

文章编号: 1673-1689(2007)01-0090-05

拮抗性酵母几丁质酶的纯化、性质及抗菌活性

冯金荣^{1,2}, 惠丰立², 文祯中²

(1. 平顶山学院 财务处, 河南 平顶山 467000; 2. 南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘要: 从番茄果实表面分离到一株陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*), 它在几丁质诱导下能产生较高活性的几丁质酶。采用硫酸铵盐析、DEAE-纤维素(DE32)离子交换柱层析、Sephadex G-100分子筛柱层析, 获得了凝胶电泳均一的几丁质酶。用 SDS-PAGE 测得该酶的相对分子质量为 42 400; 以胶体几丁质为底物的 K_m 和 V_{max} 分别为 6.91 mg/mL 和 12.95 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 该酶反应的最适温度和最适 pH 值分别为 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 7.0。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 酶蛋白在 pH 5.0~9.0 较为稳定; 抗菌活性实验表明, 该酶对供试病原菌有不同程度的抑制作用。

关键词: 陆生伊萨酵母; 几丁质酶; 纯化; 性质; 抗菌活性

中图分类号: S 476

文献标识码: A

Purification Properties and Antifungal Activity of a Chitinase Produced by Antagonistic Yeast

FENG Jin-rong¹, HUI Feng-li², WEN Zhen-zhong²

(1. Financial Department of Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China; 2. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: *Issatchenkia terricola*, a yeast could produce quite high active chitinase when induced by chitin, was isolated from the surface of tomato fruits. The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose ion exchange and Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The molecular weight of chitinase was estimated to be 42 400 by SDS-PAGE. The K_m and V_{max} values of the enzyme on colloidal chitin were 6.91 mg/mL and 12.95 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively. The optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was 50 $^{\circ}\text{C}$. The enzymatic activity was stable under 50 $^{\circ}\text{C}$ and at the pH range of 5.0~9.0. The enzyme showed antifungal activity against tested fungus to different degree.

Key words: *Issatchenkia terricola*; chitinase; purification; properties; antifungal activity

几丁质酶(Chitinase, Ec. 3.2.14)是一类能催化 降解几丁质 β -1,4 糖苷键的水解酶, 该酶分布广泛,

收稿日期: 2006-04-15.

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411032300).

作者简介: 冯金荣(1981-), 男, 江苏南通人, 微生物学硕士. Email: jinrong532@126.com

通讯作者: 惠丰立(1965-), 男, 河南南阳人, 病毒学硕士, 教授, 主要从事微生物学的研究. Email: huiifl@126.com

万方数据

存在于许多微生物、植物和动物体内^[1]。由于几丁质(Chitin)是许多病原真菌细胞壁的基本结构成分,因此拮抗菌产生的几丁质酶被广泛应用于植物真菌病害的生物防治中。

目前人们已经分离纯化了多种拮抗菌的几丁质酶,包括细菌、放线菌和霉菌等,有些几丁质基因也已克隆和表达,但有关酵母几丁质酶的研究却很少^[2-7]。范青等(2001)报道利用毕赤酵母(*Pichia membranefaciens* Hansen)和季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)防治桃采后的真菌病害,发现这两种拮抗菌产生的几丁质酶对桃软腐病菌(*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Vuill.)孢子萌发有明显的抑制作用,但对酶的纯化和性质未做进一步的研究^[7]。陆生伊萨酵母(*Issatchehannkia terricola*)是作者所在实验室从番茄果实表面分离到的一株对果蔬采后真菌病害有较好抑制作用的拮抗性酵母,为了探明该菌在果蔬采后真菌病害防治中的作用机制,作者研究了其产生的胞外几丁质酶的纯化、性质及抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基和培养条件

1.1.1 菌种 陆生伊萨酵母(*I. terricola*)由作者所在实验室从番茄果实表面分离得到。

1.1.2 主要试剂 几丁质和 N-乙酰氨基葡萄糖为 Sigma 公司产品;DEAE-纤维素(DE32)为 Whatman 公司产品;Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品;3,5-二硝基水杨酸为 Fluka 公司产品;低相对分子质量标准蛋白质购自中科院上海生化所。

1.1.3 培养基 胶状几丁质 15.0 g, 酵母粉 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 1.36 g, 蒸馏水定容至 1 000 L, 调 pH 值为 4.5。

1.1.4 培养条件 菌种活化后接种到装 50 mL 培养基的 250 mL 的摇瓶中, 28 °C 180 r/min 振荡培养 48 h 后, 收集发酵液。

1.2 酶活力的测定

参照 Antonio 和 Masarus 的方法^[8-9]。1 mL 胶体几丁质与适当稀释的酶液 1 mL 于 50 °C 水浴保温 1 h, 上清液中的还原糖按 DNS 法测定。一个酶活力单位定义为每小时释放相当于 100 μg N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.3 蛋白质含量的测定

蛋白质含量采用 Bradford 法^[10], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.4 酶的分离纯化

酶的分离纯化见文献[3]。发酵液离心浓缩后, 进行饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、DEAE-纤维素(DE32)离子交换柱层析、Sephadex G-100 分子筛柱层析。层析结束后收集活性部分, pH 6.0 的 0.1 mol/L Na_2HPO_4 -0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液透析除盐, SDS-PAGE 确认纯度。

1.5 酶纯度鉴定和相对分子质量的测定

SDS-PAGE 分析几丁质酶纯度和亚基大小。浓缩胶质量浓度 3 g/dL, 分离胶质量浓度 10 g/dL, pH 8.3 的 Tris-甘氨酸做电极缓冲液, 稳流电泳后, 考马斯亮蓝 R250 染色。根据标准蛋白质的相对迁移率对相对分子质量作图, 求出该酶的相对分子质量。

1.6 酶的抗菌活性测定

采用郭润芳等^[6]的方法。将病原菌接种于直径为 9.0 cm 的 PDA 平板上, 于 28 °C 培养 2~4 d, 在菌苔周围 1.0 cm 处打 2 个孔(直径 0.5 cm), 每孔加一定量的酶液, 对照以等量的无菌水代替, 继续培养 2~4 d, 观察抑菌情况。供试病原菌为苹果霉心病菌(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.)和番茄镰刀菌果腐病菌(*Fusarium oxysporum* Schl. emend. Snyd. et Hansen)。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

发酵液经离心浓缩后, 加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 90% 饱和度, 经离心透析后得到几丁质酶的粗酶样品。粗酶液经 DEAE-纤维素离子交换柱层析后出现两个峰, 见图 1。第 I 峰为穿过峰, 蛋白质浓度高, 酶活力低, 主要为杂蛋白质。第 II 峰为吸附峰, 酶蛋白集中, 酶活力高。收集酶活力峰, 进行 Sephadex G-100 分子筛柱层析, 见图 2。洗脱曲线表明, 主峰中的酶蛋白集中, 酶活力高, 是样品中的几丁质酶。

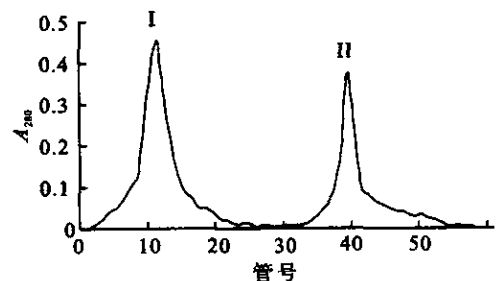


图 1 DEAE-纤维素(DE32)柱层析分离酵母几丁质酶

Fig. 1 Isolate chitinase by Sephadex DE32

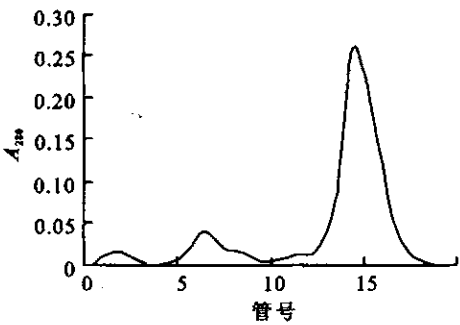


图 2 Sephadex G-100 柱层析纯化酵母几丁质酶
Fig.2 Isolate Chitinase by Sephadex G-100

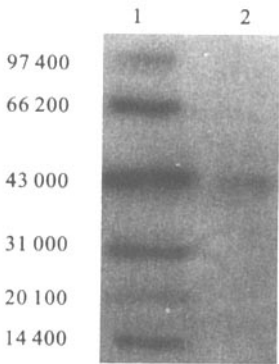
纯化结果表明 :所得到的酶样品的比活力为 200.1 U/mg ,纯化倍数为 6.01 倍 ,收率为 12.53% ,见表 1。

2.2 几丁质酶的酶学性质

2.2.1 相对分子质量的测定 将上述样品浓缩后和已知相对分子质量的标准蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳后经考马斯亮蓝 R250 染色 ,样品呈现一条带 ,表明纯化后的几丁质酶为单一组分 ,已达到电泳纯。以标准蛋白质的相对迁移率对相对分子质量对数作图 ,求出该几丁质酶的相对分子质量约为42 400 ,见图 3。

表 1 陆生伊萨酵母几丁质酶的纯化
Tab.1 Purification of chitinase from *I. terricola*

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白质量/mg	比活力/(U/mg)	收率/%	纯化倍数
粗提	720.00	22.32	33.26	100	1.00
90%(NH ₄) ₂ SO ₄	584.14	10.50	55.60	81.13	1.67
DEAE-cellulose	225.06	1.80	125.03	31.26	3.75
SephadexG-100	90.26	0.45	200.10	12.53	6.01



1. 相对分子质量标记 ;2. 纯化的几丁质酶
图 3 几丁质酶的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE pattern of purified chitinase

稀释胶体几丁质和酶液 ,混合后分别放在 30、40、50、60、70、80 ℃ 的水浴锅中反应 1 h ,按常规法测定酶活力。结果表明 ,该几丁质酶的最适反应温度为 50 ℃ ,温度过高或过低酶活力会明显下降 ;将酶液在上述温度梯度下保温 30 min 后水浴冷却 ,测定剩余酶活力 ,发现该酶在 30 ~ 50 ℃ 保温 30 min 后酶活力基本不变 ,60 ℃ 保温 30 min 后 ,残存酶活力 91.67% ,而温度升高到 70 ℃ 时仍然有 48.12% 的酶活力 ,说明此酶具有较高的热稳定性。见图 5。

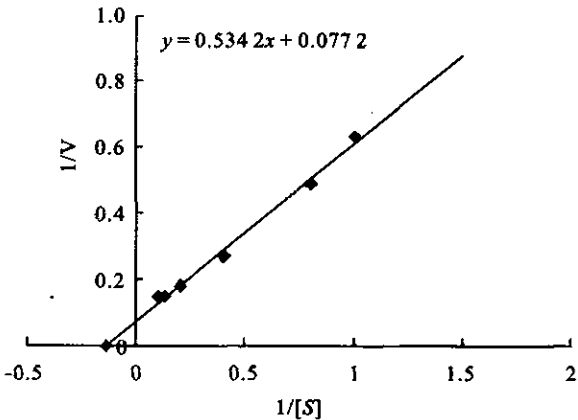


图 4 几丁质酶的 Lineweaver-Burk 图
Fig.4 Lineweaver-Burk's plot of chitinase

2.2.2 酶的 K_m 值和 V_{max} 在 pH 6.0 的 0.1 mol/L Na_2HPO_4 -0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液中 ,以不同质量浓度的胶体几丁质为底物 ,与纯化酶反应 ,在标准条件下测定酶活力。几丁质质量浓度依次为 0、1.0、1.25、2.5、5.0、7.5 mg/mL ,以浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标 ,反应速率的倒数 $1/V$ 为纵坐标作 Lineweaver-Burk 图 ,见图 4。几丁质酶的 K_m 为 6.91 mg/mL , V_{max} 为 12.95 μ mol/min。

2.2.3 酶反应最适温度和热稳定性 以 pH 7.0 的 0.1 mol/L Na_2HPO_4 -0.05 mol/L 柠檬酸缓冲溶液

2.2.4 酶反应最适 pH 值和 pH 值稳定性 分别以下列不同 pH 值的缓冲溶液(pH 3 ~ 8 ,0.1 mol/L Na₂HPO₄-0.05 mol/L 柠檬酸 ;pH 9.0 ~ 11.0 ,0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH)配制胶体几丁质和稀释酶液 ,按常规法测定酶活力。结果表明 ,酶反应的最适 pH 值为 7.0 ,且 pH 值在 5.0 ~9.0 之间酶活力差异不大 ,将酶液与上述不同 pH 值的缓冲液在 50 ℃ 下保温 4 h 后 ,测定剩余酶的活力 ,发现在 pH 5.0 ~ 9.0 之间 ,50 ℃ 保温 4 h 后 ,酶活力仍高于 70% ;在 pH <5.0 或 pH >9.0 的条件下 ,50 ℃ 保温 4 h 后 ,酶活力明显下降 ,表明该酶在 pH 5.0 ~ 9.0 较稳定 ,见图 6。

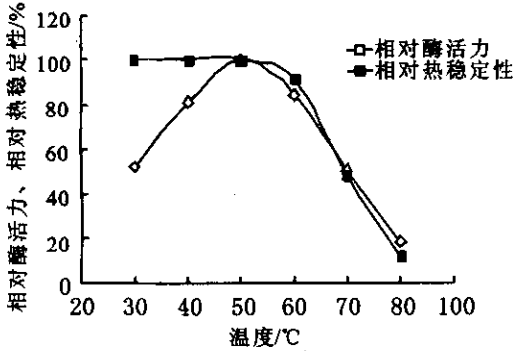


图 5 温度对几丁质酶活力及热稳定性的影响
Fig.5 Effect of temperature on activity and stability of chitinase

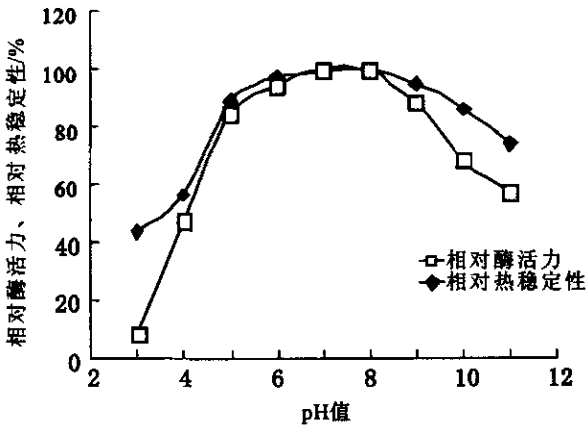
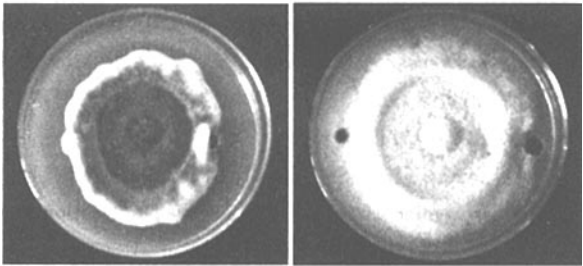


图 6 pH 值对几丁质酶活力及稳定性的影响
Fig.6 Effect of pH on activity and stability of chitinase

2.3 酶的抗菌活性

将 50 μL 质量浓度为 100 μg/mL 的几丁质酶液加入供试菌菌苔周围培养基孔 ,继续培养 2 ~ 4 d ,观察抑菌情况。结果表明 ,几丁质酶对苹果霉心病菌 (*A. alternata*) 和番茄镰刀菌果腐病菌 (*F. oxysporum*) 菌丝生长均有一定的抑制作用 ,见图 7。



1. 蒸馏水 2. 100 μg/mL 几丁质酶
图 7 几丁质酶对不同病原菌的影响

Fig.7 Effect of chitinase on different pathogenic fungi

3 讨 论

作者从陆生伊萨酵母(*I. terricola*)发酵液中纯化出一种胞外几丁质酶 ,纯化了 6.01 倍 ,纯化倍数相对较低 ,在其它真菌几丁质酶的纯化中也观察到同样的现象 ,原因可能是经胶状几丁质诱导后 ,几丁质酶大量产生 ,而其它蛋白质较少 ,因而纯化倍数较低^[6,11]。该酶的相对分子质量、最适反应温度、最适 pH 值等特性 ,与许多文献已报道的不同来源的几丁质酶有差异^[2-6]。几丁质酶是一种差异较大的水解酶类 ,这些差异的产生 ,是由于不同菌株产酶的性质不同引起的。

几丁质酶是一种与重寄生、抗病防卫反应有关的酶类 ,许多拮抗菌通过产生几丁质酶来降解病原菌细胞壁^[12] ,但由于菌株产生的几丁质酶热稳定性差 ,对酸、碱敏感性强 ,因而限制了它在大田中的实际应用。作者纯化的陆生伊萨酵母(*I. terricola*)几丁质酶对热、pH 值有较高的稳定性 ,且对供试病原菌丝生长有一定的抑制作用 ,预示了其在果蔬病害防治方面有诱人的应用前景。

参考文献(References):

[1] Simi K. The chitinase encoding to based *chiA* gene endows *Pseudomonas fluorescens* with the capacity to control plant pathogens in soil[J]. **Gene** ,1994 ,147 :81 - 83.
[2] Wang S L , Shih I L , Liang T W , et al. Purification and characterization of two antifungal chitinase extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powdermedium[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2002 ,50(8) 2241 - 2248.
[3] 唐亚雄,赵建,丁诗华,等. 产气肠杆菌几丁质酶的分离纯化及性质研究[J]. **微生物学报** 2000 ,41(1) 82 - 86.

TANG Ya-Xiong ,ZHAO Jian ,DING Shi-Hua ,et al. Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*[J]. **Acta Microbiologica Sinica** ,2000 ,41(1) 82 – 86.(in Chinese)

[4] Saburo H , Yoshitaka Y , YokoF ,et al. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*[J]. **J Biochem** ,1989 ,105 :484 – 489.

[5] Lorito M , Hayes C K , Di Pietro A ,et al. Purification , characeterization and synergistic activity of a glucan 1 β -glucosidase and an N-acetly- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*[J]. **Phytopathology** ,1994 ,84(4) 398 – 405.

[6] 郭润芳 ,李多川 ,王荣. 疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究[J]. **微生物学报** ,2005 ,45(2) 270 – 274.

GUO Run-Fang ,LI Duo-Chuan ,WANG Rong. Purification and properties of a thermostable chitinase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*[J]. **Acta Microbiologica Sinica** ,2005 ,45(2) 270 – 274.(in Chinese)

[7] 范青 ,田世平 ,刘海波 ,等. 两种拮抗菌 β -1 β -葡聚糖酶和几丁质酶的产生及其抑菌的可能机理[J]. **科学通报** ,2001 ,46(20) :1713 – 1717.

FAN Qing ,TIAN Shi-Ping ,LIU Hai-Bo ,et al. The possible mechanism of chitnase and β -1 β - glucosidase from two antagonis-tic microorganism[J]. **Science Notification** ,2001 ,46(20) :1713 – 1717.(in Chinese)

[8] Antonio R , Utrich M , Roland B , et al. Chitinases of *Streptomyces olivaceoviridis* and singnificance of processing for multiplicity [J]. **J Bacteriol** ,1992 ,174(11) 3450 – 3459.

[9] Masaru M , Akira O , Tamo F , et al. Action pattern of aerom onas hydrophila chitinase on partially N-acetylated chitosan[J]. **Agric Biol Chem** ,1990 ,54(4) : 871 – 877.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of pro-teins-dyebinding[J]. **Analytical Biochemistry** ,1976 ,227 :248 – 259.

[11] Guoqing X , Chunsheng J , Ju Z , et al. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407[J]. **Eur J Biochem** ,2001 ,268 :4079 – 4085.

[12] Lorito M , Harman G E , Hayes C K , et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* :antifungai activity of puri-fied endochitinase and chitobiosidase[J]. **Phytopathology** ,1993 ,83(3) 302 – 307.

(责任编辑 :李春丽)