

文章编号:1004-7271(2003)04-0380-04

·研究简报·

细菌产壳聚糖酶的性质初探

Properties of crude chitosanase from bacterium

王平平,周培根,王艳,周颖,刘文杰,朱畅

(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, ZHU Chang
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词:壳聚糖酶;酶活力;发酵

Key words: chitosanase; enzyme activity; fermentation

中图分类号:TS201.2+5;S986.2 文献标识码:A

甲壳低聚糖(chitooligosaccharides)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,但该方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。已有学者研究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。

自从上世纪七十年代初期,Monaghan 等^[2]首次报道 *B. bassiana* 中存在壳聚糖酶(chitosanase, EC.3.2.1.99)以来,已在许多细菌、放线菌和真菌等微生物中发现了该酶。Masahiro Kurakake 等^[3]对 *Bacillus cereus* S1 所产壳聚糖酶进行了分离纯化和理化性质的研究。Makoto Shimosaka 等^[4]从 *Acinetobacter* sp. Strain CH101 发酵液中分离出两种壳聚糖酶,分别对其进行底物专一性和产物的测定。本研究采用本实验室分离得到的一株新的产壳聚糖酶的菌株进行发酵,将发酵液进行分离后得到粗酶液,对其酶的一些特性进行了研究。

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 $K_3Fe(CN)_6 \cdot Na_2CO_3$ 的配制采用黄伟干等的方法^[5]。

1.1.2 菌种

本实验室筛选得到。

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 方法

1.2.1 壳聚糖酶液的制备

取 10mL 菌悬液接入 100mL 液体培养基,置于 30℃ 120r/min 培养 3 天,静置分离,取上清液为粗酶液。

1.2.2 胶体壳聚糖制备

参考 Minoru Yabuki 等^[6]的方法。将 3.0g 壳聚糖溶于 200mL 0.2NHCl 中,先用 1N 的 NaOH 溶液调节 pH 至接近 9.0 时,再用 0.1N NaOH 精确调至 pH 9.0。得到的沉淀,用蒸馏水洗涤,然后 4 000r/min 离心 20min,其沉淀再用蒸馏水洗涤,直到上清液呈中性。最后用蒸馏水稀释沉淀,浓度为 1%(w/v),调 pH 为 5.6,制备成胶体壳聚糖。

1.2.3 壳聚糖酶活力测定

参考 Imoto^[7]和杜昱光等^[8]的方法并略加修改。在 1.0mL 1% 胶体壳聚糖(pH 5.6)溶液中,加入 1.0 mL 0.05mol/L pH 5.6 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 $K_3Fe(CN)_6-Na_2CO_3$,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℃、pH 5.6 时每分钟释放相当于 0.1 μ mol GlcN-HCl 还原糖的酶量。

1.2.4 壳聚糖酶稳定性测定

将壳聚糖酶液放置在 4℃ 下,定期测定酶的活力。以相对酶活力%来表示。

1.2.5 pH 对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

pH 对壳聚糖酶活性的影响在测定时,配制不同 pH 的底物的缓冲液:0.05mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0~5.5),0.05mol/L 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0~8.0)。

以不同 pH 缓冲液配成 0.5% 的胶体壳聚糖溶液为底物。取 2.0mL 底物溶液在 37℃ 保温 3min 后,加入 1.0mL 酶液,混匀,测定壳聚糖酶活力。

测定 pH 对壳聚糖酶稳定性的影响时,分别吸取 1.0mL 酶液在 1.0mL 不同的 pH(4.0~8.0)缓冲液中于 37℃ 保温 1hr,然后加入 1.0mL 1% 的胶体壳聚糖溶液(pH 5.6)在 37℃ 反应,测定壳聚糖酶的残余活力。

1.2.6 温度对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

温度对壳聚糖酶活性影响的测定时,以 pH 5.6 的乙酸缓冲液配成 0.5% 的胶体壳聚糖溶液为底物。预先将 2.0mL 0.5% 的胶体壳聚糖溶液(pH 5.6)在不同温度(30℃~60℃)下保温 3min,然后加入 1.0mL 的酶液,测定其酶活力。

壳聚糖酶的热稳定性测定时,首先将 1.0mL 酶液分别与 pH 4.5 和 6.0 0.05mol/L 的缓冲液混合,置于不同温度下保温 30min,然后立即在冰浴中冷却 5min,再与 1% 的胶体壳聚糖溶液(pH 5.6)在 37℃ 反应,测定壳聚糖酶的残余活力。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖酶稳定性

壳聚糖酶液的稳定性见图 1。结果表明,酶液在 4℃ 下贮存 8 天以内,表现出极高的稳定性,酶活力保持在 98% 以上。第 8 天到第 16 天,酶活力呈明显下降趋势,但仍在 85% 以上。16 天以后,酶活力急剧下降,到第 24 天时,已降到 55%。

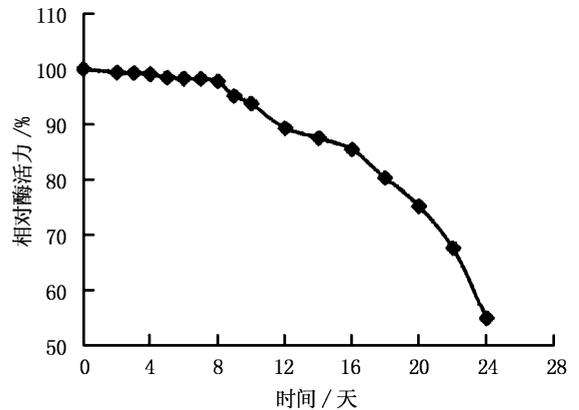


图 1 壳聚糖酶的稳定性

Fig. 1 The stability of chitosanase

2.2 pH对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

pH对壳聚糖酶活性的影响见图2。由图可以看出,以胶体壳聚糖为底物,分别在pH 4.5和pH 6.0处出现了两个壳聚糖酶的活性峰,而在pH值6.0~8.0之间,其活性随着pH值的升高而下降。Masahiro Kurakake等^[3]从*Bacillus cereus* S1发酵液中提取的酶最适pH为6.0,与本壳聚糖酶的最适pH 6.0一样。比F. A. T. Piza等^[9]报道的*Bacillus cereus*产的壳聚糖酶最适pH 5.8要略高一些。

由于粗酶液在pH 4.5和6.0处出现两个活性峰,以胶体几丁质为底物,未测定出此粗酶液中含有几丁质酶,推测可能含有两种壳聚糖酶,需进一步纯化分离才能确定。

图3为壳聚糖酶的pH稳定曲线。图中表明,壳聚糖酶在pH 6.0时37℃保温1hr后,酶的残余活性最大。在pH 4.0~6.0之间,酶活性快速上升,pH 5.0~6.0范围内,酶残余活性表现出较高的稳定性。在碱性条件下酶活性随着pH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,从而导致酶活性的急剧下降。

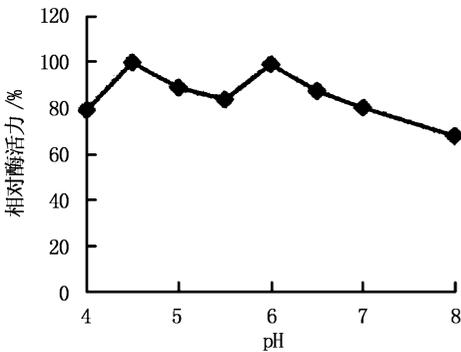


图2 pH对壳聚糖酶活力的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of chitosanase

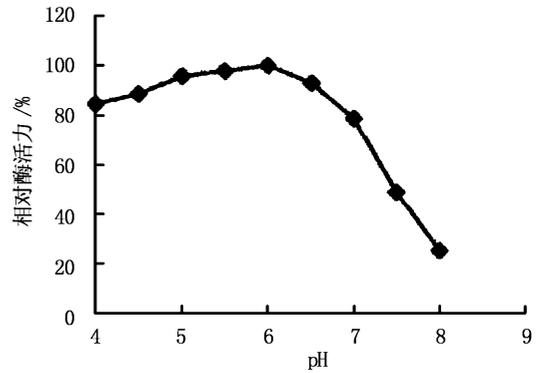


图3 pH对壳聚糖酶稳定性影响

Fig.3 Effect of pH on the stability of chitosanase

2.3 温度对壳聚糖酶活性及稳定性的影响

壳聚糖酶活性与温度的关系曲线见图4。以胶体壳聚糖为底物,当温度低于40℃时,壳聚糖酶的活性随温度的升高而增加。当温度高于55℃时,壳聚糖酶的活性随着温度的升高而下降,最适温度为40℃。在55℃时酶活力也很强,这与F. A. T. Piza等^[9]报道的*Bacillus cereus*产壳聚糖酶的最适温度54℃非常接近。两个壳聚糖酶的活性峰也更证实了粗酶液中可能含有两种壳聚糖酶的推测。

图5为壳聚糖酶在pH 4.5时的热稳定性曲线。由图中可以看出,壳聚糖酶在30℃~40℃间稳定性较好。40℃~55℃之间,酶活力呈下降趋势,但其残余活性保留在80%以上。在55℃以上,酶急剧失活。

图6为壳聚糖酶在pH 6.0时的热稳定性曲线。图中表明,壳聚糖酶在30℃~45℃间稳定性较好。45℃~55℃之间,酶活力开始明显下降,其残余活性保留在81%以上。50℃以上,壳聚糖酶活性迅速下降。

本研究对本实验室分离菌株所产壳聚糖酶的一些特性进行研究,发现此粗酶液有两个最适pH,而且在40℃和55℃有两个活性峰,经检测不含有几丁质酶,推测粗酶液中可能含有两种壳聚糖酶,但要得到确切的结论,需将粗酶液进行分离纯化和电泳分析,进一步研究其性质。

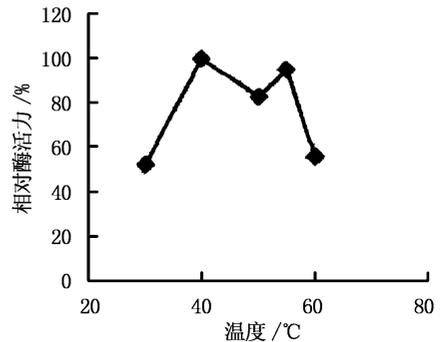


图4 温度对壳聚糖酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of chitosanase

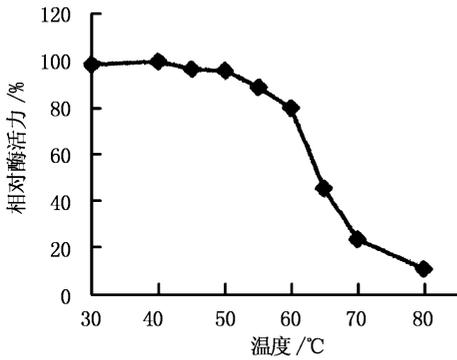


图 5 温度对壳聚糖酶稳定性影响(pH4.5)

Fig.5 Effect of temperature on the stability of chitosanase(pH 4.5)

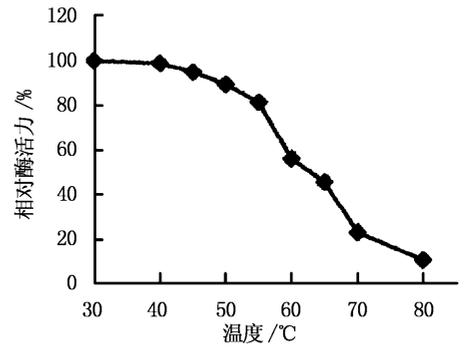


图 6 温度对壳聚糖酶稳定性影响(pH6.0)

Fig.6 Effect of temperature on the stability of chitosanase(pH 6.0)

参考文献：

- [1] Jeon Y J , Park P T , Kim S K . Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor[J] . Carbohydr Polym , 2001 44(1) : 71 - 76 .
- [2] Monaghan R L , Eveleigh D E , Tewari R P , et al . Chitosanase , a novel enzyme[J] . Nature New Biol , 1973 245(142) : 78 - 80 .
- [3] Masahiro Kurakake , Shou Yo-u , Kiyomi Nakagawa , et al . Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* SI[J] . Current Microbiology , 2000 , 40 : 6 - 9 .
- [4] Makoto Shimosaka , Masahiro Nogawa , XIU-ying Wang , et al . Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium , *Acinetobacter* sp. strain CHB101[J] . Applied and Environmental Microbiology , 1995 61(2) : 438 - 422 .
- [5] 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 .
- [6] Minoru Yabuki , Akira Uchiyama , Kuniko Suzuki , et al . Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1[J] . J Gen Appl Microbiol , 1988 34 : 255 - 270 .
- [7] Imoto T , Yagishita K . A simple activity measurement of lysozyme[J] . Agric Biol Chem , 1971 35(7) : 1154 - 1156 .
- [8] 杜昱光 , 方祥年 , 黄秀梨 , 等 . 球孢白僵菌高壳聚糖酶突变株的筛选[J] . 微生物学通报 , 2001 , 28(3) : 60 - 64 .
- [9] F A T Piza , A P Siloto , C V Carvalho , et al . Production , characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*[J] . Brazilian Journal of Chemical Engineering , 1996 16(2) .