C 梯度保温 30min 后, 30 ~ 50 $^{\circ}$ C 酶的稳定性最佳。随温度升高, 酶失活严重, 超过 70 $^{\circ}$ C 几乎完全失活, 说明该酶对高温敏感。

2.2.5 pH 对酶活力及其稳定性的影响: 试验结果表明, 酶的最适 pH 为 6.0, pH 高于 6 时

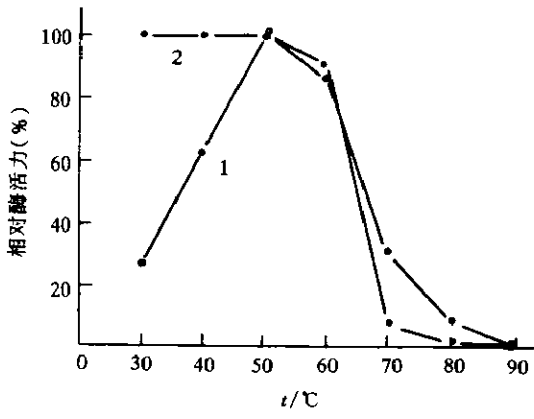


图 4 温度对 S01 菌几丁质酶活力及稳定性的影响

1. 酶活力 2. 酶稳定性

酶活力开始下降。pH 低于 4 时酶完全失活。在 pH5 ~ 9 之间有较好的稳定性。基于本实验是在不同 pH 值的缓冲液中经 50℃ 保温 6h 再进行测定, 在 pH8 ~ 10 之间仍可保持 72 ~ 51% 的酶活力, 表明 S01 菌几丁质酶对碱性环境条件有较强的耐受性。

2.2.6 离子强度对酶活力的影响: 在 NaCl 浓度为 0.1mol /L 时, 酶活力保持不变(与对照相同)。随着离子强度增加, 酶活力呈递减趋势, 但在 0.8mol /L NaCl 的环境中仍可保持 60% 的酶活力, 说明该酶对高浓度的 NaCl 有较强的耐受性。

2.2.7 金属离子对酶活力的影响: 表 2 结果表明, Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 对酶活力有比较明显的激活作用, 比对照提高了 50% 左右, 而 Fe³⁺ 和 Hg⁺ 对酶有较强的抑制作用。

表 2 金属离子对 S01 菌几丁质酶活力的影响

金属离子 (1 × 10 ⁻³ mol /L)	酶活力 (u /L)	金属离子 (1 × 10 ⁻³ mol /L)	酶活力 (u /L)
Na ⁺	1758	CO ²⁺	2340
Mg ²⁺	2787	Ni ²⁺	2267
Al ³⁺	1539	Ba ²⁺	2215
K ⁺	2527	Pb ²⁺	1532
Ca ²⁺	2725	Mn ²⁺	2608
Cu ²⁺	1737	Ag ⁺	1453
Zn ²⁺	2132	Hg ⁺	988
Fe ²⁺	2090	对照	1809
Fe ³⁺	364		

3 讨论

许多文献已报道了链霉菌属中的红霉素链霉菌、灰色链霉菌、皱褶链霉菌、拟橄榄绿链霉菌、链霉菌 S-84 菌株可以产生不同酶学性质的几丁质酶。本文报道的链霉菌 S01 菌株的几丁质酶, 与上述菌株的几丁质酶相比较, 在酶的组分、酶分子量、等电点及酶反应的最适 pH 值等方面均有差异。S01 菌几丁质酶的分子量、等电点和酶反应的最适 pH 值与 Hideto 等人报道的链霉菌 S-84 菌株几丁质酶^[1]较为接近。

已有报道几丁质酶在制取具有抗癌功效的氨基寡糖素、抗植物病原真菌感染、克隆几丁质酶基因构建抗病虫害的转基因植物以及几丁质废料的酶法处理等方面具有重要的应用价值^[14]。我们的研究工作旨在利用产几丁质酶的 S01 菌及其离体的几丁质酶进行植物病原真菌病害的防治, 有关的实验结果将另文报道。

参 考 文 献

[1] Hideto U, Kiyotaka M, Yasuo, *et al.* J Gen. Appl Microbiol, 1990, 36: 377 ~ 392.

[2] Robert B T, Anthony L T, Georgina E, *et al.* J Biol Chem, 1979, 254(19): 9708 ~ 9713.

[3] Anthony L T, Frank M. J Biol Chem, 1974, 249(3): 811 ~ 817.

[4] Antonio R, Ulrich M, Roland B, *et al.* J Bacteriol, 1992, 174(11): 3450 ~ 3454.

[5] Masaru M, Akira O, Tarno F, *et al.* Agric Biol Chem, 1990, 54(4): 871 ~ 877.

[6] 黄秀梨, 项伯衡. 北京师范大学学报, 1981, 2: 91 ~ 94.

[7] 朱 俭, 曹凯鸣, 周润琪等. 生物化学实验, 上海: 上海科学技术出版社, 1981, 1 ~ 4.

[8] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 262 ~ 275.

[9] 黄秀梨, 荣 倩, 黄德君. 北京师范大学学报(自然科学版)1987, 4: 76 ~ 80.

[10] Saburo H, Yoshitaka Y, Yoto F, *et al.* J Biochem. 1989, 105: 484 ~ 489.

[11] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1981, 112 ~ 119, 124 ~ 132, 166 ~ 168.

[12] 张树政主编. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987,

42 ~ 54, 195 ~ 200.

(2): 115 ~ 121.

[13] 田新玉, 徐毅, 马延和等. 微生物学报, 1993, 33

[14] 陈三凤, 李季伦. 微生物学报, 1993, 20(3): 156 ~ 160.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF CHITINASE FROM *STREPTOMYCES* SP. S01

Yang Wenbo Feng Bo Tong Shumin

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The chitinase produced by *Streptomyces* sp. S01 was purified to SDS-PAGE homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, and Sephadex G-100 column gel filtration. Molecular weight and pI value of the chitinase were 41Ku and 5.4 when they were determined by the methods of SDS-PAGE and PAGEIEF. The optimum pH and temperature were 6.0 and 50 °C. The enzyme activity was stable in the pH range of 5.0 ~ 9.0 and temperature range of 30 ~ 50 °C. The highest enzyme activity could be obtained in the ionic strength that corresponded to 0.1mol /L NaCl solution.

The enzyme activity was enhanced by Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , and was strongly inhibited by Fe^{3+} , Hg^{2+} . When colloidal chitin was used as substrate, the Michaelis constant (K_m) and Maximum velocity ($V_{\max}$) of chitinase from S01 strain were $0.91\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $262.13 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectively.

Key words *Streptomyces* sp. S01 strain, Chitinase, Isolation and purification