

海洋细菌 11211 的生长条件及其几丁质酶研究^{*}杨承勇¹, 周世宁¹, 周毅频², 林永成³

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从南海海水中分离到产几丁质酶的弧菌 (*Vibrio* sp.), 研究了菌株 11211 的生长条件和产酶条件. 11211 菌生长需要 Na^+ , 海水的其他成分对菌生长也有影响. 胶体几丁质可诱导几丁质酶产生. 在几丁质培养基中 11211 菌的产酶高峰为生长的第 7 天. 经硫酸铵沉淀, Sephadex G-100、DEAE-纤维素及几丁质柱层析, 酶被纯化了 18 倍. 经 SDS-PAGE 分析, 酶的相对分子质量约为 30 000. 该酶的反应动力学特征也被初步研究.

关键词: 海洋细菌; 几丁质; 几丁质酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A

几丁质是自然界中含量最丰富的生物多聚物之一. 它是构成大多数真菌细胞壁的主要成分, 同时也大量存在于昆虫等动物的甲壳中. 自然界中几丁质的降解主要是通过几丁质酶的作用. 由于几丁质酶在生物防治、环境保护、医学、化工等方面具有潜在的应用价值而受到广泛地关注. 海洋环境中存在着大量几丁质, 其降解主要由海洋细菌完成, 因此海洋细菌是几丁质酶的重要来源. 目前国外已分离出产几丁质酶的海洋细菌^[1]. 本研究组从中国南海采样筛选, 得到了一株产几丁质酶的弧菌 11211. 本文报道了该菌株的生长、几丁质酶的产生及所产几丁质酶的基本特征.

1 材料和方法

1.1 菌 种

菌种从中国南海海水中分离得到, 保存在中山大学生命科学学院.

1.2 试 剂

胶体几丁质自制; Sephadex G-100, DEAE-纤维素, N-乙酰氨基葡萄糖为 Sigma 公司产品; 相对分子质量标准蛋白为 Life Technology (USA) 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯试剂.

1.3 培养基

2216 培养基: 用于菌种保存及一般菌种培养.

几丁质培养基: 酵母膏 1 g, FePO_4 0.01 g, 胶体几丁质 5 g, 人工海水 1 000 mL, pH 7.5.

无钠培养基: 自制无钠酪蛋白水解液 10 mL, 葡萄糖 2 g, ddH_2O 90 mL.

1.4 方 法

1.4.1 菌种筛选和产酶培养 应用几丁质培养基于 28 °C 振荡培养 7 d, 离心检测酶活,

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870023); 华南生物科学与技术研究中心资助项目

收稿日期: 1999-12-21; 作者简介: 杨承勇 (1972 ~), 男, 讲师; 通讯联系人, 周世宁.

选取产酶活性高的菌株.

1.4.2 几丁质酶活力的测定 1 mL 酶液与 1 mL (10 mg/mL) 胶体几丁质混合, 40 °C 保温 30 min, 放入沸水浴 5 min 中止反应, 立即冷却, 取 1 mL 上清液测其还原糖含量. 一个酶活力单位 (U) 被定义为在 40 °C 下每 min 生成 1 μ mol N-乙酰氨基葡萄糖所需的酶量. 千分之一酶活单位写作 mU.

1.4.3 蛋白含量的测定 用考马斯亮兰法^[2].

1.4.4 Na^+ 浓度对生长的影响 应用酸水解并透析除 Na^+ 的酪蛋白水解液, 制成无钠培养基; 以 NaCl 溶液配成不同 Na^+ 浓度的系列培养基; 然后, 每瓶接入经摇床 12 h 培养的菌种, 28 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 测定吸光度 (A_{600}); 以大肠杆菌作平行对照实验.

1.4.5 酶的提纯 硫酸铵沉淀: 发酵液离心取上清, 加硫酸铵到 80% 饱和度, 离心收沉淀, 溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 对同一缓冲液透析 24 h.

Sephadex G-100 柱层析: 洗脱液为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 流速 20 mL/h.

DEAE-纤维素柱层析: 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 平衡和洗涤, 以含 0→50 mmol/L NaCl 的缓冲液作线性离子梯度洗脱, 流速 30 mL/h.

几丁质柱亲和层析: 平衡和洗涤用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 以 20 mmol/L 乙酸钠缓冲液进行 pH 梯度 (pH 5.5~3.0) 洗脱, 流速 10 mL/h. 合并含酶洗脱液, 调 pH 至 6, 装入透析袋, 用 $\rho=20\%$ PEG (20 000) 进行浓缩.

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

用 $\rho 10.5\%$ 聚丙烯酰胺和 $\rho 0.1\%$ SDS, 制备凝胶, 并进行电泳.

2 结 果

2.1 菌种筛选

从 326 株海洋分离的细菌中, 5 株被确认能产生较高的几丁质酶活性, 均被鉴定为弧菌属细菌. 菌株 11211 产酶活性最高达 19 mU/mL.

2.2 Na^+ 和海水成分对 11211 菌的生长影响

在无钠培养基中, 即 $c(\text{Na}^+)$ 为零时, 11211 不能生长; 当 $c(\text{Na}^+)$ 为 0.2 mol/L 浓度时得到最好生长 (图 1), 用人工海水和陈海水的对照实验中, 后者对生长更有利. 而用 NaCl 溶液代替海水时, 生长情况不如人工海水, 更不如陈海水 (图 2).

2.3 产酶条件

2.3.1 碳源和几丁质对酶产生的影响 中只有几丁质培养基才能诱导产生几丁质酶. 用

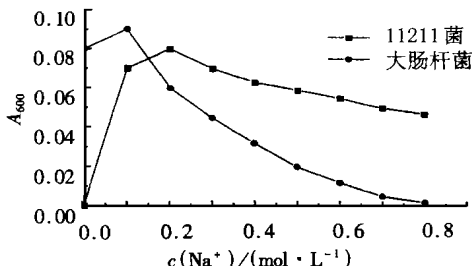


图 1 Na^+ 浓度对生产的影响

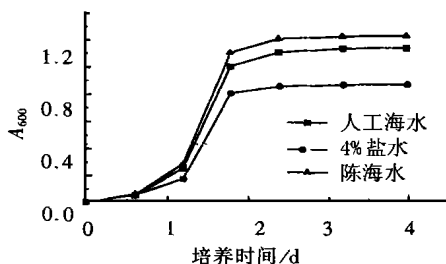


图 2 海水成分对生长的影响

Fig 1 Effect of Na^+ concentration on the growth

Fig 2 Effect of components of sea water on the growth

葡萄糖, 乙酰氨基葡萄糖, 甘油或者可溶性淀粉代替几丁质培养基中的几丁质, 均不能产生几丁质酶活性. ρ 0.5%的胶体几丁质浓度有最好的产酶效果.

2.3.2 氮源对酶形成的影响 在几丁质培养基中, 不同氮源对产酶的影响见表 1; 其中 0.5%酵母膏对产酶最有利.

2.3.3 起始 pH 和培养温度对产酶的影响 起始 pH 为 6~8 时有较好的产酶能力, pH 7~7.5 时最好. 28℃培养温度是产酶的最适温度, 低于 18℃或高于 35℃, 产酶量下降一半. 当温度高于 40℃时, 几乎没有酶活产生.

表 1 氮源对产酶的影响

Tah 1 Effect of nitrogen source on chitinase production

N 源	相对酶活性/ %
0.5% 酵母膏	100
0.5% 蛋白	64
0.5% 牛肉膏	60
0.5% 酪蛋水解液	35
0.2% NaNO ₃	28
0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	27

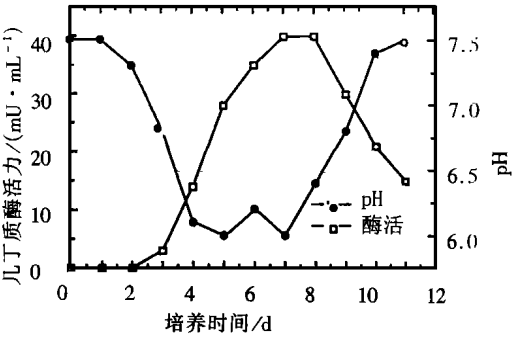


图 3 产酶时间曲线与 pH 变化

Fig. 3 Time course of chitinase production of strain 11211

2.3.4 培养时间与产酶关系 最初 2 d, 不能检测到酶活性, 第 3 天酶活性开始上升, 到第 7 天达到高峰 (图 3). 在此期间, pH 从 7.5 下降至 6.0, 后期回升至 7.5.

2.4 酶的纯化

发酵液经硫酸铵沉淀, Sephadex G-100、DEAE-纤维素及几丁质柱层析, 最后得到比活力为每 mg 蛋白 36.5 U 的酶制备物, 纯化了 18 倍, 回收率为 33% (表 2).

表 2 几丁质酶的纯化

Tah 2 Purification of chitinase

步骤	总蛋白/ mg	总活力/ U	比活/ (U · mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/ %
发酵液	121	242	2.0	1.0	100
硫酸铵沉淀	101	212	2.1	1.1	87.6
Sephadex G-100 柱	10	155	15.5	7.8	64.0
DEAE-纤维素柱	3.4	118	34.8	17.4	48.7
几丁质柱	2.2	80	36.5	18.3	33.0

2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

经纯化后, 酶蛋白呈单一电泳带, 相对分子质量约为 30 000 (图 4).

2.6 酶的基本特征

2.6.1 最适温度和 pH 经纯化后的酶反应最适温度为 50℃, 超过此温度活力下降迅速; 最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 4.0~8.5 范围内, 其活力保持在最适 pH 时的 80%以上.

2.6.2 热稳定性 在 2 h 试验中, 40℃以下, 该酶较稳定, 但更高的温度下变得不稳定, 如在 70℃条件下, 1 h 内酶活全部丧失.

2.6.3 酸碱度的影响 pH 6~8 的处理对酶活几乎没有影响; 当 pH<6 和 pH>8 时,

酶活性均明显下降.

3 讨 论

对 Na^+ 的依赖被认为是典型海洋微生物的特征之一^[3], 11211 在没有添加 Na^+ 的培养基中不能生长, 表明它的海生特性. 海水的其他成分对其生长也是重要的. 11211 菌在几丁质培养基中生长缓慢的原因可能与营养因素有关, 因为它在 2216 培养基中生长是相当快的. 几丁质培养基中, 几丁质是主要的碳氮源, 且是一种难利用的物质. 细菌需要产生相当的酶降解几丁质然后才能利用. 而几丁质酶的产生可能不是几丁质本身诱导的, 而是其降解物如寡聚物.

与已报道的微生物几丁质酶比较, 来自 11211 的几丁质酶对酸碱变化不大敏感, 但对温度升高较敏感. 其相对分子质量 30 000 接近从植物分离到的酶^[3]; 来自芽孢杆菌的酶为 59 000 ~ 89 000^[4], 链霉菌的为 41 000 ~ 44 000^[5], 来自海洋细菌 *Aeromonas hydrophila* 的为 62 000^[1], 因此, 11211 菌产生的几丁质酶可能是一种新的酶.

参考文献:

- [1] HIRAGA K, SHOU L, KITAZWA M, et al. Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330 [J]. *Biotechnol Biochem*, 1997, 61: 174 ~ 176.
- [2] 郑昌学. 生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 1990.
- [3] TSUKAMOTO T, KOGA D, IDE A, et al. Purification and some properties of chitinase from yam, *Dioscorea opposita* Thunb [J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48: 931 ~ 939.
- [4] TAKAYANAI T, AJISAKA K, TAKIGUCHI Y, et al. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1078: 404 ~ 410.
- [5] UENO H, MIYASHITA K, SAWADA Y, et al. Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* sp. s-84 [J]. *Gen Appl Microbiol*, 1990, 36: 377 ~ 392.

Studies on the Growth and Chitinase Production of a Marine Bacterium 11211

* YANG Cheng-yong, ZHOU Shi-ning, ZHOU Yi-pin, LIN Yong-cheng

Abstract: Bacterium 11211 which produces chitinase was isolated from the South China Sea. The growth condition and chitinase production of bacteria were investigated. Na^+ was necessary for bacterium 11211 growth. Colloid chitin could induce bacteria to produce chitinase. The growth of bacteria was slow in the medium containing colloid chitin as main carbon source, and the enzyme activity reached maximum on 7 d of incubation. Following the purification, the enzyme was characterized and its molecular weight was estimated by SDS-PAGE.

Keywords: marine bacteria; chitin; chitinase

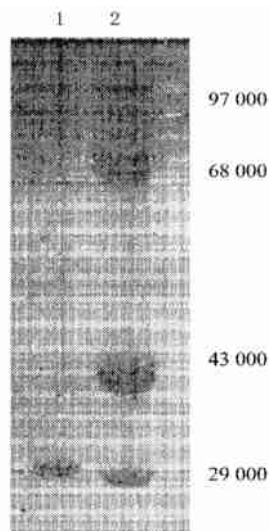


图 4 几丁质酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig 4 SDS-PAGE of chitinase

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China