

文章编号:1009-038X(2004)03-0010-05

曲霉 CJ22-326 内切壳聚糖酶的分离纯化和性质

陈小娥^{1,3}, 夏文水¹, 余晓斌²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生工学院, 江苏 无锡 214036; 3. 浙江海洋学院 海洋科技系, 浙江 舟山 316004)

摘 要: 使用 75% 乙醇沉淀、CM-Sepharose FF 离子交换色谱、Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱和 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水色谱分离纯化技术, 对曲霉 CJ22-326 发酵液中的内切壳聚糖酶进行分离纯化和性质研究。结果表明, 纯化后的内切壳聚糖酶 ChiB 经 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定为单带, 其相对分子质量为 27 700。采用 Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱测定的相对分子质量为 27 800。ChiB 作用最适温度为 65 ℃, 最适 pH 值为 6.0, 75 ℃ 保温 1 h 还残留 40% 酶活。1 mmol/L Mn^{2+} 对 ChiB 有强烈激活作用, 2 mmol/L Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} 有强烈抑制作用。ChiB 作用的最适底物为脱乙酰度 95% 的胶体壳聚糖。

关键词: 曲霉; 内切壳聚糖酶; 纯化; 性质

中图分类号: Q 556.2

文献标识码: A

Purification and Properties of Endo-Chitosanase ChiB from *Aspergillus sp.* CJ22-326

CHEN Xiao'e^{1,3}, XIA Wen-shui¹, YU Xiao-bin²

(1. School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. School of Ocean Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: An endo-chitosanase ChiB from the culture supernatant of *Aspergillus* CJ 22-326 was purified to an apparent homogeneity through ethanol fraction, CM-Sepharose FF chromatography, Sephacryl S-200 and Phenyl Sepharose CL-4B chromatography. The molecular weight of ChiB was estimated as 27 700 by SDS-PAGE, and 27 800 by gel filtration respectively. The best ChiB activity existed at pH 6.0 and 60 ℃, and the activity still retained 40% ability at 75 ℃ for 60 min. The enzyme activity was increased about 2 fold by the addition of 1 mmol/L Mn^{2+} . However, 2 mmol/L Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} strongly inhibited the enzyme. The best substrate was 95% deacetylated colloid chitosan.

Key words: *Aspergillus*; chitosanase; purification; property

壳聚糖酶是一种专一性降解壳聚糖产生壳寡糖的水解酶, 根据作用模式不同, 壳聚糖酶可分为

收稿日期: 2003-08-05; 修回日期: 2003-11-23.

作者简介: 陈小娥(1968-), 女, 浙江浦江人, 助理研究员, 食品科学与工程博士研究生。

内切酶和外切酶两种类型。壳聚糖酶可由来源广泛的微生物产生。1973 年 Monaghan 指出壳聚糖酶(Chitosanase)是一种不同于几丁质酶(Chitinase)的新酶,国外已相继从许多微生物中分离、纯化出了具有种属特异性的壳聚糖酶,他们对产壳聚糖酶的 *Bacillus* 属和 *Streptomyces* 属的菌株作了研究,包括酶的分离、纯化和基因克隆等分子水平研究^[1~4]。国内关于壳聚糖酶的研究较少,只有关于球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*^[5]、细菌属假单胞菌 *Pseudomonas sp.* V III T39^[6] 和青霉菌^[7] 产壳聚糖酶的分离、纯化和性质研究报道。曲霉 *Aspergillus* CJ22-326 是一株从土壤中筛选到的产壳聚糖活力较高的菌株诱变得到的,发酵液粗酶活可达 3 U/mL 以上。该菌株产两种不同的胞外壳聚糖酶,即内切壳聚糖酶和外切壳聚糖酶,作者探讨了曲霉产内切壳聚糖酶的纯化及部分酶学性质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 曲霉 CJ22-326,由作者筛选并诱变获得。

1.1.2 产酶液体培养基 胶体壳聚糖 1 g/dL,酵母膏 0.1 g/dL,硫酸铵 0.2 g/dL,磷酸二氢钾 0.2 g/dL,硫酸镁 0.05 g/dL,麸皮 1 g/dL,pH 5.6。

1.1.3 粗酶液的提取 将曲霉 CJ22-3 菌种接种于产酶液体培养基,于 30 ℃ 下 150 r/min 培养 4 d,3 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。

1.1.4 主要化学试剂 丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、CM-Seph-
arose FF、Sephacryl S-200 以及 SDS-PAGE 和凝胶用的低相对分子质量组标准蛋白质均为 Pharmacia 公司产品;巯基乙醇(2-ME,进口分装)、考马斯亮蓝 R250(Fluka,进口分装);壳聚糖(脱乙酰度为 72%~95%);浙江玉环海洋生化有限公司提供;其它化学试剂均为分析纯。

1.2 分析方法

1.2.1 壳聚糖酶活力的测定 在 1 mL 1% 胶体壳聚糖(0.2 mol/L pH 5.8 醋酸作为缓冲液)中加入 1 mL 适当稀释的酶液,于 37 ℃ 保温 15 min,沸水浴 10 min 灭酶,过滤。3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定酶解液中的还原糖(以氨基葡萄糖计),每分钟催化生成相当于 1 μ mol 氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.2 粘度测定 使用 HAAKE 粘度计(RV-

12),采用 2 号转子,剪切速率为 256 r/min,在 37 ℃ 下,将 1.5% 壳聚糖溶液 40 mL 加入到 0.1 mL 纯酶液中,测定壳聚糖底物的粘度变化,由记录仪自动记录,8 min 内完成。

1.2.3 蛋白质含量测定 Folin-酚法(Lowry 法)^[8],以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

按文献^[9]的方法进行,分离胶质量浓度 12 g/dL,浓缩胶质量浓度为 3 g/dL,缓冲液为 Tris-甘氨酸溶液,pH 8.3。

1.3 壳聚糖酶的纯化

1.3.1 乙醇沉淀 将粗酶液和工业乙醇预冷,在低温下将 3 倍体积的工业乙醇缓慢加入到粗酶液中,并混合均匀,静置 2 h 后,冷冻离心并弃去上清液,沉淀立即用缓冲液 A(pH 5.8,0.01 mol/L 醋酸缓冲液,含 0.02% NaN₃)复溶。把所得的蛋白质溶液加入预先处理好的截留相对分子质量 12 000 的透析袋中,在相同缓冲液中于 4 ℃ 透析 24 h(定时更换缓冲液)。

1.3.2 CM-Seph-
arose FF 离子交换层析分离 将透析后的样品加入到用缓冲液 A 预平衡的 CM-Seph-
arose FF 阳离子交换层析柱(2.6 cm × 45 cm),先用 2 倍床体积的缓冲液洗脱至 OD₂₈₀ 不变,再用 0~1.0 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱,体积流量为 0.5 mL/min,每管收集 5 mL,经酶活力检测后收集有酶活组分进一步纯化。

1.3.3 Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱分离 将收集到有酶活性的组分用截留相对分子质量为 5 000 的聚砜膜在低温下超滤浓缩。浓缩酶液再上经缓冲液 B(pH 7.0,0.02 mol/L H₃PO₄缓冲液,含 0.02% NaN₃)预平衡后的 Sephacryl S-200 凝胶柱(1.6 cm × 100 cm),上样量为 2%,体积流量为 20 mL/h,每管收集 5 mL,有酶活部分供下一步分离。

1.3.4 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水色谱分离 将收集到有酶活性的组分加固体(NH₄)₂SO₄至浓度为 1.5 mol/L,立即上含 1.5 mol/L(NH₄)₂SO₄、缓冲液 B 预平衡后的 Phenyl Sepharose CL-4B 的疏水色谱柱(1.6 cm × 25 cm)进行层析分离。先用 4 倍床体积的含 1.5 mol/L(NH₄)₂SO₄、缓冲液 B 洗脱至 OD₂₈₀ 不变后,再用缓冲液 B 进行洗脱,体积流量为 0.5 mL/min,每管收集 2.5 mL,检测并收集有酶活的组分。

1.4 酶学性质

1.4.1 温度对壳聚糖酶活性及酶的热稳定性的影响 在不同温度下按常规方法测定酶活力;酶液在

不同温度下保温 60 min 后,按常规法测定其对应的酶活力。

1.4.2 pH 对壳聚糖酶活性及酶稳定性的影响

分别以 pH 3~9 的缓冲溶液配制底物和稀释酶液,按常规法测定酶活力;将酶液与上述不同 pH 缓冲液在 30 ℃ 下保温 6 h 后,按常规法测定其对应的酶活力。

1.4.3 金属离子对酶活力的影响 在酶反应液中分别加入不同的金属离子,并使其终浓度为 2 mmol/L,然后按常规法测定其酶活力。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖酶的分离纯化

将由曲霉 CJ22-326 产生的粗酶液经过体积分数为 75% 的乙醇沉淀,透析后上 CM-Sepharose FF 离子交换层析,用 0.01 mol/L, pH 5.6 的醋酸缓冲液洗脱,大部分杂蛋白不能被吸附。再用 0~1 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱,可以很好地分离出两个蛋白峰和对应的酶活峰,结果见图 1。两个壳聚糖酶组分的等电点差异较大,在用相同底物测定时,产生还原糖量(以还原端基计)相同,而剩余底物量却不同,可初步断定主峰 B 为内切酶,另一小峰 A 为外切酶。

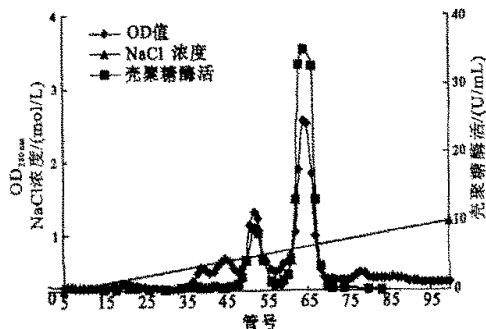


图 1 CM-Sepharose FF 层析图谱

Fig. 1 Chromatography of endo-chitosanase ChiB on CM-Sepharose FF

ChiB 浓缩后上 Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱,在体积流量为 20 mL/h,上样量为 2% 时,分辨率不高,酶比活力提高不多,不能很好地分离相对分子质量较接近的一些蛋白质分子,因为在同样条件下分离低相对分子质量标准蛋白(4 个蛋白)时也同样会得到 3 个峰。通过降低体积流量为 12 mL/h、减少上样量、增加洗脱液离子强度,即往缓冲液 B 中加入 NaCl 使其浓度达到 0.1 mol/L,可以提高分辨率,洗脱曲线见图 2。

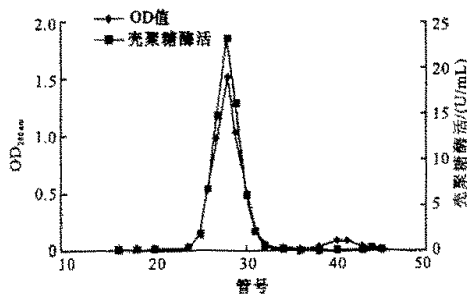


图 2 Sephacryl S-200 层析图谱

Fig. 2 Chromatography of endo-chitosanase ChiB on Sephacryl S-200

经 Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱分离后得到的 ChiB,再用 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水色谱进一步分离,得到 3 个蛋白峰和一个对应的酶活峰,说明疏水色谱能有效地去除一些有疏水性差异的杂蛋白(见图 3)。收集此酶活峰进行脱盐浓缩,用于纯度鉴定和酶学性质研究,整个纯化过程结果见表 1。ChiB 被纯化了 15 倍,比酶活为 27.12 U/mg。

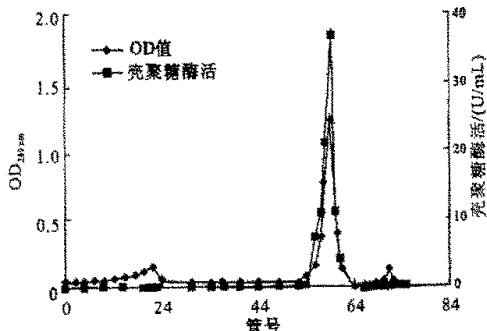


图 3 Phenyl Sepharose CL-4B 层析图谱

Fig. 3 Chromatography of endo-chitosanase ChiB on Phenyl Sepharose CL-4B

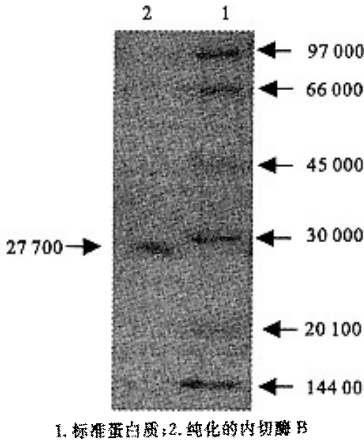
表 1 内切壳聚糖酶分离纯化结果

Tab. 1 Purification of endo-chitosanase ChiB from *Aspergillus* CJ22-326

纯化步骤	总酶活 力/U	总蛋白 质量/mg	比酶活力/ (U/mg)	回收 率/%	纯化 倍数
粗酶液	1 260	700	1.8	100	1.00
乙醇沉淀	985	219	4.49	78.17	2.13
CM-Sepharose FF	692	56.8	12.18	54.92	6.77
Sephacryl S-200	453.6	26.2	17.31	36.00	9.61
Phenyl-Sepharose	279.4	10.3	27.12	22.17	15.07

2.2 壳聚糖酶的理化性质

2.2.1 ChiB 的纯度 经 3 次柱层析纯化后获得的 ChiB,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验为单带(见图 4),说明已达到电泳纯。



1. 标准蛋白质;2. 纯化的内切酶 B

图4 内切壳聚糖酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of The Purified Endo-chitosanase ChiB

2.2.2 ChiB 的相对分子质量 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 ChiB 的相对分子质量为 27 700(见图 4). 由 Sephacryl S-200 凝胶色谱测得 ChiB 相对分子质量为 27 800, 两种测定方法所获结果基本一致, 说明 ChiB 为单体酶.

2.2.3 ChiB 的氨基酸组成测定 对酶 ChiB 的氨基酸组成进行了测定, 结果表明该酶由 278 个氨基酸残基组成, 有半胱氨酸残基, 其中精氨酸、蛋氨酸含量很低, 见表 2.

表2 内切壳聚糖酶 ChiB 氨基酸组成

Tab. 2 Amino acids analysis of the endo-chitosanase ChiB

氨基酸	质量 分数/%	摩尔 残基数*	氨基酸	质量 分数/%	摩尔 残基数*
Asp	24.84	60	Glu	7.75	17
Ser	7.81	25	His	3.98	8
Gly	8.02	39	Thr	2.62	7
Ala	6.60	26	Arg	0.15	1
Tyr	1.44	3	Cys	1.25	4
Val	4.17	12	Met	0.11	1
Phe	3.01	6	Ile	6.02	15
Leu	6.10	15	Lys	11.25	24
Pro	4.82	14	总数	100	278

注: 酶 B 的相对分子质量为 27 8000, 总的氨基酸组成测定是在酸水解下进行的, 测定时色氨酸被全部破坏, 丝氨酸和苏氨酸约有 10%~15% 被破坏.

2.2.4 ChiB 的最适 pH 和稳定 pH ChiB 的最适和稳定 pH 分别为 6.0 和 4.5~8.0, 见图 5.

2.2.5 ChiB 的最适作用温度和稳定温度 ChiB 作用最适温度为 65℃, 在 30~45℃保温 1 h 后基本不失活, 75℃保温 1 h 还有 40% 的酶活, 说明它

是一种耐热酶. 这可能与它含有的半胱氨酸形成分子内二硫键有关, 见图 6.

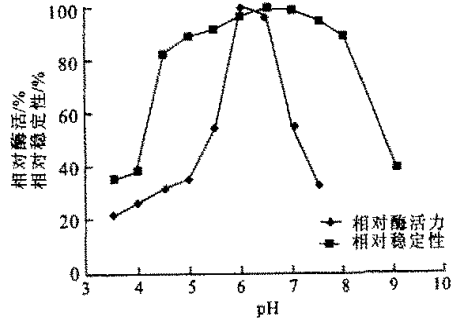


图5 pH 对内切壳聚糖酶活力及稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity and stability of endo-chitosanase Chi B

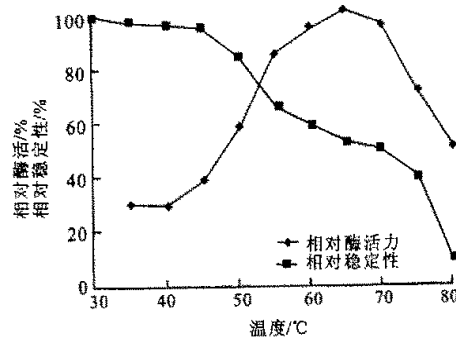


图6 温度对内切壳聚糖酶活力及稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the activity and stability of endo-chitosanase Chi B

2.2.6 金属离子对 ChiB 酶活的影响 1 mmol/L Mn^{2+} 对 ChiB 有强烈的激活作用, 2 mmol/L Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} 对 ChiB 有强烈抑制作用, 见表 3.

表3 金属离子对壳聚糖酶活的影响

Tab. 3 Effect of metal ions on the activity of endo-chitosanase ChiB

金属离子	相对酶活	金属离子	相对酶活
对照	100	Cu^{2+}	20
Hg^{2+}	0	Cd^{2+}	22
Mn^{2+}	250	Sn^{2+}	97
Ba^{2+}	102	Pb^{2+}	60
Zn^{2+}	67	Ca^{2+}	98
Co^{2+}	80	Mg^{2+}	81
Ag^+	66	Fe^{3+}	12

2.2.7 ChiB 的底物专一性 用不同脱乙酰度的壳聚糖作底物, ChiB 的作用底物为脱乙酰度为 70%

~95%的胶体壳聚糖,酶活力随底物脱乙酰化度的增加而增加。

2.2.8 ChiB 作用模式 取 40 mL 1.5%壳聚糖溶液,加入 0.1 mL 纯酶液,体系粘度下降很快,3 min 内就下降了 85%,说明它是一种内切酶,见图 7。继续降解一段时间后,分析酶解主产物为壳二糖、壳三糖、壳四糖。

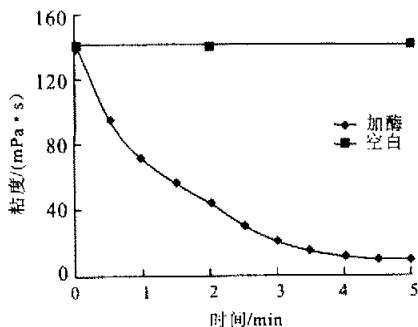


图 7 酶解时粘度随时间变化曲线

Fig. 7 Reduction in the viscosity of chitosan solution with endo-chitosanase ChiB

3 讨 论

壳聚糖酶是一类差异较大的水解酶类,微生物来源不同,其酶学性质也不同。国外对真菌来源的壳聚糖酶报道较少,仅有 *Penicillium islandicum*, *Mucor*

rouxii, *Fusarium solani*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei*, *Rhodotorula gracillis* 的壳聚糖酶的纯化和部分性质的研究报道。曲霉 CJ22-326 (3 U/mL 发酵液)与 *A. oryzae* IAM2660 (0.05 U/mL 发酵液), *Fusarium solani* (0.0015 U/mL 发酵液)和 *Mucor rouxii* (0.0002 U/mL 发酵液)相比酶活力已相当高,而且在培养基中加入 2% 的壳聚糖后能很好地生长且产酶能力强。而 Zhang 等人^[10]报道的米曲霉 *A. oryzae* 内切壳聚糖酶的相对分子质量则是 40 000,而且不能利用壳聚糖来诱导产酶,但可以利用乙酰氨基葡萄糖来诱导产酶;同样是曲霉产壳聚糖酶,其反应的最适温度、最适 pH 值以及金属离子对酶活力的影响等方面均有差异。

ChiB 与国内报道的产酶水平较高的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 所产壳聚糖酶也存在明显差异,后者相对分子质量为 36 000,最适 pH 为 4.0, Mn^{2+} 对它有强烈抑制作用,高于 40 °C 时酶开始急剧失活;而 ChiB 的最适 pH 为 6.0,最适作用温度为 65 °C,热稳定性好,75 °C 保温 1 h 还残留 40% 酶活, Mn^{2+} 对它有很强的激活作用;ChiB 具有底物专一性,脱乙酰度高的底物更好,无 CMC 酶活;ChiB 为单亚基蛋白。它与 Yoon^[3] 等人报道来源于 *Bacillus sp.* CK4 的耐热壳聚糖酶酶学性质极为相似。

参考文献:

- [1] Akiyama K, Fujita T, Kuroshima K-I, *et al.* Purification and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus ehimensis* EAG1 [J]. *J Biosci Bioeng.* 1999, 87(3):383-385.
- [2] Omumasaba C A, Yoshida N, Sekiguchi Y, *et al.* Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1 [J]. *J Gen Appl Microbiol.* 2000, 46:19-27.
- [3] Yoon H G, Kim H Y, Lim Y H, *et al.* Thermostable chitosanase from *Bacillus sp.* strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme [J]. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66:3727-3734.
- [4] Boucher I, Dupuy A, Vidal P, *et al.* Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992, 38:188-193.
- [5] 方样年,杜显光,黄秀梨,等. 球孢白僵菌胞外壳聚糖酶的纯化和性质 [J]. 菌物系统, 2002, 21(1):77-83.
- [6] 蔡静平,王钦宏. 假单胞菌 *Pseudomonas sp.* V III T39 壳聚糖酶的纯化和性质研究 [J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(4):19-23.
- [7] 葛正红,曾嘉. 壳聚糖降解酶的分离纯化及性质研究 [J]. 天津化工, 2002, (1):15-19.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem.* 1951, 193:265-275.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage* T4 [J]. *Nature.* 1970, 227:680-685.
- [10] Zhang X Y, Dai A L, Zhang X K, *et al.* Purification and characterization of chitosanase and exo-beta-D-glucosaminidase from a koji mold, *Aspergillus oryzae* IAM2660 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000, 64(9):1896-1902.

(责任编辑:李春丽)