

文章编号: 1004 - 7271(2006)02 - 0211 - 05

几种霉菌产甲壳素脱乙酰酶 活力比较及部分酶学性质

蒋霞云, 周培根, 李 燕, 王晓辉, 党培育

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要:比较了几种霉菌(毛霉、根霉、曲霉和青霉)在对数生长期末期和稳定期末期的胞内和胞外甲壳素脱乙酰酶的活力。研究表明:(1)各霉菌的胞内和胞外都具有甲壳素脱乙酰酶活力,而且胞外酶的活力普遍大于胞内酶的活力;(2)处于对数生长期末期的毛霉菌株产甲壳素脱乙酰酶活力最高,其胞外酶活力达到了 97.2 ± 4.2 U/g干菌丝体。酶学特性研究表明:该酶的最适温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适 pH 约为 7.2,低温保存稳定性较差,每 24 小时酶活力下降 30% 以上。

关键词:甲壳素脱乙酰酶; 甲壳素; 壳聚糖; 霉菌

中图分类号:TS 201.2 **文献标识码:** A

Comparisons of activities of chitin deacetylase from mold strains and study of its properties

JIANG Xia-yun, ZHOU Pei-gen, LI Yan, WANG Xiao-hui, DANG Pei-yu

(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Activities of intracellular and intercellular chitin deacetylase were compared produced from several mold strains growing at the end of log phase and stable phase respectively. The experimental results indicated that (1) the activities of chitin deacetylase were found inside and outside the cells, and intercellular enzyme was more active than the intracellular one. And (2) the intercellular enzyme growing at the end of log phase had the highest activity, up to 97.2 ± 4.2 U/g dry mycelia, among mold strains. The study of the enzyme properties showed that the optimum temperature and pH were $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 7.2 respectively. It was also found that the enzyme had a less stability at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the decrease in the enzyme activity per 24 hours was more than 30%.

Key words: chitin deacetylase; chitin; chitosan; mold

甲壳素脱乙酰酶(chitin deacetylase, E.C.3.5.1.41, 简称 CDA)催化甲壳素中 N-乙酰基-D-葡糖胺的乙酰胺基的水解,产物为壳聚糖。目前常规使用的是化学法(40%以上氢氧化钠)生产壳聚糖,存在诸多问题,例如反应时间长、能耗大、产品质量(主要指平均分子量和脱乙酰度)不稳定,尤为严重的是排放物造成了巨大的环境污染,对周边生态破坏严重。所以,各国学者相继对甲壳素脱乙酰酶的来源、特性、生物学功能和基因组成^[1,2]等方向开展了基础性研究,并获得了基因工程菌株,其活力与野生型相当。

收稿日期:2005-10-27

基金项目:上海水产大学青年基金资助项目(01-48)

作者简介:蒋霞云(1974-),女,江苏无锡人,博士研究生,讲师,主要从事水产资源利用化学方面的研究。E-mail: jiangxy@shfu.edu.cn

通过比较了几种霉菌(毛霉、根霉、曲霉和青霉)在对数生长末期和稳定期末期的胞内和胞外甲壳素脱乙酰酶的活力,试图得到高活力菌株,进而研究其酶学性质,为进一步研究酶的结构与功能的关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种

本实验室分离、纯化并保存的毛霉(*Mucor* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、曲霉(*Aspergillus* sp.)、根霉(*Rhizopus* sp.)菌株。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基^[3]

1.2 实验方 法

1.2.1 菌种的生长曲线测定:

各菌株经斜面活化后接入液体马铃薯葡萄糖培养基,间隔一定时间取样测定细胞干重^[3],绘制生长曲线,确定各霉菌生长的对数生长期和平稳期。

1.2.2 酶作用底物 - 壳聚糖的制备

新鲜虾壳来源于上海市图们路集贸市场。

甲壳素的制备方法^[4]:将洗净的虾壳浸没在 5% HCl 溶液中 24 h 脱钙,过滤后水洗至中性,再加入 8% NaOH 溶液煮沸 1 h 去除蛋白质和脂肪,过滤后水洗至中性,先后用 1% KMnO₄ 和 5% NaHSO₃ 溶液常温浸泡 1 h,过滤,水洗至滤液澄清,60 °C ~ 70 °C 烘干即得甲壳素。

壳聚糖底物的制备方法^[5]:将粉碎后的甲壳素加入到 40% NaOH 溶液(12:5 W/W),常温减压条件下放置 3 h 后,加入碎冰(甲壳素悬浮液:碎冰 = 1:3)后常温放置 90 h,用 HCl 调整 pH 至 8.7,将甲壳素中倒入丙酮/水溶液(7:1, V/V)中使甲壳素沉淀出来。同时用冷的丙酮缓慢地加入以保持丙酮与水的比率。过滤出沉淀,用丙酮洗涤,在减压条件下干燥。最终产物溶解于水,透析(透析袋截留分子量为 12 000 ~ 14 000)后冷冻干燥,低温保存备用。

壳聚糖的脱乙酰度用红外光谱法^[6]测定为 75%。

1.2.3 甲壳素脱乙酰酶的提取

以斜面活化后的菌种用无菌生理盐水制备孢子悬液,孢子浓度为 10⁶ 个/mL。取 1 mL 孢子悬液接入装有 50 mL 液体马铃薯葡萄糖培养基的锥形瓶(150 mL),分别置于摇床培养至对数生长末期和稳定期末期,培养温度为 28 °C,转速为 200 r/min。

将培养的发酵液在低温条件下抽滤,所得滤液即为胞外甲壳素脱乙酰酶粗酶液。同时收集菌丝体,并用预冷的双蒸水洗涤数次后冷冻干燥。

称取一定量的菌丝体,加入冷 Tris-HCl 缓冲溶液(25 mM, pH 7.5)后,用匀浆机(24 000 r/min, 4 °C)匀浆数分钟,浆液在 4 000 g, 4 °C 下离心分离 20 min,然后于 15 000 g, 4 °C 下离心 1 h,取上清液即为胞内甲壳素脱乙酰酶粗酶液^[5]。

1.2.4 甲壳素脱乙酰酶的活力测定

用 50 mM、pH 7.2 的 Tris - HCl 缓冲溶液配置壳聚糖底物(5 g/L)。取 2 mL 底物溶液于 50 °C 预热 10 min,加入 1 mL 甲壳素脱乙酰酶的粗酶液,继续在 50 °C 准确反应 30 min 后,用沸水浴 3 min 终止反应。冷却后,过滤反应液,用 Bergmeyer 的方法^[7]测定滤液中的乙酸含量。在对照试验中,酶液预先用沸水浴 3 min,其余步骤相同。

酶的活力单位定义为:以脱乙酰度为 75% 的壳聚糖作底物,在 pH 7.2、温度为 50 °C 的条件下,30 min 内产生 1 μmol 乙酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 各霉菌菌株的生长曲线

各霉菌菌株的生长曲线(图 1)显示:毛霉最先渡过迟滞期,约在 18 h 左右即进入对数生长期,而其余三菌株均在 28 h 后细胞开始对数生长;培养 50 h 后,各菌株开始相继进入稳定期,其先后顺序分别为:青霉(53 h)、毛霉(65 h)、根霉(71 h)、曲霉(77 h)。在稳定期末,青霉的菌丝体数量最多,根霉的菌丝体数量最少。

从以上生长曲线可以看出,各菌株都典型地表现出了迟滞期、对数生长期和稳定期。由于实验采用的是细胞干重法,无法区分出一部分已经衰亡的细胞,因此稳定期和衰亡期之间的分界不明显。实验中还依据发酵液 pH 的变化确定 101 h 后各菌株基本都到达稳定期末期。

2.2 霉菌产甲壳素脱乙酰酶能力比较

以单位质量干菌丝体所含甲壳素脱乙酰酶活力来衡量各菌株产甲壳素脱乙酰酶的能力,实验结果见表 1。

表 1 各菌株产甲壳素脱乙酰酶能力比较

Tab.1 Comparisons of abilities to produce chitin deacetylase by mold strains

菌名	胞外酶产生能力(U/g 干菌丝体)		胞内酶产生能力(U/g 干菌丝体)	
	对数生长末期	稳定期末期	对数生长末期	稳定期末期
毛霉	97.2±4.2 *	50.1±0.3	4.29±2.04	13.0±1.2
根霉	33.9±2.1	43.2±2.4	10.5±2.5	12.7±0.8
曲霉	14.9±2.0	6.99±0.57	5.07±0.45	6.60±0.18
青霉	27.3±1.3	6.48±0.99	1.49±0.85	2.81±1.08

*: 差异显著($P < 0.05$)。

从表中可以看出,在本实验所选用的毛霉、根霉、青霉、曲霉四种霉菌中,胞内和胞外都存在不同水平的甲壳素脱乙酰酶活力,而且酶活力随着细胞的不同生长阶段而变化。尤其是在青霉的胞内和胞外均显示了酶的活力,目前未见有文献报道。

处于对数生长期末期的毛霉胞外酶活力最高,达到了 97.2 ± 4.2 U/g 干菌丝体。因此,本文主要对该酶的特性进行研究。

无论在对数生长末期,还是稳定期末期,各霉菌中胞外粗酶液中甲壳素脱乙酰酶(以下简称胞外酶)的活力始终高于胞内粗酶液中甲壳素脱乙酰酶(以下简称胞内酶)的活力,在毛霉、根霉和曲霉中,胞外酶活力远高于胞内酶。除根霉外,其余各菌株在对数生长末期的胞外酶活力含量均高于在稳定期末期的活力,这是一种与细胞生长同步的产酶模式,而相应的胞内酶正好相反,表现出了滞后于细胞生长的生长模式。这极可能与胞内胞外酶不同的生物学功能有关。

目前一般认为,甲壳素脱乙酰酶主要有参与细胞壁形成^[8]和抵抗外界病原菌^[9]两大功能,实验中发现的胞内酶和胞外酶不同的产酶模式(除根霉外)与此两项功能是相符的。胞外酶表现的是与细菌生长同步的生长模式,它(与甲壳素合成酶一起)主要参与了细胞壁的形成,首先由甲壳素合成酶利用尿苷二磷酸乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)合成甲壳素,再由甲壳素脱乙酰酶脱除新生甲壳素上的乙酰基成为壳聚糖,本次实验选用均为具有细胞壁的霉菌,所以均检测到了甲壳素脱乙酰酶活力;而胞内酶主要

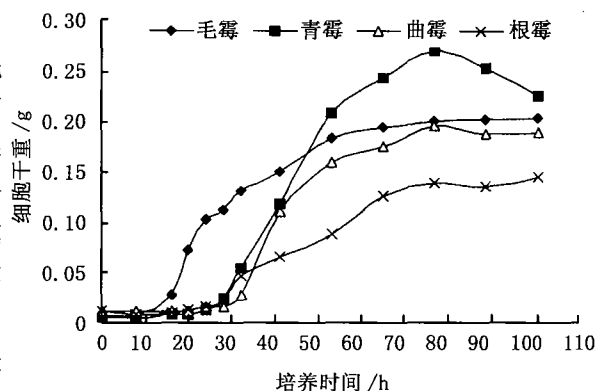


图 1 各霉菌的生长曲线

Fig.1 Growth curve of mold strains

参与了细胞壁的降解和部分防御功能,它可以防御攻击外源甲壳素类物质,并在细胞自溶时发挥作用,滞后于生长的产酶模式与此功能是相适应的。Tsigos 等认为参与前项功能的主要为胞内酶,后者为胞外酶^[2]。此酶的两项功能的确切细胞定位尚需进一步实验检验。

2.3 毛霉胞外甲壳素脱乙酰酶的特性

2.3.1 酶的最适温度

在对数生长末期,收集毛霉胞外粗酶液,在不同的温度下测定甲壳素脱乙酰酶活力,结果如图 2 所示。

实验结果表明:该酶的最适温度为 50 ℃,这与其它来源的甲壳素脱乙酰酶的研究结果是一致的。从菜豆炭疽菌 *Colletotrichum lindemuthianum*^[10]和构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*^[11]得到的胞外酶、鲁氏毛霉 *Mucor rouxii*^[12]得到的胞内酶的最适温度都是 50 ℃。

2.3.2 酶的最适 pH

在对数生长末期,收集毛霉胞外粗酶液,在不同 pH 的 25 mM Tris-HCl 缓冲体系中分别测定酶活力,得到在不同条件下酶活力的变化曲线,如图 3 所示。

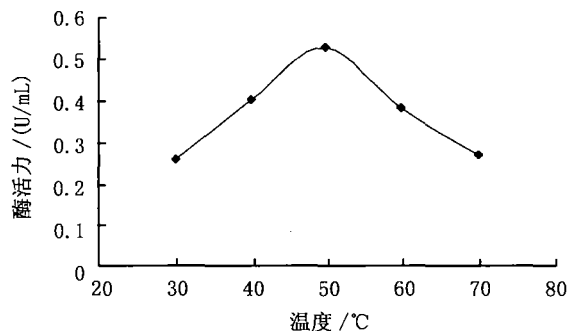


图 2 温度对胞外酶活力的影响
Fig.2 Effect of temperature on activity of intercellular chitin deacetylase

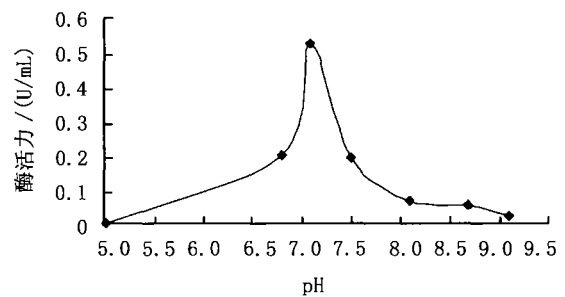


图 3 pH 对胞外酶活力的影响
Fig.3 Effect of pH on activity of intercellular chitin deacetylase

由图可知,该酶的最适 pH 在 7.2 左右,这与构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*^[11]的最适 pH(7.0)非常接近。据报道,目前研究其他来源的甲壳素脱乙酰酶的最适 pH 不尽相同,从鲁氏毛霉 *Mucor rouxii*^[12]得到的胞内酶的最适 pH 为 4.5,黄惠莉^[13]等从枯草芽孢杆菌中分离得胞外酶的最适 pH 也为 4.5~5.0 之间。菜豆炭疽菌 *Colletotrichum lindemuthianum*^[10]胞外酶的最适 pH 为 8.5。Kolodziejska^[5]认为鲁氏毛霉 *Mucor rouxii* 的胞外酶最适 pH 因不同的底物而异,变化范围在 4.8~5.8 之间。

2.3.3 酶的稳定性

在对数生长末期,收集毛霉胞外粗酶液,于 4 ℃ 保存,每间隔 24 h 测定其酶活力。以初始酶活力作为 100%,得到不同时间的相对酶活力变化,为图 4。

由图可知,该酶在此培养液体系中稳定性较差,1 天后酶活力下降了 30%,2 天后下降了 70%,每 24 h 酶活下降达 30% 以上。可能的原因为粗酶液中尚含有蛋白酶,导致了甲壳素脱乙酰酶的分解。所以,该粗酶液中应考虑加入蛋白酶抑制剂,且不宜久置,应尽快进一步分离、纯化以备。

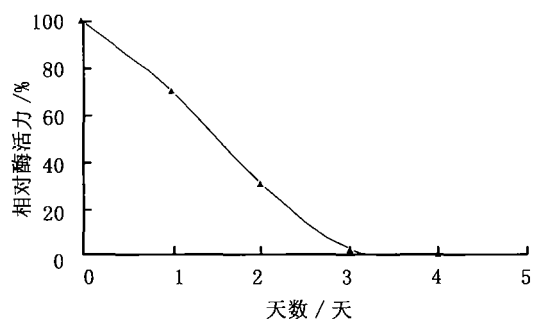


图 4 胞外甲壳素脱乙酰酶的稳定性
Fig.4 Stability of intercellular chitin deacetylase

参考文献：

- [1] 段 杉,彭志英. 甲壳素脱乙酰酶的研究概况及应用展望[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(4): 65 - 68.
- [2] Iason Tsigos, Aggeliki Martinou, Dimitris Kafetzopoulos, *et al.* Chitin deacetylase: New versatile tools in biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18: 305 - 312.
- [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999. 80.
- [4] 黄志斌. 水产品综合利用工艺学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996. 195.
- [5] Ilona Kolodziejska, Malgorzata Malesa-Ciecwierz, Anna Lerska, *et al.* Properties of chitin deacetylase from crude extracts of *Mucor rouxii* mycelium[J]. Journal of Food Biochemistry, 1999, 23:45 - 57.
- [6] Rosa Valeria da, Silva Amorim, Wanderley de Souza, *et al.* Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2001, 32:20 - 23.
- [7] Hans Ulrich Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New york: Academic Press, 1984.628 - 639.
- [8] Anna Christodoulidou, Peter Briza, Adi Ellinger, *et al.* Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes[J]. Federation of Biochemical Societies, 1999, 460: 275 - 279.
- [9] Anna Christodoulidou, Vassilis Bouriotis, George Thireos. Two Sporulation-specific Chitin Deacetylase - encoding Genes Are Required for the Ascospore Wall Rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271:31420 - 31425.
- [10] Iason Tsigos, Vassilis Bouriotis. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(44):26286 - 26291.
- [11] Carlos Alfonso, Oscar M Nuero, Francisco Santamaria, *et al.* Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation[J]. Current Microbiology, 1995, 30(1): 49 - 54.
- [12] Dimitris Kafetzopoulos, Aggeliki Martinou, Vassilis Bouriotis. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90(7): 2564 - 2568.
- [13] 黄慧莉,叶存印,姚云艳. 枯草芽孢杆菌甲壳素脱乙酰酶的筛选及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5):33 - 37.