

单胞菌产几丁质酶的酶学性质研究

姚祥春, 金伟军, 张礼星, 钟卫鸿

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032)

摘要: 对从海水中分离得到的嗜水气单胞菌所产的几丁质酶的酶学性质进行研究。其最适 pH 为 7.0 左右, 最适反应温度为 45 °C 左右。在 40 °C 以下有良好的热稳定性, 12 h 仍有 50% 残余酶活。Mg²⁺ 对酶有激活作用, Cu²⁺ 和 Al³⁺ 对酶有明显的抑制作用。该酶对底物的亲和力很大, 水解几丁质的 K_m 值为 29.15 g/L。

关键词: 嗜水气单胞菌; 几丁质酶; 酶学性质

中图分类号: Q814; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0227-03

Enzymatic Characteristics of Chitinase Produced by *Aeromonas hydrophila*

YAO Xiang-chun, JIN Wei-jun, ZHANG Li-xing, ZHONG Wei-hong

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: A chitinase-producing bacteria, isolated from sea water, was identified as *Aeromonas hydrophila*. The characteristics of purified chitinase from fermented broth by ammonium sulfate fractionation and dialysis were studied. Its optimal pH value and temperature were 7.0 and 45 °C, respectively, using colloid chitin as substrate. The chitinase showed high thermal stability, with a residue activity of 50% remained after incubation of the enzyme in water for 12 h at 40 °C. Metal ions had different effects on the chitinase activity which could be improved by Mg²⁺, but obviously inhibited by Cu²⁺ and Al³⁺. Its Michaelis constant K_m in the hydrolysis of chitin was 29.15 g/L, indicating that the chitinase possessed high substrate affinity.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; chitinase; characteristics

几丁质是以 β-1,4 糖苷键连接起来的直链多聚物, 广泛分布于自然界^[1]。它大量存在于节肢动物、线虫和软体动物的甲壳、昆虫的肠道, 以及部分藻类和真菌的细胞壁中。几丁质的合成依赖于几丁质合成酶, 而几丁质的降解需要几丁质酶。几丁质的合成和降解过程贯穿于很多生物体的生命周期。几丁质酶不仅在许多生物体的生命期中, 比如在节肢动物的形态发生期^[2]、酵母及其它真菌的细胞分裂期和出芽期^[3], 都起着重要作用, 而且在免疫条件方面也发挥着重要作用; 例如, 植物产生抗菌蛋白 (PRP) 时, 几丁质酶会被诱导产生^[4]。

1905年Benecke^[5]首次分离和研究能利用几丁质作为营养物的微生物, 并定名为 *Bacillus chitinovrous*。Folpmers (1921) 发现利用几丁质的细菌和真菌在几丁质平板上形成水解圈, 并以此来证明几丁质酶的存在

收稿日期: 2007-10-31

作者简介: 姚祥春 (1982-), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事微生物和生物化工等方面的研究

通讯作者: 张礼星副教授

在。目前, 产生几丁质酶的微生物包括细菌、真菌和放线菌。该酶是一种几丁质诱导酶, 大多是胞外分泌型。不同微生物所产生的几丁质酶的酶学性质不尽相同。本文对嗜水气单胞菌所产的几丁质酶的酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

菌种由本实验室从海水中筛选得到, 并鉴定为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[6]。几丁质购自上海伯奥生物科技有限公司。其它试剂均为分析纯。胶体几丁质制备参考文献^[7]。

1.1.2 培养基

平板培养基(g/L): 几丁质 2.0, 酵母膏 2.0, MgSO₄ 0.3, K₂HPO₄ 0.7, 琼脂 18, pH 7.0。种子培养基配方同上, 不添加琼脂。

发酵产酶培养基(g/L): 几丁质 10.0, 蛋白胨 10.0, 尿素 2.0, MgSO₄ 0.3, K₂HPO₄ 0.3, NaCl 16, pH 6.5。

1.2 实验方法

1.2.1 几丁质酶测定方法及酶活定义

采用 DNS 比色法测还原糖。在已预热的 0.5 mL 2% 的胶体几丁质和 0.5 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中加入 0.5 mL 酶液, 于 45 °C 温育 1 h 后沸水浴保持 2 min, 中止反应后加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水中保持 5 min, 冷却至室温, 用蒸馏水定容到 25 mL, 摇匀; 离心后取上清, 在波长 500 nm 下测吸光度, 以灭活的等量酶液作空白对照。酶活定义为 45 °C 下 1 min 转化底物胶体几丁质产生 1 μmol 还原糖所需的酶量规定为 1 个活力单位(U)。

1.2.2 粗酶液的制备

500 mL 三角瓶装产酶培养基 70 mL, 按 6% 接种量接入种子, 在 28 °C、200 r/min 震荡培养 3 d, 收集发酵液。将发酵液离心 (12000 r/min, 4 °C, 15 min), 在冰浴中加入硫酸铵至 60% 饱和度, 于 4 °C 下静置过夜, 离心收集沉淀物。加适量缓冲液于沉淀物中, 搅拌均匀后, 透析。酶液于 4 °C 下保存。

2 结果与分析

2.1 动力学常数 Km

用 Lineweaver-Burk 作图法求得该酶对胶体几丁质的 Km 值为 29.15 g/L, 并根据截距计算得到 Vmax 为 0.5774 g/ (L·min), 见图 1。

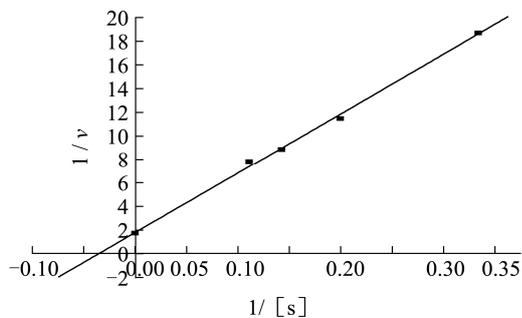


图 1 几丁质酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.1 Lineweaver-Burk plot of chitinase

2.2 酶的热稳定性和最适反应温度

将酶液分装于离心管中, 分别在 20 °C、35 °C、45 °C、55 °C 和 65 °C 水浴中温育。每隔 30 min 取样, 迅速冷却。在 45 °C 测定残余酶活, 结果见图 2。结果表明, 该酶的最适反应温度为 45 °C 左右。

将酶反应体系在 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、65 °C 和 75 °C 九个不同温度下测定酶活, 结果见图 3。结果表明, 在 25 °C、30 °C、35 °C 和 40 °C 时酶活下降得比较慢, 在前 3 h 基本没有变化, 经过 12 h 之后仍有 50% 的残余酶活。45 °C 时, 在前 2 h 酶

活变化不大, 但随着保温时间延长, 酶失活很快, 7.0 h 后残余酶活为 0。在更高的温度下, 如 50 °C、55 °C、65 °C 和 75 °C 时, 酶很快失活, 说明当温度超过 50 °C 时, 该酶极易变性。

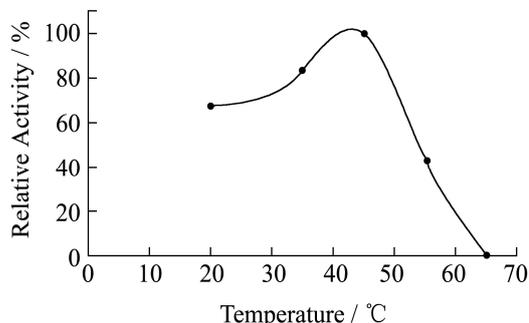


图 2 温度对几丁质酶活的影响

Fig.2 Effects of temperature on the activity of chitinase

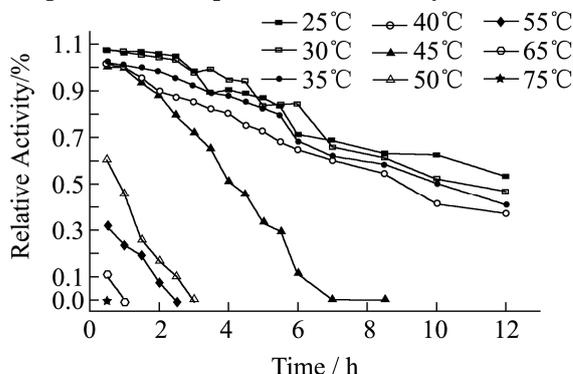


图 3 几丁质酶在不同温度的稳定性

Fig.3 The chitinase stability of temperature

2.3 酶的 pH 稳定性和最适反应 pH

将酶液与不同 pH 值缓冲液在 25 °C 温育, 每隔 30 min 取样, 迅速冷却后测酶活。结果见图 4, 可知该酶的最适 pH 为 7.0 左右。

将酶液与不同 pH 值缓冲液在 45 °C 温育 1 h 后, 测定酶活。该酶在不同 pH 值缓冲液中保持时间越长, 酶活越低。保持 4 h 后, 该酶的残余酶活均低于 10% (图 5)。

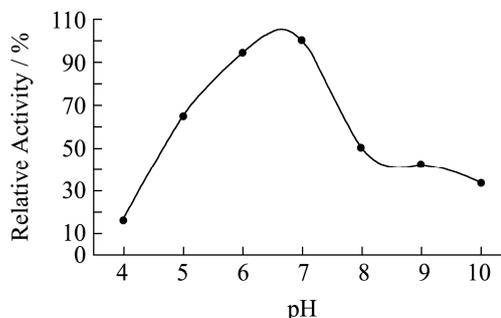


图 4 pH 对几丁质酶活力的影响

Fig.4 Effects of pH on the activity of chitinase

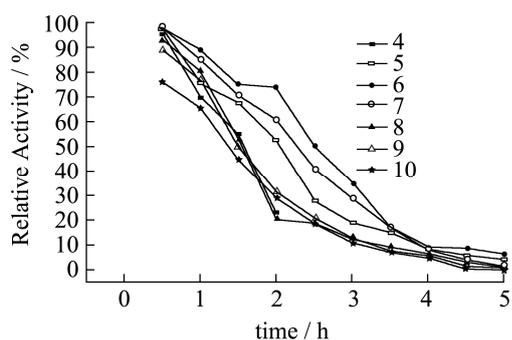


图5 几丁质酶在不同 pH 缓冲液的稳定性

Fig.5 The chitinase stability of pH

2.4 不同离子强度对酶活力的影响

多种金属阳离子对该酶都有不同的影响，结果见表 1。

2.4.1 一价金属离子

我们选取 Li^+ 、 K^+ 和 Na^+ 作为实验对象。从表 1 可以看出，总体来说一价金属离子对酶活影响不大，既没有明显的激活作用，也没有显著的抑制作用。

2.4.2 二价金属离子

表 1 金属离子对几丁质酶活力的影响

Table 1 Effects of ions on the chitinase activity

金属离子		相对酶活/%					
离子浓度		0	5	10	15	20	30
/(mmol/L)							
一价离子	Na^+	100	99.11	96.19	97.94	96.48	95.02
	K^+	100	93.26	92.38	102.92	100.87	98.82
	Li^+	100	100.56	100.58	100.43	99.66	86.29
二价离子	Ca^{2+}	100	102.21	68.55	63.44	62.26	61.09
	Zn^{2+}	100	122.10	87.85	69.87	63.82	57.76
	Mg^{2+}	100	96.48	116.81	119.91	114.21	108.52
	Cu^{2+}	100	85.96	72.05	53.52	26.76	0
	Mn^{2+}	100	36.83	45.82	54.24	51.61	48.98
	Pb^{2+}	100	99	97.65	96.26	94.82	90.47
	Fe^{2+}	100	42.10	47.73	32.88	29.81	26.74
三价离子	Fe^{3+}	100	87.74	91.07	87.70	86.83	85.95
	Al^{3+}	100	91.80	97.21	102.96	65.70	26.45

我们选取 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 等离子为实验对象，从结果看可以分为以下几类：

第一类，在低浓度（5 mmol/L）时，对酶活没有影响或者只有轻微的激活作用，但随着离子浓度的提高，对酶的抑制作用逐渐增强。属于这一类的有 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 。

第二类，对酶有一定的激活作用，但是激活的程度不是很强，比如 Mg^{2+} 就是这类的代表。

第三类，在实验设定的浓度范围内，对酶活均表现出抑制作用，如 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 等。其中， Cu^{2+} 对酶的抑制表现出剂量效应，当浓度达到 30 mmol/L 时，酶活完全被抑制。 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 二者均可使酶完全失活。但是 Pb^{2+} 在 0~30 mmol/L 时，对酶活力抑制作用很轻微，大于该浓度时，酶活才迅速降低。

2.4.3 三价金属离子

Fe^{3+} 和 Al^{3+} 对酶都表现出抑制作用，只是后者的抑制作用更强烈，而且有类似于 Cu^{2+} 的效应。

3 讨论

几丁质酶是一类酶学性质差异较大的水解酶类。由于来源不同，它们的基本性质有很大区别。本文与已有的报道^[8]相比较，几丁质酶的 K_m 为 29.15 g/L，所以该酶与底物的亲和力很大。该酶的最适 pH 为 7.0 左右，最适反应温度为 45 °C。在 40 °C 以下，3 h 内该酶稳定相当好，12 h 仍有 50% 残余酶活，表面有良好的温度稳定性，远比已报道过的几丁质酶稳定^[8]。不同金属离子对酶活影响的研究表明，只有 Mg^{2+} 对该酶有一定的激活作用。实验中选用的大多数离子都表现出抑制作用，以 Cu^{2+} 和 Al^{3+} 的抑制作用最为明显，而且都表现出剂量效应。

参考文献

- [1] Daimon T, Hamada K, Mita K, et al. A *Bombyx mori* gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33: 749-759
- [2] Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases[J]. J Exp Bio, 2003, 20:4393-4412
- [3] Kuranda MJ, Robbins PW. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 1991, 266:19758-19767
- [4] Kasprzewska A. Plant chitinases-regulation and function[J]. Cell Mol Biol Lett, 2003, 8: 809-824
- [5] Benecke U. Bacillus chitinovorius, ein chitin zersetzenden spaltpilz[J]. Bot Ztg, 1995, 63:222-231
- [6] 希坎南.伯杰细菌鉴定手册[M].第八版,北京:科学出版社, 1984.
- [7] 徐洵.海洋生物基因工程实验指南[M].北京:海洋出版社, 2004. 358-360.
- [8] 白复芹,刘晓光,李惠,等.螺旋毛壳 ND35 几丁质酶的纯化和性质[J].莱阳农学院学报.2006, 23(4): 268-271