

一种耐热几丁质酶的产生及其稳定性研究

郭润芳^{1*} 史小琴² 李多川³ 魏 青¹ 贾英民¹

(1. 河北农业大学食品学院生物工程系 保定 071000)

(2. 河北大学医学院 保定 071001)

(3. 山东农业大学环境生物系 泰安 271018)

摘要: 疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)SY2 在以胶状几丁质为唯一碳源的诱导培养基中产生了胞外几丁质酶。该酶在 50℃保温 1 h, 酶活稳定; 65℃时半衰期为 25 min; 酶液在室温下保存到 12 周, 残余酶活性为 45% 左右。该酶有较宽的 pH 范围, 3.0~9.0 之间保持稳定, pH 值为 2.5 时, 仍具有 70% 的剩余酶活性。Ca²⁺ 对几丁质酶的活性有显著的激活作用; 高浓度变性剂对酶有抑制作用。结果表明该酶是一种热稳定性高且耐酸碱的新型几丁质酶, 能在酸性和高温环境中发挥作用, 这些特性赋予了 *T. lanuginosus* 几丁质酶在几丁质的生物转化及其它生物技术中极大的应用优势。

关键词: 几丁质酶, 疏绵状嗜热丝孢菌, 嗜热真菌, 货架稳定性

Production and Stability of a Thermostable Chitinase

GUO Run-Fang^{1*} SHI Xiao-Qin² LI Duo-Chuan³ WEI Qing¹ JIA Ying-Min¹

(1. Department of Bioengineering, Hebei Agricultural University, Baoding 071000)

(2. Medical College of Hebei University, Baoding 071000)

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

Abstract: An extracellular chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 was produced when SY2 was grown in mineral liquid medium containing colloidal chitin as the only carbon source. The chitinase was stable at 50℃ for 1h, and the half-life time of the enzyme at 65℃ was 25 min. when it was kept at room temperature for 12 week, the chitinase activity was retained about 45% activity. The pH stability was kept in the range 3.0-9.0, and the enzyme was able to obtain 70% of the full activity, when the enzyme was incubated in the buffer (pH 2.5). The chitinase activity was enhanced obviously by metal ion Ca²⁺, but inhibited under the high content chemical reagents. The results suggested that the chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 was a novel enzyme due to its high activity and stability under the high temperature and acid environment, which make it applicable for biotransformation and other biotechnological purposes.

Keywords: Chitinase, *Thermomyces lanuginosus*, Thermophilic fungi, Shelf-life stability

几丁质, 又称甲壳素, 是自然界贮量仅次于纤维素的生物多聚体^[1], 主要分布在昆虫表皮、真

菌细胞壁、以及虾、蟹壳废弃物中^[2,3]。几丁质酶(EC3.2.1.14), 催化几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖

基金项目: 河北农业大学博士基金和河北省科技发展计划项目(No. 06220106D)资助

* 通讯作者: ✉: runfangg@163.com

收稿日期: 2007-09-18; 接受日期: 2007-12-20

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

单体或低分子量的几丁寡糖的水解酶。几丁寡糖因具有多种生物活性被誉为“生命第六要素”,已经在医药、食品、农业、环保等领域引起极大关注^[4]。我国海岸线漫长,虾蟹资源非常丰富,因此寻找一种高降解活性的、耐热、耐酸碱的几丁质酶,对于几丁质废弃资源的再生利用及生产高附加值产品有着非常深远的现实意义。

目前已有一些分离热稳定性几丁质酶的报道,比如从极端耐热古细菌 *Thermococcus chitonophagus*、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 以及细菌 *Bacillus* BG-11、*Streptomyces* OPC520 等^[5-7]中分离到热稳定几丁质酶,但这些细菌来源的几丁质酶偏碱性,在低 pH 环境下较不稳定。而虾蟹壳几丁质在酶解之前,要经过酸碱处理,这就要求几丁质酶要具备耐热、耐酸碱等多种特性。本研究从嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* SY2 菌株中分离到一种新型的几丁质酶,对其液体发酵产酶条件进行了初步研究,并探讨了这种新型几丁质酶的温度、pH 值、金属离子、变性剂、货架期等方面的稳定性,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 菌株来源及鉴定

疏绵状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*) SY2 菌株从海南三亚采集的土样中分离所得。培养分离的具体步骤参照 Cooney & Emerson 的方法^[8],菌株的鉴定依据已发表和出版的嗜热真菌文献和专著^[8,9]。菌株保藏于河北农业大学酶工程实验室。

1.2 培养基

液体诱导培养基: K_2HPO_4 870 mg, KH_2PO_4 680 mg, KCl 200 mg, $MgSO_4$ 200 mg, 4 g 酵母, 750 mL 蒸馏水, 250 mL 自来水, 25 g 胶体几丁质, 1 g 氮源(氮源由以下相应的实验确定), 103.5 kPa 下灭菌 30 min。

1.3 酶活性和蛋白含量测定

酶活性测定用 DNS 法^[10], 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。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[11], 以牛血清白蛋白为标准蛋白测定。

1.4 产酶条件研究

1.4.1 初始氮源对产酶的影响: 疏绵状嗜热丝孢菌 SY2 分别接种于不同氮源(0.1%)的液体诱导培养基

中,在水浴恒温摇床 (120 r/min, 50℃)上恒温培养 6 d 后,标准条件下检测几丁质酶的活性。所用氮源分别为尿素、蛋白胨、 $NaNO_3$ 、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 。

1.4.2 初始底物浓度对产酶的影响: 疏绵状嗜热丝孢菌 SY2 分别接种于含有不同浓度胶态几丁质 (0.5%~2.5%)的液体诱导培养基中,在水浴恒温摇床 (120 r/min, 50℃)上恒温培养 6 d 后,标准条件下检测几丁质酶的活性。

1.4.3 初始 pH 值对产酶的影响: 疏绵状嗜热丝孢菌 SY2 分别接种于不同 pH 值的液体诱导培养基中,在水浴恒温摇床 (120 r/min, 50℃)上恒温培养 6 d 后,标准条件下检测几丁质酶的活性。

1.4.4 产酶的时间谱: 在确定的最佳培养条件下培养疏绵状嗜热丝孢菌,从培养的第 2 天起,每天定时取样,至培养的第 13 天为止,标准条件下测定其酶活性,以时间对光吸收值作 Time-course 曲线。

1.5 酶的提取及纯化

SY2 在诱导培养 7 d 后, 4℃ 8000 r/min 离心,收集上清液,即得粗酶。将所提取的粗酶液进行 85% 饱和硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose 阴离子交换柱层析、Phenyl-Sepharose 疏水柱层析,收集具有酶活性的洗脱液组分,进行酶稳定性研究。

1.6 几丁质酶稳定性研究

1.6.1 几丁质酶的温度、pH 值稳定性: 将酶液在不同的温度下 (55℃、60℃、65℃、70℃) 分别保温 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 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热稳定性的指标。

将适量酶液与不同 pH 缓冲液在 50℃ 下预处理 1 h 后,调整 pH 为 5.0,标准条件下测酶活,以剩余的酶活性作为评价酶 pH 稳定性的指标。

1.6.2 金属离子和化学变性剂对酶活性的影响: 在酶与底物的反应体系中,加入不同的金属离子(其终浓度为 50 mmol/L),以及不同浓度的变性剂和蛋白酶抑制剂,以不加任何试剂的酶活为 100%,检测其剩余酶活。

1.6.3 几丁质酶的货架稳定性: 实验方法参照文献^[7]。将酶液保存在 KCl (15%, W/V) 中维持无菌条件以阻止微生物的生长,分别置于室温 (25℃~30℃) 和冰箱条件 (0℃~4℃) 下,12 周内定期取样,标准条件下检测酶剩余活性,以评价几丁质酶的货架稳定性。

2 结果与分析

2.1 疏绵状嗜热丝孢菌 SY2 菌株分离鉴定

PDA 上菌落生长迅速, 初为白色絮状, 渐变成绿灰, 最后黑色。菌丝无色, 分隔, 直径 $1.5\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$, 产孢细胞为膨大的柄细胞, 长 $10\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m}$, 垂直侧生, 具隔膜, 多不分枝。分生孢子单生, 球形, 直径 $6\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$, 壁厚, 幼时光滑, 无色, 成熟后表面有雕纹, 黑棕色; 易从产孢细胞上脱落, 脱落时常带有一段很短的小柄。依据菌落形态与显微特征描述(图 1), 参考已出版的嗜热真菌文献和专著鉴定为疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)。

2.2 几丁质酶产生的最佳培养条件

几丁质酶是一种诱导酶, 几丁质或其衍生物可以充当诱导物^[4], 已报道的大多数细菌、真菌都是以胶体几丁质为唯一碳源诱导产生几丁质酶^[12, 13]。本试验以过量的几丁质底物诱导培养来探索不同氮源对产酶的影响, 结果发现, 添加 0.1% NH_4NO_3 产酶最高, 而 NaNO_3 次之, 再次为尿素、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 这说明硝态氮对产酶有利。

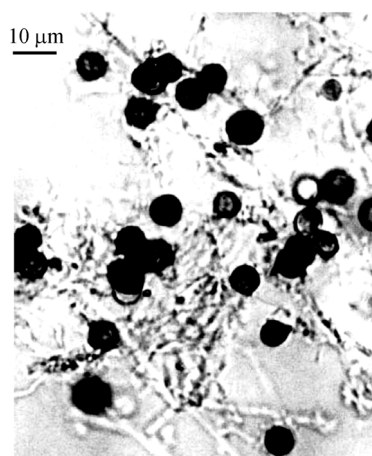


图 1 疏绵状嗜热丝孢菌显微特征

Fig. 1 Micro-features of *Thermomyces lanuginosus*

以 NH_4NO_3 为氮源, 不同初始底物浓度对产酶的影响结果见图 2。在一定范围内, 酶活随底物浓度增大而提高, 当底物浓度达 1.5% , 酶活最高, 之后尽管底物浓度增高, 但酶活没有显著变化, 综合考虑选定 1.5% 的胶体几丁质为最佳底物初始浓度。初始 pH 值对产酶也有较大影响, 研究结果发现, 初

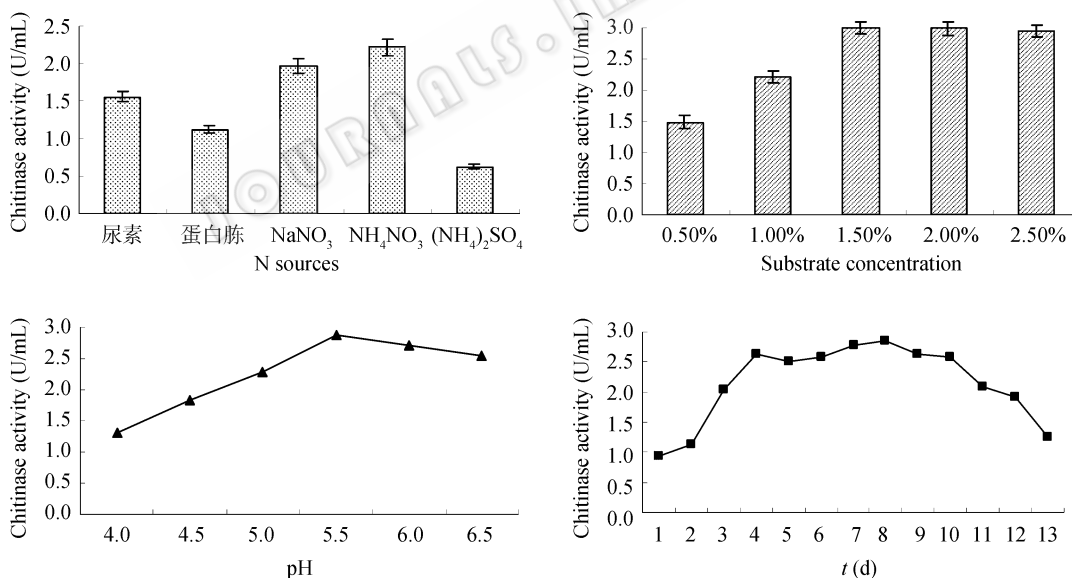


图 2 *T. lanuginosus* 胞外几丁质酶的产生

Fig. 2 Production of extracellular chitinase from *T. lanuginosus*

始 pH 值为 5.5 时产酶活力最高。

在以 0.1% NH_4NO_3 为氮源、 1.5% 胶体几丁质为唯一碳源、初始 pH 值为 5.5 的条件下诱导培养 *T. lanuginosus* SY2 菌株。定时取样检测酶活力。在最适条件下摇瓶培养 $4\ \text{d}$ 后, 几丁质酶活性急剧升

高, 达 $2.8\ \text{U/mL}$; 之后酶活保持稳定, 到第 10 天酶活急剧下降。

2.3 几丁质酶的最适作用温度、pH 值及其稳定性
热稳定几丁质酶因在高温下的高催化活力而显示出巨大的工业应用优势^[1]。通常, 几丁质废物的生

物转化过程中温度要升高, Sutrisno 等^[14]报道几丁质的工业加工过程要求的温度在 50℃~60℃ 范围内。本实验中获得的几丁质酶在 55℃ 表现出最佳反应活性, 这对于废弃几丁质的生物转化是非常有利的, 而且该酶在 55℃ 条件下稳定; 60℃ 时酶活损失不大, 在此温度下保持 60 min 后, 仍具 85% 的原酶活性; 65℃ 的半衰期为 25 min; 70℃ 保温 20 min, 还有 24% 的原酶活性(图 3)。而来自中温菌 *Aspergillus fumigatus* 的几丁质酶在 45℃ 以下是稳定的, 55℃ 保温 1 h,

酶活性损失 30%^[12]。因此该几丁质酶比中温菌几丁质酶的热稳定性高 5℃~15℃, 说明该酶具有较高的热稳定性。

在不同的 pH 值缓冲液中检测酶活性, 结果显示该几丁质酶的最适反应 pH 值为 4.5。在 pH 3.0~9.0 之间 *Thermomyces lanuginosus* 几丁质酶较稳定, 即使在 pH 值为 2.5 时, 仍具有 70% 的剩余酶活性。结果表明几丁质酶的酸碱范围很广, 可以在酸性环境中发挥作用。

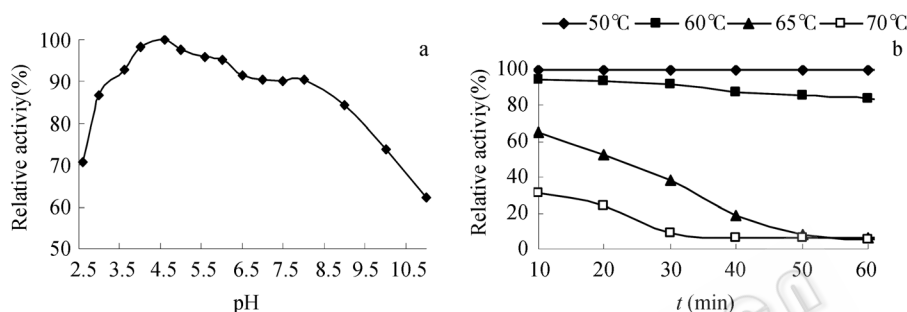


图 3 *T. lanuginosus* 几丁质酶的 pH 稳定性(a)和热稳定性(b)
Fig. 3 pH (a) and temperature (b) stabilities of *T. lanuginosus* chitinase

2.4 不同金属离子和变性剂对酶活性的影响

金属离子和变性剂对几丁质酶活性的影响见表 1。Ca²⁺、Ba²⁺、Na⁺、K⁺对酶有激活作用, 尤其是 Ca²⁺大大促进了几丁质酶的活性, 相对活性高达 170%; 而一些重金属离子如 Ag⁺、Hg²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺对酶有显著的抑制作用。

在酶与底物的反应体系中加入不同浓度的变性剂和蛋白酶抑制剂后, 几丁质酶活性受到不同程度的抑制。EDTA 对几丁质酶活性的抑制作用最强, 在 1 mmol/L 的低浓度下, 仅保留 44.28% 的相对酶活性, 在 10 mmol/L 的浓度下, 几乎丧失酶活性。EDTA 对金属离子有螯合作用, 这也间接说明几丁质酶活性依赖于金属离子。而其它化学试剂在高浓度下有抑制作用, 低浓度下影响不大。

2.5 几丁质酶的货架期

几丁质酶的货架稳定性见图 4。加入 15% (W/V) KCl 的几丁质酶液在 4℃ 保存 8 周, 酶活性仍具 100%, 8 周以后酶活性有所下降, 到 12 周仍具 85% 的酶活性; 而不加任何保护剂的酶液在 4 周后活性开始降低, 但降低幅度不大, 到 12 周后, 酶活性损失近 25%。在室温下保存的酶液, 随着保存时间

表 1 金属离子和化学试剂对几丁质酶活性的影响
Table 1 Effects of metal ions and chemical reagents on *T. lanuginosus* chitinase

Metal ions and reagents	Concentration	Relative activity (%)
H ₂ O	50 mmol/L	100
Ca ²⁺	50 mmol/L	170
Mg ²⁺	50 mmol/L	70.9
Ba ²⁺	50 mmol/L	128.9
Cu ²⁺	50 mmol/L	4.97
Zn ²⁺	50 mmol/L	39.5
Fe ²⁺	50 mmol/L	15.5
Mn ²⁺	50 mmol/L	50.9
Ag ⁺	50 mmol/L	0
Hg ²⁺	50 mmol/L	1.32
Na ⁺	50 mmol/L	145.6
K ⁺	50 mmol/L	130.4
Urea	0.5 mol/L	94.45
Urea	3.0 mol/L	52.29
SDS	0.1% (W/V)	97.99
SDS	1% (W/V)	73.38
EDTA	1.0 mmol/L	44.28
EDTA	10 mmol/L	23.91
PMSF	1.0 mmol/L	99.12
PMSF	10 mmol/L	55.65
HS ⁻	1.0 mmol/L	89.61
HS ⁻	10 mmol/L	37.61

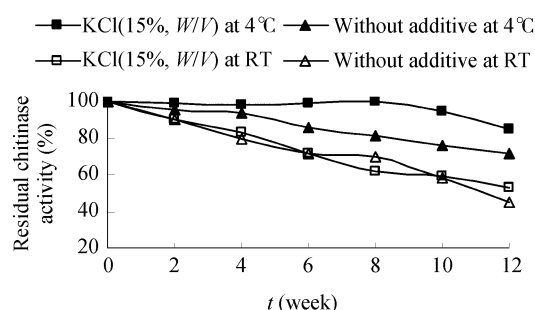


图4 *T. lanuginosus* 几丁质酶的货架稳定性
Fig. 4 Shelf-life stability of *T. lanuginosus* chitinase

的延长, 酶活性呈下降趋势, 8 周后剩余酶活性达 60%, 到 12 周酶活性剩 45% 左右, 说明该酶的货架稳定性高, 这对几丁质酶的储运、应用非常重要。从结果中还可以发现, 酶液中加入保护剂可以稳定酶的活性, 这可能与防止杂菌生长, 减少蛋白酶对几丁质酶的降解有关。Bhushan 也报道 *Bacillus* BG-11 产生的碱性几丁质酶在添加甘油或叠氮化钠后, 要比未添加任何稳定剂和保护剂的对照酶液保存期长。

3 讨论

许多微生物都能产几丁质酶, 但大多因菌株的产酶能力太低, 且不稳定, 因而失去了实际应用价值。许多研究人员一方面在筛选产酶活力高、稳定、潜力大的优良菌株, 另一方面通过诱变或基因工程的手段改造产酶菌株, 从而提高微生物菌株产几丁质酶的能力与产酶水平。本实验中以嗜热真菌 *T. lanuginosus* SY2 为材料, 研究了其产酶条件和酶的稳定性。在以 0.1% NH_4NO_3 为氮源、1.5% 胶体几丁质、最佳初始 pH 值为 5.5 的条件下, 50℃ 摇瓶培养 4 d 后, 几丁质酶活性急剧升高, 达 2.8 U/mL。与其他产几丁质酶的微生物相比, 产酶活力相当, 离几丁质酶的工业化生产仍有一定的差距。

尽管来源 *Thermomyces lanuginosus* SY2 的几丁质酶酶活相对较低, 但它具有独特的酶学特性, 表现出了对热、pH 值的稳定性。它的最适反应温度和 pH 分别为 55℃ 和 4.5, 该酶 60℃ 以下保持稳定; 室温条件下保存 8 周, 酶活仅损失 15%。另外, 在 pH 为 3.0~9.0 的范围内仍保持相对稳定的酶活性, 因此该酶是一种热稳定性高且耐酸的新型几丁质酶, 能在酸性和高温环境中发挥作用。 *T. lanuginosus* 几丁质酶的独特性质将赋予它在几丁质废物的生物转化及其它生物技术中有极大的应用优势。我们将通过

基因工程的手段, 对该基因进行改造, 并实现异源高效表达, 以期获得优良的生物工程菌株。

参考文献

- [1] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 2003, **89**(1): 17–34.
- [2] Nwe N, Stevens W. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**(2): 131–134.
- [3] Suntornsuk W, Pochanakanich P, Suntornsuk L. Fungal chitosan production on food processing by-products. *Proc Biochem*, 2002, **37**(7): 727–729.
- [4] Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **26**(7): 473–483.
- [5] Andronopoulou E, Vorgias CE. 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] Cooney DG, Emerson R. Thermophilic Fungi: An account of their biology, activities and classification. San Francisco: W H Freeman & Co, 1964, pp. 272–421.
- [9] Tsiklinsky P. *Thermomyces lanuginosus*. *Ann Inst Pasteur Paris*, 1899, **13**(4): 500–505.
- [10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**(3): 426–428.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1): 248–259.
- [12] Xia GQ, Jin CS, Zhou J, et al. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(14): 4079–4085.
- [13] Awani, NN, Kapadnis BP, Das AD, et al. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J Appl Microbiol*, 2002, **93**(6): 965–975.
- [14] Sutrisno A, Ueda M, Abe Y, et al. A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, moderately thermophilic, chitin-degrading bacterium *Ralstonia* sp. A-471. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**(4): 398–406.