

文章编号: 1004-7271(2004)02-0184-05

·研究简报·

假单胞菌产壳聚糖酶的纯化和特性

Purification and some properties of chitosanase from *Pseudomonas*

王平平, 周培根, 王 艳, 周 颖, 刘文杰

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

WANG Ping-ping, ZHOU Pei-gen, WANG Yan, ZHOU Ying, LIU Wen-jie
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 壳聚糖酶, 纯化, 特性

Key words: chitosanase; purification; properties

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

壳聚糖是由氨基葡萄糖通过 $\beta-1,4$ 键连接而成的天然线形高聚物,其在工业、农业尤其是医药、食品等领域都具有重要的应用价值。但由于壳聚糖相对分子质量大,水溶性差,其在人体内不易吸收,使其应用受到限制。而甲壳低聚糖(chitooligosaccharides)不仅水溶性好,易吸收,而且具有抗菌、抗癌以及促进双歧杆菌增殖、增强机体免疫等功能^[1]。目前制取方法常用盐酸水解壳聚糖来制备,但该法反应条件较难控制,不易得到较高聚合度的低聚糖,对环境污染严重,近年来已逐渐被淘汰。而利用壳聚糖酶水解壳聚糖来制备甲壳低聚糖,由于其专一性强,反应条件温和,得率高,且不污染环境,已得到广泛的关注。在前面的研究工作中,已对本实验室筛选的假单胞菌所产的壳聚糖粗酶液进行了探究,本文继续对该酶进行了纯化,并对其酶学特性作了进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

壳聚糖:脱乙酰度 80%,浙江天宝壳聚糖有限公司生产。

显色剂 $K_3Fe(CN)_6-Na_2CO_3$ 的配制采用黄伟干等的方法^[2]。

1.1.2 菌种

本实验室筛选得到假单胞菌(*Pseudomonas*)。

1.1.3 培养基

虾蟹粉 1% 壳聚糖 2% NaCl 0.5% 酵母膏 0.3% $(NH_4)_2HPO_4$ 0.8% pH 7.0

1.2 壳聚糖酶的提取及纯化

1.2.1 壳聚糖酶的提取

发酵液 4 000r/min 冷冻离心 10min 取 150mL 上清液,加 30% 冰冷的丙酮沉淀,收集沉淀,将其溶解在少量体积的 0.05mol/L pH5.6 的醋酸缓冲液后,冰浴抽真空,去除残余的丙酮。

1.2.2 Sephadex G-25 柱层析

抽真空后的酶液采用 Sephadex G-25 柱层析纯化。上样后,采用 0.05mol/L pH5.6 的醋酸缓冲液洗脱,流速为 0.6mL/min,每 3.0 mL 收集一管。以 0.05mol/L pH5.6 的醋酸缓冲液为对照,于波长 280nm 处测定各管洗脱液的吸光度值。以 A₂₈₀ 为纵坐标,洗脱液管号为横坐标,作出蛋白质洗脱曲线;以每管壳聚糖酶活性为纵坐标,洗脱液管号为横坐标,作出壳聚糖酶洗脱曲线。最后将含有高壳聚糖酶活性的各管洗脱液合并,PEG20 000 浓缩。

1.2.3 Sephadex G-100 柱层析

上述浓缩后的酶液通过 Sephadex G-100 柱层析,用 0.05mol/L pH5.6 的醋酸缓冲液进行洗脱,流速为 0.5mL/min,每 5.0mL 收集一管。按上述方法分别作出蛋白质和壳聚糖酶洗脱曲线。最后将含有高壳聚糖酶活性的各管洗脱液合并,PEG20 000 浓缩。

以上壳聚糖酶提取及纯化步骤均在 4℃ 下进行。

1.3 壳聚糖酶分子量的电泳鉴定

纯化浓缩后酶液的纯度用不连续系统十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定。

1.4 壳聚糖酶活力及蛋白质测定

参考 Imoto^[3]和杜昱光等^[4]的方法并略加修改。在 1.0mL 1% (w/v) 胶体壳聚糖(pH5.6)溶液中,加入 1.0mL 0.05mol/L pH5.6 的乙酸缓冲液,再与 1.0mL 粗酶液混合,37℃ 保温 10min,沸水浴 5min 终止酶反应,然后加入 1.0mL 0.25mol/L NaOH 使未反应完全的壳聚糖沉淀,4 000r/min 离心 10min,收集上清液。取 3.0mL 上清液至另一干净试管中,加 2.0mL K₃Fe(CN)₆-Na₂CO₃,加试管帽,沸水煮 15min,冷却后于 420nm 测定吸光度。一个酶活力单位定义为 37℃、pH5.6 时每分钟释放相当于 0.1μmol GlcN-HCl 还原糖的酶量。

蛋白质含量的测定方法参考路阳等^[5]使用的方法。标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。

1.5 pH、温度对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

pH 对壳聚糖酶活性及稳定性影响的测定时,配制不同 pH 的缓冲液:0.05mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.0)、0.05mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.0~5.5)、0.05mol/L 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0~8.0)。以不同 pH 缓冲液配成 0.5% 的胶体壳聚糖溶液为底物,按标准方法测定壳聚糖酶活力。酶液在不同的 pH(3.0~8.0)缓冲液中于 37℃ 保温 1h,按标准方法测定酶的残余活力。

温度对壳聚糖酶活性及稳定性影响的测定时,以 pH5.6 的乙酸缓冲液配成 0.5% 的胶体壳聚糖溶液为底物,在不同温度(30℃~70℃)下,按标准方法测定酶活力。酶液与 pH4.5 0.05mol/L 的缓冲液混合,置于不同温度下保温 30min 后,迅速冷却至 37℃,再按标准方法测定壳聚糖酶的残余活力。

1.6 壳聚糖酶作用产物分子量测定

参考邬建敏^[6]方法。

1.7 壳聚糖酶底物专一性的测定

用于壳聚糖酶作用的底物分别为 70%、80% 和 90% 脱乙酰度的胶体壳聚糖、胶体几丁质、粉末状壳聚糖、纤维素、羧甲基纤维素,按标准方法测定酶活力。

1.8 米氏常数(K_m)测定

以 0.05mol/L pH4.5 的醋酸缓冲液配成不同浓度的胶体壳聚糖溶液(0.5~5.0mg/mL)为底物,将 2mL 底物与 1mL 酶液在 55℃ 下反应,测定酶催化反应速度。

根据 Lineweaver 和 Burk 曲线^[7]计算出 K_m 值。

2 结果

2.1 壳聚糖酶的提取与纯化

由表 1 可见,酶液经 30% 丙酮提取后,经过 Sephadex G-25 柱层析,主要去除还残余的丙酮和小分子蛋白。再通过 Sephadex G-100 柱层析进一步纯化,洗脱曲线如图 2 所示,在图 1 中未分离开的两个蛋白峰在图 2 中得到很好的分离。将对应于第一个洗脱峰的第 3~9 管洗脱液(称为成分 I)合并,经测定酶活力为 4.34 u/mL,将对应于第二个洗脱峰的第 13~16 管洗脱液(称为成分 II)合并,测定酶活力为 1.24 u/mL,但成分 II 的总壳聚糖酶活力占成分 I 的不足 10%,且测定成分 II 对胶体几丁质没有酶活性,所以在以后的酶特性研究中不予研究。经过此纯化步骤,酶液的比活力比粗酶液提高了 6.84 倍。在上述整个纯化过程中,酶活力的回收率达 45.11%,同时杂蛋白去除率为 93.4%。

表 1 假单胞菌壳聚糖酶纯化结果

Tab.1 Purification of the chitosanase from *Pseudomonas Migula*

纯化步骤	总蛋白(mg)	总酶活力(u)	比活力(u/mg)	产率(%)	纯化倍数
粗酶	18.8	442.25	23.52	100	1
30% 丙酮沉淀	2.41	279.32	115.90	63.16	4.93
Sephadex G-25 柱层析	2.08	248.26	119.36	56.13	5.07
Sephadex G-100 柱层析	1.24	199.52	160.90	45.11	6.84

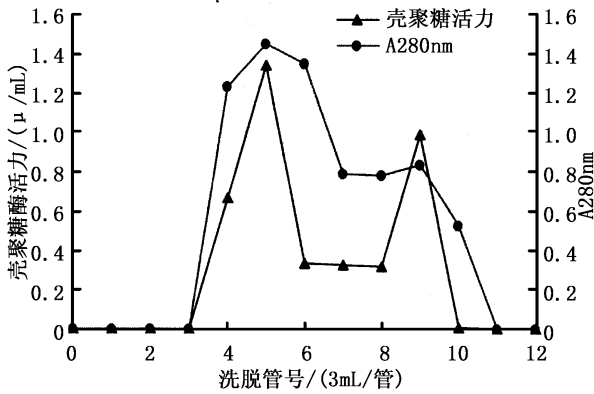


图 1 壳聚糖酶的 Sephadex G-25 柱层析洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of chitosanase from Sephadex G-25 column

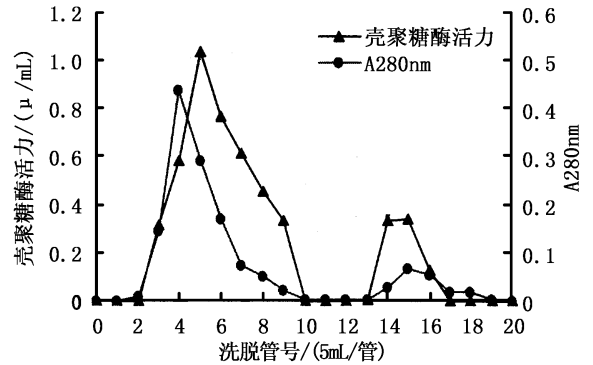


图 2 壳聚糖酶的 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of chitosanase from Sephadex G-100 column

2.2 壳聚糖酶分子量的电泳鉴定

壳聚糖酶用不连续系统十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果见图 3。成分 I 的分子量为 31KD,成分 II 分子量为 20.1KD。

2.3 pH 对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

由图 4 和图 5 可见,酶的最适反应 pH 为 4.5。在 pH5.0 时,酶的残余活性最大,pH5.0~6.5 范围内,酶残余活性在 80% 以上,表现出较高的稳定性。

2.4 温度对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

结果见图 6、图 7。酶的最适反应温度为 55℃。壳聚糖酶在 30℃~40℃ 间稳定性较好,残余酶活力在 80% 以上。40℃~55℃ 之间,酶活力随温度的升高缓慢下降,55℃ 之后,酶迅速失活。

2.5 壳聚糖酶作用产物分子量测定

壳聚糖酶对胶体壳聚糖水解 10min ,所得产物甲壳低聚糖的平均聚合度为 7.0 ,其平均分子量为 1145 ,产物得率为 65% ;当水解时间延长至 30min 时 ,产物平均聚合度降低至 5.0 ,得率达到 80% ,说明反应时间对控制产物聚合度大小和得率有一定的影响。

2.6 壳聚糖酶底物专一性

壳聚糖酶对不同底物的作用结果见表 2。结果说明 ,壳聚糖酶对底物专一性高低的趋势为 90% 胶体壳聚糖 ,80% 胶体壳聚糖 ,70% 胶体壳聚糖 ,粉末状壳聚糖 ,但不能降解胶体几丁质 ,纤维素和羧甲基纤维素 ,表现出底物专一性。

2.7 米氏常数(Km)

以胶体壳聚糖底物浓度的倒数对反应速度的倒数作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线 (图 8) ,回归方程为 $y = 3.5562x + 1.7634$,相关系数为 $R^2 = 0.9989$ 。由图计算出 ,该酶以胶体壳聚糖为底物 ,其米氏常数 (Km)为 2.02mg/mL。

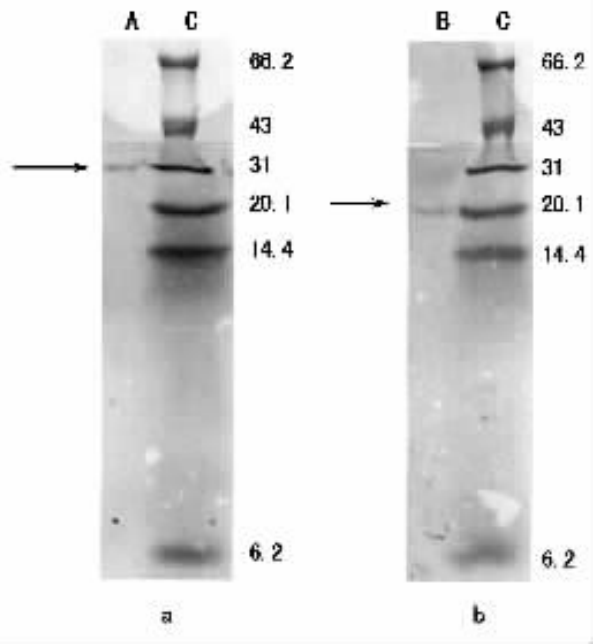


图 3 壳聚糖酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE pattern of purified chitosanase A.壳聚糖酶成分 I chitosanase I ;B.壳聚糖酶成分 II chitosanase II ;C.标准分子量蛋白质 Molecular weight marker

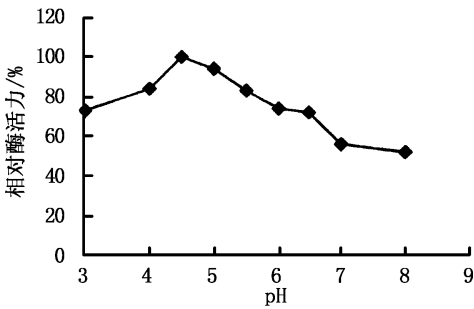


图 4 pH 对壳聚糖酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on chitosanase activity

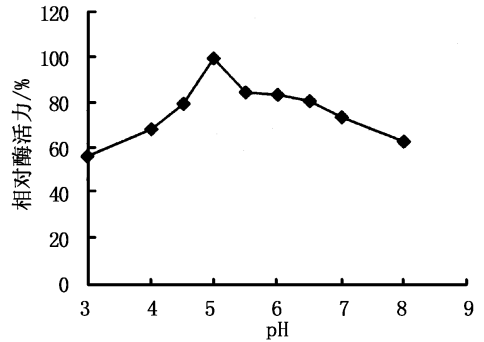


图 5 pH 对壳聚糖酶稳定性影响

Fig.5 Effect of pH on chitosanase stability

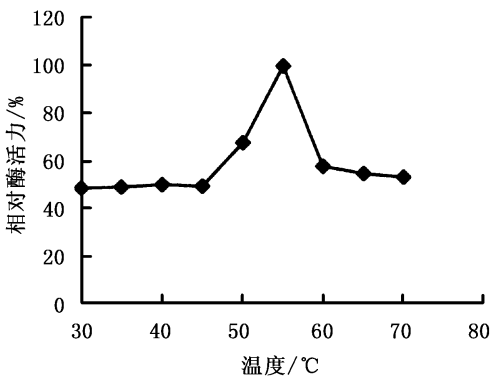


图 6 温度对壳聚糖酶活力的影响

Fig.6 Effect of temperature on chitosanase activity

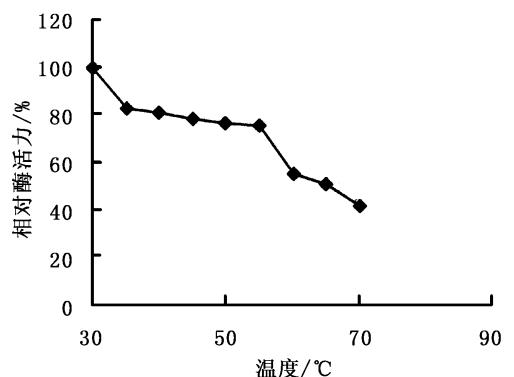


图 7 温度对壳聚糖酶稳定性影响

Fig.7 Effect of temperature on chitosanase stability

3 讨论

蔡静平等^[8]已有假单胞菌产壳聚糖酶的报道,但是与我们所筛选的假单胞菌所产壳聚糖酶在分离纯化及理化性质等方面有所不同。假单胞菌Ⅷ T39 所产壳聚糖酶分子量为 51.3KD,高于我们所得到的酶,另外,我们所研究的酶 I 的比活力要高于假单胞菌Ⅷ T39 所产酶。但是,两种酶都对壳聚糖具有水解专一性,从其水解产物的研究来看,两种酶都是内切型酶,当反应时间延长至 30min 时,所得到的甲壳低聚糖聚合度也有所相近。

该酶的最适反应 pH 为 4.5,在 pH3.0~4.5 之间,其活性随着 pH 值的升高而升高,而在 pH 值 5.0~8.0 之间,其活性随着 pH 值的升高而迅速下降,原因可能是由于 pH 的升高引起了酶分子中活性部位的结构发生变化,从而导致酶活性下降。在 pH5.0 时,酶的残余活性最大, pH5.0~6.5 范围内,表现出较高的稳定性,这与假单胞菌培养液在起始 pH 6.5 时产酶活力最高相一致(另作报道),表明该 pH 范围为假单胞菌生长繁殖适宜的酸碱环境条件,而且与假单胞菌Ⅷ T39 所产酶最稳定的 pH 范围是 pH5.0~6.0 也比较相近。

酶的最适反应温度为 55℃,而热稳定性范围在 30℃~40℃,40℃以后,酶活力下降很快,最适温度与耐热温度相差较大,其原因可能如方祥年等^[9]所述。

参考文献:

- [1] Jeon Y J, Park P T, Kim S K. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor[J]. Carbohydr Polym, 2001, 44(1): 71-76.
- [2] 黄伟干, 虞建梅. 铁氰化钾分光光度法测定白砂糖中的还原糖分[J]. 甘蔗糖业, 1991(3): 41-49.
- [3] Imoto T, Yagishita K. A simple activity measurement of lysozyme[J]. Agric Biol Chem, 1971, 35(7): 1154-1156.
- [4] 杜昱光, 方祥年, 黄秀梨, 等. 球孢白僵菌高产壳聚糖酶突变菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 60-64.
- [5] 路阳, 王贤舜. 用考马斯亮兰 G-250 迅速、灵敏地测定蛋白质浓度[J]. 生物学杂志, 1992, 1: 24-25, 32.
- [6] 邬建敏. 光度法测定甲壳低聚糖的平均相对分子质量[J]. 化学世界, 2001, 6: 293-295.
- [7] Lineweaver H, Burk B. The determination of enzyme dissociation constants[J]. J Am Chem Soc, 1934, 56: 658-666.
- [8] 蔡静平, 王钦宏. 假单胞菌Ⅷ T39 壳聚糖酶的纯化和性质研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(1): 19-23.
- [9] 方祥年, 杜昱光, 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.

表 2 壳聚糖酶的底物专一性

Tab.2 Substrate specificity of the chitosanase from *Pseudomonas Migula*

底物	相对酶活力(%)
70% 胶体壳聚糖	70.8
80% 胶体壳聚糖(对照)	100
90% 胶体壳聚糖	102.8
粉末状壳聚糖	68.9
胶体几丁质	0
纤维素	0
羧甲基纤维素	0

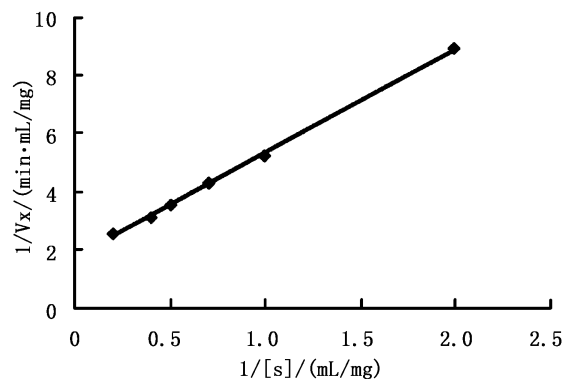


图 8 壳聚糖酶-胶体壳聚糖反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线
Fig.8 Double reciprocal plots of chitosanase-colloidal reaction