

酸橙内生菌*Bacillus thuringiensis* Bt028几丁质酶的分离纯化及其酶学性质

徐勤茜, 朱国威, 赵梓伶, 陶雪婷, 李子院, 郝再彬, 李海云

Separation, Purification and Characterization of Chitinase of the Endophytic Bacterium *Bacillus thuringiensis* Bt028 Isolated from Sour Orange

XU Qinqian, ZHU Guowei, ZHAO Ziling, TAO Xueting, LI Ziyuan, HAO Zaibin, and LI Haiyun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100184>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

克氏原螯虾壳膜几丁质酶的分离纯化

Isolation and Purification of Chitinase from Shellfish of *Procambarus clarkii*

食品工业科技. 2018, 39(23): 159–163

双齿围沙蚕 β -1,3-葡萄糖苷酶分离纯化及其酶学性质

Purification and characterization of β -1, 3-glucosidase from *Perinereis aibuhitensis*

食品工业科技. 2017(10): 227–230

醋酸菌中乙醛脱氢酶的分离纯化及酶学性质

Isolation, purification and enzymatic properties of aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter pomorum*

食品工业科技. 2018, 39(10): 100–104

新型耐热耐酸普鲁兰酶的分离纯化与酶学特性分析

Purification and Enzymatic Characterization of a Novel Acid-resistant and Thermostable Pullulanase

食品工业科技. 2019, 40(4): 75–81

产低温几丁质酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化

Screening and Identification of a Cold-adapted Chitinolytic Bacterium Strain and Optimization of Its Chitinase Fermentation Conditions

食品工业科技. 2020, 41(23): 85–90,98

海洋来源产低温几丁质酶菌株的诱变选育及酶学性质研究

Mutation Breeding and Enzymatic Properties of Cold-adapted Chitinolytic Strain *Photobacterium* sp. from Marine

食品工业科技. 2021, 42(10): 105–111



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐勤茜, 朱国威, 赵梓伶, 等. 酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 几丁质酶的分离纯化及其酶学性质 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 159–166. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100184

XU Qinlian, ZHU Guowei, ZHAO Ziling, et al. Separation, Purification and Characterization of Chitinase of the Endophytic Bacterium *Bacillus thuringiensis* Bt028 Isolated from Sour Orange[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 159–166. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100184

· 生物工程 ·

酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 几丁质酶的分离纯化及其酶学性质

徐勤茜¹, 朱国威¹, 赵梓伶¹, 陶雪婷¹, 李子院^{1,2}, 郝再彬^{1,2}, 李海云^{1,2,*}

(1.桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林 541004;

2.广西高校食品安全与检测重点实验室, 广西桂林 541004)

摘要: 为揭示酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 几丁质酶的基本酶学性质, 采用离心、硫酸铵盐析、葡聚糖凝胶 G-100 层析及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法对菌株 Bt028 发酵液中的几丁质酶进行分离纯化鉴定, 并考察该几丁质酶的最适温度、最适 pH、催化动力学参数等性质。结果表明, Bt028 菌株发酵液经离心、硫酸铵盐析、葡聚糖凝胶 G-100 层析分离纯化后获得电泳纯几丁质酶比活力为 681.78 U/mg, 纯化倍数为 3.21, 回收率 15.52%。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 几丁质酶的分子质量为 65 kDa。酶学性质研究结果表明, 该酶的最适反应温度为 60 ℃, 最适反应 pH 为 6.5, 在温度低于 60 ℃、pH 5.5~7.5 时有较好的稳定性; Mg²⁺、Ca²⁺、Hg²⁺、Co²⁺对该酶活力有抑制作用, 而 Cu²⁺和 Fe³⁺有一定的促进作用; 低浓度的甲醇、乙醇、正丙醇和二甲亚砜使酶的活性增加, 但当浓度继续增大, 反而会抑制酶的活性; 丙酮对几丁质酶有激活作用, 而甲醛对几丁质酶有抑制作用。在最适催化条件下, 几丁质酶催化反应的米氏常数 Km、最大反应速率 V_{max}、酶的转换数 K_{cat} 分别为 29.533 mg/mL、108.696 μmol/(L·min) 和 0.527/min。研究结果可为该酶的实际应用提供必要的工艺参数。

关键词: 酸橙, 内生菌, 几丁质酶, 酶学性质, 分离纯化

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)11-0159-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100184

本文网刊:



Separation, Purification and Characterization of Chitinase of the Endophytic Bacterium *Bacillus thuringiensis* Bt028 Isolated from Sour Orange

XU Qinlian¹, ZHU Guowei¹, ZHAO Ziling¹, TAO Xueting¹, LI Ziyuan^{1,2}, HAO Zaibin^{1,2}, LI Haiyun^{1,2,*}

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection,
Guilin 541004, China)

Abstract: In order to reveal the basic enzymatic properties of the chitinase produced by an endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* Bt028 isolated from sour orange fruit, the chitinase in the strain fermentation broth were purified by centrifugation, ammonium sulfate precipitation, dextran gel G-100 chromatography and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the optimum temperature, optimum pH and catalytic kinetic parameters of the chitinase were also investigated. The results showed that electrophoretic pure chitinase was obtained by centrifugation, ammonium sulfate precipitation and dextran G-100 gel chromatography from fermentation broth of the strain Bt028, with the specific activity of 681.78 U/mg, the purification factor of 3.21 and enzymatic activity recovery of 15.52%, and the molecular mass of the chitinase was determined to be 65 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzymatic characteristics study

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD18050001); 国家自然科学基金项目 (31460409); 广西自然科学基金 (2016GXNSFAA380014)。

作者简介: 徐勤茜 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化与生物转化, E-mail: xuqinlian77@163.com。

* 通信作者: 李海云 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化与生物转化, E-mail: xglihaiyun@126.com。

results showed that the optimum reaction temperature of the chitinase was 60 °C with good stability when temperature lower than 60 °C; and the optimum reaction pH was 6.5 with good stability at pH 5.5~7.5. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} and Co^{2+} had inhibitory effect on the enzyme activity, while Cu^{2+} and Fe^{3+} had a certain promotion effect. Low concentrations of methanol, ethanol, n-propanol and dimethyl sulfoxide increased the enzymatic activity, however, the chitinase would be inhibited when the concentration of these organic solvents were increased to a certain level. The chitinase could be activated by acetone but inhibited by formaldehyde. Under the optimal catalytic conditions, the value of K_m , V_{max} and K_{cat} of the chitinase-catalyzed reaction were 29.533 mg/mL, 108.696 μ mol/(L·min) and 0.527/min, respectively. Research results provide technical parameters for the practical application of the chitinase.

Key words: sour orange; endophytic bacterium; chitinase; enzymatic properties; separation and purification

几丁质是由 N-乙酰-D-葡萄糖胺组成的直链多聚物^[1-3], 在自然界中含量仅次于纤维素^[4-5]。由于几丁质与天然物机体细胞有良好的生物兼容性^[6-8], 因此广泛应用于食品、医药、生物工程、农业等方面^[9-11], 但由于自然状态下几丁质多以晶体状态存在, 不溶于水且不易降解, 这极大地限制了几丁质的应用。目前降解几丁质的方法主要有化学法、物理法和酶解法^[12]。然而化学法反应条件比较严苛, 且反应产物不均一, 对环境污染严重; 物理法由于生产成本比较高, 不适用于工业化生产; 酶解法与物理法和化学法相比, 有降解反应专一性强, 不产生环境污染, 可控制聚合度而且副反应少等优点, 是目前最环保高效的降解几丁质方法^[13-15]。几丁质酶(EC3.2.1.14)可以特异性催化几丁质降解, 得到 N-乙酰氨基葡萄糖和聚合度为 2~10 的几丁寡糖, 研究表明这些产物对人体的生态调节功能具有较好的改善提高作用^[16-18]。

近年来, 几丁质酶由于在制备几丁寡糖、食品保鲜等方面具有巨大的应用潜力而备受关注^[19]。微生物来源的几丁质酶由于生产速度快、产量高且性能稳定, 目前已成为几丁质酶的主要来源^[20-21]。几丁质酶的酶学特性是其应用的基础, 国内外研究者对微生物来源几丁质酶的酶学特性进行了大量研究, 如 Du 等^[22]从一株分离自土壤样品的细菌 *Paenibacillus* sp. 发酵液中纯化得到一种分子量为 30 kDa 的几丁质酶, 其最佳 pH 为 4.5, 最佳温度为 50 °C; Guo 等^[23]对 *Paenibacillus pasadenensis* CS0611 胞外几丁质酶进行纯化, 测定几丁质酶分子量为 69 kDa, 最适 pH 和最适温度分别为 5.0 和 50 °C; 苏明慧等^[24]从安徽西瓜种植地根际土壤分离所到一株短短芽孢杆菌 FM4B, 对其发酵液中的几丁质酶进行分离纯化, 获得分子质量为 66 kDa 几丁质酶纯品, 且酶活力在 pH 5.0~9.0 稳定; 刘蒲临等^[25]将土壤中分离出的侧孢短芽孢杆菌 CDY64 几丁质酶基因表达于大肠杆菌 BL21 中, 纯化后的几丁质酶最适反应温度为 60 °C, 在 pH 6.0~8.0 范围内均表现出良好的活性。可见, 不同微生物来源的几丁质酶的性质可能不同。目前尚未见有酸橙内生菌产几丁质酶的酶学性质研究。

本研究以前期筛选获得的一株产几丁质酶活性较高的酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 为研究对象, 对其发酵液中的几丁质酶进行分离纯化, 并对该几丁质酶的酶学性质进行研究, 为该酶的应用奠

定基础, 同时也为不同生物来源的几丁质酶系的性质和功能的比较研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酸橙 采自桂林永福苏桥镇, 新鲜酸橙果实; 酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 分离自酸橙果实, 保存于桂林理工大学生物工程实验室; 几丁质、3,5-二硝基水杨酸、 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖 分析纯, 购于上海易恩化学技术有限公司; 硫酸镁、硫酸亚铁 分析纯, 购于天津市大茂化学试剂厂; 蛋白胨、酵母粉、琼脂磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铵、Tris 分析纯, 购于西陇化工股份有限公司; 低分子量蛋白质 Marker PR1400、葡聚糖凝胶 G-100 北京索莱宝科技有限公司; 活化培养基 蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 5 g/L、琼脂 15 g/L; 几丁质酶发酵培养基 胶体几丁质 10 g/L、酵母粉 10 g/L、 K_2HPO_4 0.7 g/L、 KH_2PO_4 0.3 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, pH 7.0。

LRH-150-Z 振荡培养箱 珠江留关市泰宏医疗器械有限公司; BX30R 立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司; CJ-ISFS 医疗设备超工作台 天津市泰斯特仪器有限公司; VIS-7220N 可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; HH-S2 数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂; ZXRD-B5110 鼓风干燥箱 上海智城分析仪器制造有限公司; Bio-Rad 电泳仪、小型垂直电泳槽 上海孚约商贸有限公司; BSZ-160 自动部分收集器、HL-2B 恒流泵 上海青浦沪西仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 几丁质酶的分离纯化

1.2.1.1 几丁质酶粗酶液的制备 参考文献 [24] 的方法并加以改进, 将斜面保存的 *Bacillus thuringiensis* Bt028 经平板培养活化 24 h 后, 挑取一环接入 100 mL 几丁质酶发酵培养基中(250 mL 三角瓶), 在温度为 30 °C, 转速为 180 r/min 的摇床上振荡培养 24 h, 即为种子液。将种子液按照 3% 的接种量接入到装有 100 mL pH 7.0 的几丁质酶发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 在温度为 30 °C、转速为 180 r/min 的摇床上振荡培养 48 h。发酵液在 4 °C、12000 r/min 条件下离心 10 min, 收集上清液即为粗酶液, 4 °C 冰箱储存。

1.2.1.2 硫酸铵盐析 参考刘美艳等^[26]的方法并略作修改: 分别取 10 mL 粗酶液 8 份置于烧杯中, 加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节使各烧杯中酶液的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度分别为 0%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%, 4 ℃ 下静置过夜后, 10000 r/min 离心, 测定上清液中总蛋白含量及几丁质酶活力, 并绘制 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析曲线。根据 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析曲线确定菌株 Bt028 几丁质酶的分级沉淀条件后, 对菌株 Bt028 发酵液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析。盐析后的沉淀加入适量 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 缓冲液溶解后装入透析袋内, 4 ℃ 下用 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液透析除盐。

1.2.1.3 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 层析 在室温下, 将葡聚糖凝胶干粉浸泡于蒸馏水中充分溶胀后装柱(1 cm×70 cm), 并用 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5, 含有 0.2 mol/L NaCl) 缓冲液平衡后, 取 1.0 mL 经透析除盐的酶液, 上样于层析柱, 用相同的缓冲液洗脱, 流速为 8 mL/h, 分管收集洗脱液, 每管收集 3.5 mL, 检测并收集有酶活性的洗脱峰。

1.2.1.4 几丁质酶纯度和分子量测定 参考陈茜文等^[11]方法用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定纯化前后几丁质酶纯度及相对分子质量。

1.2.2 菌株 Bt028 几丁质酶的酶学性质

1.2.2.1 最适反应温度及热稳定性 分别选取 30、40、50、60、70、80 ℃ 作为酶催化反应温度, 测其酶活, 以确定菌株 Bt028 几丁质酶的最适反应温度。将菌株 Bt028 几丁质酶酶液置于 35、40、45、50、55、60、65、70 ℃ 水浴中保温不同时间后, 取样测定酶液的剩余酶活力, 考察酶的热稳定性。

1.2.2.2 最适 pH 及 pH 稳定性 在最适反应温度条件下测定几丁质酶 pH 为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 时酶活力, 确定菌株 Bt028 几丁质酶的最适反应 pH。将几丁质酶液 pH 调为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 在 30 ℃ 下放置 0、1、2、3、4、5、6 h, 测定酶液的剩余酶活力, 考察 pH 对菌株 Bt028 几丁质酶稳定性的影响。

1.2.2.3 金属离子的影响 在 30 ℃ 条件下, 向底物胶体几丁质溶液中分别加入 1 mmol/mL 不同的金属离子如 Mg^{2+} ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、 Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、 Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 等, 与酶液混合后反应测定几丁质酶活力, 以不加金属离子为对照, 考察不同金属离子对几丁质酶酶活力的影响。

1.2.2.4 有机溶剂对几丁质酶活的影响 选择甲醇、乙醇、正丙醇、甲醛、丙酮、二甲亚砜为效应物, 在底物胶体几丁质溶液中加入 0%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、22.5%、25% 的效应物, 调 pH 为 6.5, 在 60 ℃ 条件下测定酶的相对活力, 分析研究效应物对 Bt028 几丁质酶活力的影响。

1.2.2.5 酶催化反应动力学常数测定 分别取含

0.2%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0% 胶体几丁质的磷酸缓冲液与 pH 为 6.5 几丁质酶液在 60 ℃ 条件下反应, 根据底物浓度对酶催化反应速率的影响, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数法构建动力学模型, 计算菌株 Bt028 几丁质酶催化胶体几丁质水解的米氏常数 K_m 、最大速度 V_{max} 以及转换数 K_{cat} 。

1.2.3 几丁质酶酶活的测定 参考戴德慧等方法^[27]略作修改: 取 0.5 mL 粗酶液与 0.5 mL 含 1.0% 胶体几丁质的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.0)混合, 50 ℃ 保温 20 min 后, 沸水浴 10 min, 流水冷却。加入 1.0 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 流水冷却后用蒸馏水稀释至 10 mL, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定波长 540 nm 处吸光度(以不含胶体几丁质的磷酸缓冲液为参照)。根据 $A_{540\text{ nm}}$ 在 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线上查得还原糖的释放量并计算酶活力。以每分钟催化几丁质生成相当于 1 μmol β -D-N-乙酰氨基葡萄糖所需的酶量为一个酶活单位。相对酶活(%)=(实验组酶活/空白组酶活)×100。

1.2.4 蛋白质含量的测定 参考聂昌宏^[28]方法, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。相对蛋白质含量(%)=(实验组蛋白质含量/空白组蛋白质含量)×100。

1.3 数据处理

实验中每个处理重复三次, 采用 SPSS 软件分析数据的显著性, 利用 Origin 以及 Excel 对实验数据处理分析并进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵盐析 苏云金芽孢杆菌 Bt028 发酵液经过离心后, 取上清液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析, 盐析后的上清液中蛋白质浓度和几丁质酶活随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度的变化情况如图 1 所示。由图 1 可见, 上清液中的几丁质酶活力和总蛋白含量均随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度的增加而降低; 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度低于 20% 时, 总蛋白含量下降的趋势快于几丁质酶活力下降趋势, 表明杂蛋白盐析的速度比几丁质酶快; 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度大于 20% 后, 上清液中酶活迅速降低, 说明此时几丁质酶不断被沉淀出来; 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度达到 70% 时, 上清液中几乎检测

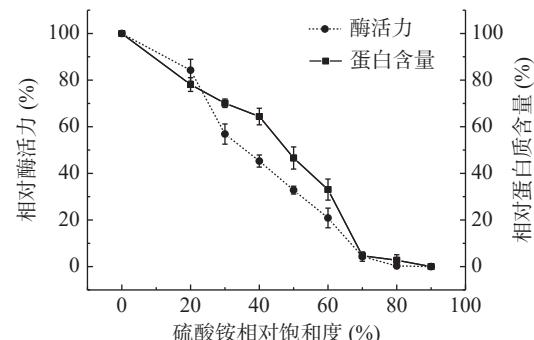


图 1 硫酸铵盐析曲线

Fig.1 Salting out curve of ammonium sulfate

不到几丁质酶活, 说明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度达到 70% 时几丁质酶已基本沉淀完全。据上综合考虑, 确定硫酸铵盐析方案为: 20% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析除杂、70% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀几丁质酶。当盐浓度增高到一定数值时, 会导致水活度降低, 进而使蛋白质分子表面电荷逐渐被中和, 使蛋白质相互结合聚集形成沉淀析出^[29]。本研究所确定的沉淀区间获得的酶回收率为 61.24%, 比郭金玲等^[30]以 35%~80% 硫酸铵饱和区段对黑曲霉 *Aspergillus niger* 粗酶液进行沉淀, 酶的回收率为 47.26% 更高。

2.1.2 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析 经硫酸铵沉淀后的酶液采用 Sephadex G-100 凝胶层析, 洗脱曲线见图 2。

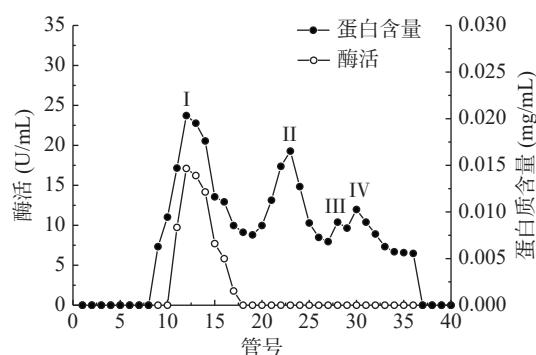


图 2 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of Sephadex G-100 Dextran gel chromatography

图 2 显示, 样品通过凝胶层析, 共获得 4 个蛋白峰, 其中峰 I 具有最高的几丁质酶活力, 收集该峰浓缩浓缩后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2.1.3 几丁质酶纯化结果分析和纯度鉴定 Bt028 所产几丁质酶的纯化结果总结于表 1。从表 1 可以看出, 苏云金芽孢杆菌 Bt028 发酵液中几丁质酶经硫酸铵盐析和葡聚糖 G-100 凝胶层析后, 所获几丁质酶的比活力达 681.78 U/mg, 纯化倍数 3.21 倍, 酶回收率为 15.52%。目前已有诸多关于不同来源几丁质酶的分离纯化报道, 如高兆建等^[31]通过硫酸铵沉淀、DEAE-Cellulose A52 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析纯化得到均一的 Chi-Pc76, 最终纯化倍数为 17.1 倍, 回收率 21.6%; Farag 等^[32]对海洋来源土曲霉培养液中的几丁质酶通过硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤层析以及离子交换色谱进行分离纯化, 纯化倍数 5.16, 回收率为 12%。本

表 1 苏云金芽孢杆菌 Bt028 几丁质酶的纯化结果

Table 1 Purification results of chitinase produced by *Bacillus thuringiensis* Bt028

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
粗酶液	8.69	1845	212.31	1	100
硫酸铵沉淀	4.57	1129.83	247.23	1.16	61.24
G-100葡聚糖凝胶层析	0.42	286.34	681.78	3.21	15.52

文通过硫酸铵盐析及 Sephadex G-100 凝胶层析即可获得纯度较高的几丁质酶, 说明本文所采用的 Bt028 菌株产生的杂蛋白较少, 在几丁质酶合成中具有较好的应用潜力。

几丁质酶纯化样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图见图 3。由条带 3 可以看出纯化后得到单一蛋白条带, 其相对分子质量约为 65 kDa。不同微生物来源的几丁质酶的分子量差异较大, 一般在 10~110 kDa 之间, 如大部分细菌所产几丁质酶的分子量在 60~110 kDa 之间, 放线菌的一般不高于 30 kDa, 而真菌所产几丁质酶的则高于 30 kDa^[33]。不同来源的苏云金芽孢杆菌几丁质酶相对分子量之间也存在较大差异, 如刘佳等^[34]从 Bt HD-73 菌株中克隆、重组的几丁质酶 Chi73 分子量为 77 kDa。

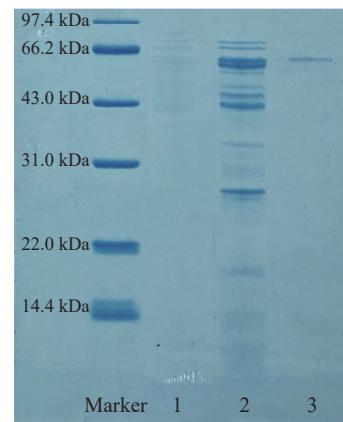


图 3 菌株 Bt028 产几丁质酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of chitinase from *Bacillus thuringiensis* Bt028

注: Marker: 标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: 20%~70% 硫酸铵盐析酶液; 3: 葡聚糖凝胶 G100 层析酶液。

2.2 几丁质酶的酶学性质

2.2.1 几丁质酶的最适反应温度和热稳定性 在不同温度下测定菌株 Bt028 几丁质酶的酶活, 结果如图 4 所示。结果表明: 在 60 ℃ 时酶活显著提高 ($P<0.05$), 故该几丁质酶的最适反应温度为 60 ℃, 比丁志雯等^[35]从 *Dyadobacter* sp. CZW019 中得到的几丁质酶反应最佳温度(35 ℃)高。几丁质酶的热

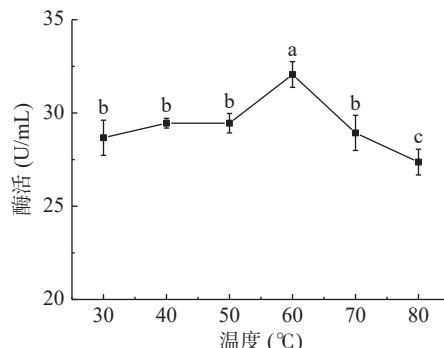


图 4 几丁质酶的最适反应温度

Fig.4 Optimum reaction temperature of chitinase

注: 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$); 图 6、图 8 同。

稳定性结果如图 5 所示, 在温度低于 60 ℃ 范围内酶的热稳定性良好, 超过 60 ℃ 后随着保温时间的增加, 酶活力迅速下降, 热稳定性变差。

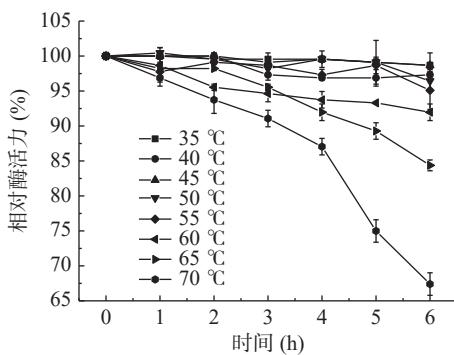


图 5 几丁质酶的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of chitinase

2.2.2 几丁质酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性 pH 能显著影响酶反应速率, 由图 6 可以看出, 当 pH 为 6.5 时酶活显著提高 ($P<0.05$), 说明苏云金芽孢杆菌 Bt028 最适反应 pH 为 6.5。当 pH 高于或者低于 6.5 时, 酶活迅速降低。pH 对酶活性的影响并不是因为作用于整个酶分子, 从而影响酶分子的解离状态, 而是由于酶的活性中心或与之有关的基团的解离状态被改变, 从而使酶的活性状态发生改变, 因此过酸和过碱都会大大降低酶的活性。菌株 Bt028 几丁质酶的最适 pH 与来源于其它芽孢杆菌的几丁质酶最适 pH 高, 如来源于短短芽孢杆菌的几丁质酶最适 pH 为 6.0^[24], 但明显比苏云金芽孢杆菌来源的几丁质酶

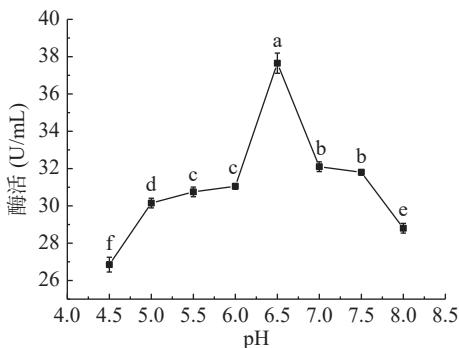


图 6 几丁质酶的最适反应 pH

Fig.6 Optimum reaction pH of chitinase

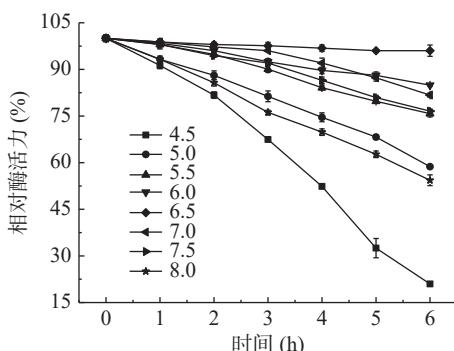


图 7 几丁质酶的 pH 稳定性

Fig.7 pH stability of chitinase

的最适 pH 为 7.0 低^[34], 说明两者性质存在差别, 并不是同一种几丁质酶。几丁质酶的 pH 稳定性结果如图 7 所示, 在 pH 5.5~7.5 范围内, 该几丁质酶稳定性较好, 当 pH 低于 5.5 或高于 7.5 后, 随着时间的延长, 相对酶活逐渐降低; 当 pH 为 6.5 时其稳定性最好, 处理 6 h 后相对酶活力仍在 90% 以上。

2.2.3 金属离子对几丁质酶活性的影响 从图 8 可以看出, 与空白相比, Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 这四种金属离子对几丁质酶有一定程度的抑制作用, 但酶仍具有一定的活性, 其中 Mg^{2+} 的抑制作用最为明显; Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 使酶活力显著提升 ($P<0.05$)。金属离子能够与酶形成络合物, 从而维持或破坏其三维结构和构型, 在生物催化中起重要作用^[31]。张瑶心等^[36]对无色杆菌 ZWW8 产几丁质酶的酶学性质进行研究, 发现 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶活有抑制作用, Hg^{2+} 可导致几丁质酶完全失活, 说明不同来源几丁质酶性质不一定相同。

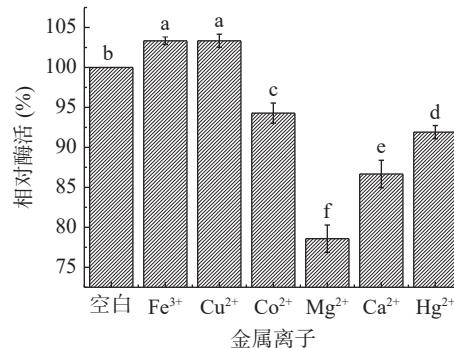


图 8 金属离子对几丁质酶活的影响

Fig.8 Effect of metal ions on chitinase activity

2.2.4 有机溶剂对几丁质酶活的影响 不同有机溶剂对几丁质酶活的影响如图 9 所示, 甲醇、乙醇、正丙醇和二甲亚砜对几丁质酶的作用效果为先激活后抑制, 当甲醇、乙醇和正丙醇的浓度为 5.0%, 二甲亚砜浓度为 2.5% 时, 酶活力达到最高, 随着这几种有机物含量的继续提高, 酶活力下降。当正丙醇浓度为 25.0% 时, 可以使酶活力降低 23.9%。故正丙醇对酶的失活作用比甲醇和乙醇强。而丙酮浓度越高, 对几丁质酶活力的激活作用越强, 在丙酮浓度为 0%~

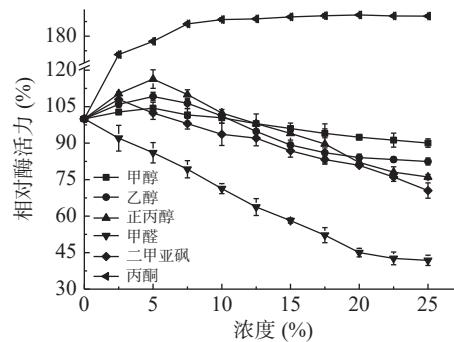


图 9 有机溶剂对几丁质酶活力的影响

Fig.9 Effect of different organic solvents on the activity of chitinase

10.0% 之间, 酶活力持续上升, 当浓度超过 10.0%, 酶活力趋于稳定 25.0%。随着甲醛浓度的增大, 酶的活力呈直线下降, 25.0% 的甲醛抑制酶活力 58.2%。

2.2.5 几丁质酶反应动力学常数测定 菌株 Bt028 几丁质酶催化胶体几丁质水解反应的 Lineweaver-Burk 双倒数图如图 10 所示, 得到的直线回归方程为: $y=0.271x+0.009 (R^2=0.99807)$, 根据该直线在 x 轴和 y 轴上的截距计算出在 pH 为 6.5、60 ℃ 的酶活测定体系中, 菌株 Bt028 几丁质酶对胶体几丁质的米氏常数 K_m 为 29.533 mg/mL, 最大反应速率 V_{max} =108.696 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 酶的转换数 $K_{cat}=0.527/\text{min}$ 。

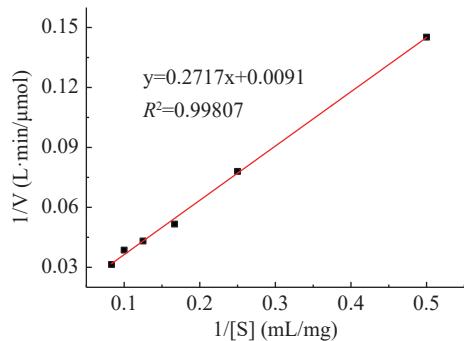


图 10 几丁质酶催化动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.10 Lineweaver-Burk double reciprocal diagram of chitinase catalytic kinetics

3 结论

当前主要通过微生物发酵来生产酶制剂, 这种方式生产周期短、且不易受外部因素的影响, 但由于粗酶活力不高, 导致大批工业用酶制剂的规模化应用受到限制。因此, 通过对粗酶液纯化可以提升酶制剂产品质量。本文对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 所产几丁质粗酶液采用 20%~70% 硫酸铵分段盐析, 纯化倍数为 1.16, 回收率为 61.24%; 经 Sephadex G-150 葡聚糖凝胶柱层析后, 得到了 4 个洗脱峰, 其中组分峰 I 具有最高的几丁质酶活力, 比活力可达 681.78 U/mg, 纯化倍数达 3.21 倍。通过 SDS-PAGE 电泳测定纯品酶分子质量为 65 kDa, 与 Azizoglu 等^[37]已报道纯化的苏云金芽孢杆菌几丁质酶产生的条带分别为 39.71、41.39、91.66 和 110~113 kDa 相比较差异较大。此外, 本文对 *Bacillus thuringiensis* Bt028 所产几丁质酶的酶学性质也进行了分析, 结果显示该酶最适反应温度为 60 ℃, 在 65 ℃ 以下保温 6 h 后酶活力剩余 84.37%, 在 70 ℃ 保温 6 h 是酶活力剩余 67.40%, 表明该酶的热稳定性较好。该几丁质酶的最适 pH 为 6.5, Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 等金属离子对几丁质酶有一定程度的抑制作用, Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对酶有促进作用。低浓度的甲醇、乙醇、正丙醇和二甲亚砜使酶的活性增加, 当有机溶剂浓度提升到一定程度时, 酶的活性受到抑制, 与邱君志^[38]对几丁质酶的研究结果相似。丙酮对几丁质酶有激活作用, 而甲醛对几丁质酶有抑制作用。通过

酶动力学分析可知, 以胶体几丁质为底物时, 该酶催化反应的米氏常数 K_m 为 29.533 mg/mL, 最大反应速率 $V_{max}=108.696 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 酶的转换数 $K_{cat}=0.527/\text{min}$ 。稳定性实验研究表明几丁质酶具有较好的热稳定性和酸碱稳定性。由此可见对粗酶液进行纯化可大幅提高几丁质酶稳定性, 这对于提高工业生产中几丁质酶的作用效率具有非常积极的意义, 本研究采用的均为传统的纯化方法, 但纯化后总酶活损失较大, 这不利于提高几丁质酶制剂生产的经济效益, 因此后续研究中有必要改进纯化方法, 以提升酶的回收率。

参考文献

- MOUSSIAN B. Chitin: Structure, chemistry and biology[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1142: 5–18.
- SHAHBAZ U. Chitin, characteristic, sources, and biomedical application[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2020, 21(14): 1433–1443.
- TSURKAN M V, ALONA V, KHRUNYK Y, et al. Progress in chitin analytics[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 252: 117–204.
- 施腾鑫, 黄秀菁, 刘嘉, 等. 黏质沙雷氏菌胞外几丁质酶的纯化及特性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 114–119. [SHI Tengxin, HUANG Xiujing, LIU Jia, et al. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Serratia marcescens* [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 114–119.]
- ZHOU D, SHEN D S, LU W J, et al. Production of 5-hydroxymethylfurfural from chitin biomass: A review[J]. Molecules, 2020, 25(3): 541.
- RABINARAYAN P. Drug delivery applications of chitin and chitosan: A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2020, 18: 577–594.
- DAI J H, LI F K, FU X. Towards shell biorefinery: Advances in chemical-catalytic conversion of chitin biomass to organonitrogen chemicals[J]. Chem Sus Chem, 2020, 13(24): 6498–6508.
- 袁媛, 荣雅利, 杨丰, 等. 甲壳素/壳聚糖的分离提取方法及在食品工业中的应用研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 252–258. [YUAN Yuan, RONG Yali, YANG Feng, et al. The separation and extraction methods of chitin/chitosan and its application in food industry[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 252–258.]
- HOSSIN M A, AL S N, AL T S, et al. A review of polymeric chitin extraction, characterization, and applications[J]. Arabian Journal of Geosciences, 2021, 14(18): 1870–1877.
- KAZUO A, SHINSUKE I. Nanofibers based on chitin: A new functional food[J]. Pure and Applied Chemistry, 2016, 88(6): 605–619.
- 陈茜文, 王佳丽, 许春雨. 克氏原螯虾壳膜几丁质酶的分离纯化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 159–163. [CHEN Qianwen, WANG Jiali, XU Chunyu. Isolation and purification of chitinase from shellfish of *Procambarus clarkii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(23): 159–163.]
- 徐田甜, 侯是媛, 齐斌, 等. 甲壳素酶的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 248–252. [XU Tiantian, HOU Shiyuan, ZHENG Bin, et al. Research progress of chitinase [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(10): 248–252.]

- uan, QI Bin, et al. Research progress of chitinase[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 248–252.]
- [13] MANISH K, AMANDEEP B, VIVEKANAND V, et al. Bioconversion of chitin to bioactive chitooligosaccharides: Amelioration and coastal pollution reduction by microbial resources[J]. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(3): 269–281.
- [14] 王敏, 辛二娜, 王瑶, 等. 几丁质降解菌的分离鉴定与产酶条件探究[J]. *山西农业科学*, 2021, 49(4): 420–424. [WANG Min, XIN Erna, WANG Yao, et al. Isolation and identification of chitin-degrading bacterium and exploration of the optimal culture conditions for enzyme production[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, 49(4): 420–424.]
- [15] 顾张慧, 刘姝, 胡晟源, 等. 一株产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(18): 129–134. [GU Zhanghui, LIU Shu, HU Shengyuan, et al. Screening and identification of a marine bacteria producing chitin deacetylase and optimization of its fermentation conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(18): 129–134.]
- [16] 杨绍青, 刘学强, 刘瑜, 等. 酶法制备几种功能性低聚糖的研究进展[J]. *生物产业技术*, 2019, 7(4): 16–25. [YANG Shaoqin, LIU Xueqiang, LIU Yu, et al. Research progress on preparation of functional oligosaccharides by enzymatic method[J]. *Biotechnology and Business*, 2019, 7(4): 16–25.]
- [17] 陈立功, 吴家歲, 张冉, 等. 发光杆菌产几丁质酶的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 110–114. [CHEN Ligong, WU Jiawei, ZHANG Ran, et al. Optimization of chitinase production by the *Photobacterium* sp. LG-1[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(1): 110–114.]
- [18] ZHOU J, CHEN J H, XU N, et al. The broad-specificity chitinases: Their origin, characterization, and potential application[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(8): 3289–3295.
- [19] 姜竹峪, 陈羽, 魏锦兴, 等. 几丁质酶的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(5): 414–418. [JIANG Zuyu, CHEN Yi, WEI Jinxing, et al. Recent advances in research on chitinase[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2016, 33(5): 414–418.]
- [20] 胡荣康, 肖正, 林满红, 等. 微生物热稳定几丁质酶的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(22): 359–364. [HU Rongkang, XIAO Zheng, LIN Manhong, et al. Research progress on thermostable microorganism chitinase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(22): 359–364.]
- [21] 程笑笑, 冯自力, 冯鸿杰, 等. 真菌源几丁质酶在植物抗真菌病害中的应用[J]. *植物保护*, 2017, 43(3): 29–35. [CHENG Xiaoxiao, FENG Zili, FENG Hongjie, et al. Applications of fungal chitinase in the fungal disease-resistant plants[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(3): 29–35.]
- [22] DU J H, DUAN S, MIAO J Y, et al. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp.[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021, 68(1): 30–40.
- [23] GUO X X, XU P, ZONG M H, et al. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2017, 38(4): 665–672.
- [24] 苏明慧, 胡雪芹, 顾东华, 等. 短短芽孢杆菌几丁质酶的分离纯化及酶学性质[J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 176–179. [SU Minhui, HU Xueqin, GU Donghua, et al. Purification and characterization of chitinase from the fermentation broth of *Brevibacillus brevis* FM4B[J]. *Food Science*, 2015, 36(19): 176–179.]
- [25] 刘蒲临, 程德勇, 缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6): 174–180. [LIU Pulin, CHENG Deyong, MIAO Lihong. Isolation of a chitinase-producing strain *Brevibacillus laterosporus* and its enzymatic properties[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(6): 174–180.]
- [26] 刘美艳, 王景景, 谢逸萍, 等. 甘薯几丁质酶的分离与纯化[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(18): 186–188. [LIU Meiyuan, WANG Jingjing, XIE Yiping, et al. Isolation and purification of chitinase from sweet potato[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(18): 186–188.]
- [27] 袁淑博, 陈晓通, 余梦林, 等. MEW06 产几丁质酶响应面发酵条件优化研究[J]. *绿色科技*, 2018(12): 156–160. [YUAN Shubo, CHEN Xiaotong, SHE Menglin, et al. Optimization of response surface fermentation conditions for MEW06 production of chitinase[J]. *Green Science and Technology*, 2018(12): 156–160.]
- [28] 聂昌宏, 郑欣, 阿依居来克·卡得尔, 等. 考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(5): 1138–1142. [NIE Changhong, ZHENG Xin, AYIGUK AIKE Kadeer, et al. Determination of whey protein content in different kinds of milk by coomassie brilliant blue method[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(5): 1138–1142.]
- [29] 吴春, 孙宁, 刘宁, 等. 响应面优化盐析法姬松茸多糖脱蛋白研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 191–196, 201. [WU Chun, SUN Ning, LIU Ning, et al. Optimization of deproteinization process from *Agaricus blazei* Murill polysaccharides by salting-out method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(13): 191–196, 201.]
- [30] 郭金玲, 陈程鹏, 周一郎, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(2): 83–87. [GUO Jinling, CHEN Chengpeng, ZHOU Yilang, et al. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *China Brewing*, 2021, 40(2): 83–87.]
- [31] 高兆建, 丁飞鸿, 陈欢, 等. 产黄青霉抗真菌几丁质酶的纯化及特性分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 129–136. [GAO Zhaojian, DING Feihong, CHEN Huan, et al. Purification and characterization of antifungal chitinase from *Penicillium chrysogenum*[J]. *Food Science*, 2021, 42(14): 129–136.]
- [32] FARAG A M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2016, 42(2): 185–192.
- [33] 罗玉彬. 高产几丁质酶菌株的筛选与 CK_1-3 菌株几丁质酶的纯化与鉴定[D]. 南昌: 江西师范大学, 2011. [LUO Yubing. Screening of chitinase producing strains and purification and identification of chitinase from CK_1-3 strain [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2011.]
- [34] 刘佳, 宋萍, 张杰, 等. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶 Chi73 的特性及生物活性研究[J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42(4): 74–81. [LIU Jia, SONG Ping, ZHANG Jie, et al. Characteristics

- and biological activity of the chitinase Chi73 from *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2019, 42(4): 74–81.]
- [35] 丁志雯, 刘耀东, 黄志发, 等. 产几丁质酶海洋细菌 *Dyadobacter* sp. CZW019 的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2021, 30(2): 22–29. [DING Zhiwen, LIU Yaodong, HUANG Zhifa, et al. Screening, identification and characterization of chitinase-producing marine bacteria *Dyadobacter* sp. CZW019[J]. Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition), 2021, 30(2): 22–29.]
- [36] 张瑶心, 王亮节, 郑文, 等. 产几丁质酶的无色杆菌 ZWW8 的发酵产酶及酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(4): 96–106. [ZHANG Yaoxin, WANG Liangjie, ZHENG Wen, et al. Study on enzyme production of a chitinase producing strain *Achromobacter* sp. ZWW8 by fermentation and its enzymatic characterization[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(4): 96–106.]
- [37] AZIZOGLU Z B, YILMAZ S, AZIZOGLU U, et al. Molecular characterization of the chitinase genes of native *Bacillus thuringiensis* isolates and their antagonistic activity against three important phytopathogenic fungi[J]. Biologia, 2021, 9(76): 2745–2755.
- [38] 邱君志, 邱振兴, 关雄. 有机溶剂对蜡蚧壳几丁质酶的影响[J]. 激光生物学报, 2009, 18(2): 206–209. [QIU Junzhi, QIU Zhenxing, GUAN Xiong. Effects of different organic solvents on the chitinase from *Lecanicillium lecanii*[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2009, 18(2): 206–209.]