

# 苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 几丁质酶的分离纯化及酶学性质<sup>\*</sup>

黄小红 陈清西<sup>1</sup> 王君<sup>1</sup> 沙莉 黄志鹏 关雄<sup>\*\*</sup>

(福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建农林大学动物科学学院 福州 350002)

(<sup>1</sup>厦门大学生命科学学院教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室 福建厦门 361005)

**摘要** 以苏云金芽胞杆菌为材料,通过硫酸铵沉淀分级分离、DEAE-32 离子交换柱层析初步纯化,获得比活力为 150.5 U/mg 的酶制剂. 研究酶催化胶体几丁质水解的反应时间和酶量对酶活力的关系,探讨酶催化胶体几丁质的最适条件. 温度和 pH 对酶活力的影响和酶的热稳定性及酸碱稳定性的结果表明:酶催化胶体几丁质水解的最适 pH 为 5.6、最适温度为 58℃. 该酶在 pH 4.5~6.5 区域稳定,而在 pH > 8 能很快失活;在 55℃ 以下处理 30 min,酶活力保持不变;高于 55℃,酶快速失活. 图 5 参 11

**关键词** 苏云金芽胞杆菌; 几丁质酶; 分离纯化; pH 稳定性; 温度稳定性

CLC Q556

## ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE CHITINASE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*<sup>\*</sup>

HUANG Xiaohong, CHEN Qingxi<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, SHA Li, HUANG Zhipeng & GUAN Xiong<sup>\*\*</sup>

(Key Lab of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(<sup>1</sup> Key Lab of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract** A chitinase (EC3.2.1.14) was partly purified from *Bacillus thuringiensis* by the methods of ammonium sulfate fractionation and chromatography on DEAE-32. The specific activity of the enzyme was 150.5 U/mg<sup>-1</sup>. The effects of reaction time and enzyme concentration on the hydrolysis of colloid chitin were studied, and the optimum conditions of the enzyme for the hydrolysis of colloid chitin were investigated. The optimum pH was determined to be at 5.6 and the optimum temperature was 58℃. The enzymatic activity was stable at the pH ranging from 4.5 to 6.5 and under 42℃. When temperature was above 55℃, the enzyme was inactive quickly. Fig 5, Ref 11

**Keywords** *Bacillus thuringiensis*; chitinase; isolation and purification; pH stability; temperature stability

CLC Q556

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 制剂是目前使用最广泛的微生物农药,占微生物农药的 95% 以上. 它是一种天然存在的昆虫病原细菌,目前已发现 70 个血清型,84 个亚种. Bt 对节肢动物 4 个门 16 个目的 3 000 多种昆虫均有高效的杀害作用<sup>[1-3]</sup>,其作用原理主要是 Bt 菌体自身产生的具有杀虫活性的晶体蛋白所致<sup>[3]</sup>. 随着 Bt 的广泛应用,国内外已经发现许多害虫对 Bt 产生了抗性,这促使人们去寻找一些新的方法改善 Bt 的杀虫能力. 几丁质酶因为具有辅助杀虫防病作用而被作为防治真菌病害和害虫的潜在靶标.

几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 是细菌、病毒、真菌等微生物、高等植物和昆虫体内普遍合成的一种具有生物催化活性的水解

酶类,它能特异地催化水解几丁质的 -1,4-糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖 (NAG)<sup>[4]</sup>. 昆虫的外骨骼和中肠围食膜均含有几丁质. 围食膜是昆虫防止病原侵入的一道天然屏障. 几丁质酶因具有破坏围食膜和扰乱昆虫的生长发育的作用而被人们关注<sup>[5]</sup>. 本文报道了对苏云金芽胞杆菌几丁质酶进行部分的纯化和酶学性质的初步研究结果,旨在为新型生物农药的研制提供一些基础数据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Bt-WB7 为福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室自行分离和保藏的菌株. 细粉几丁质为上海微纳科技有限公司的产品;胶体几丁质制备参照文献<sup>[6]</sup>的方法; DEAE-32 系 Pharmacia 产品;牛血清蛋白为标准蛋白;其余的试剂均为国产分析纯.

### 1.2 Bt 产几丁质酶的培养基与培养条件

LB 培养基含 0.5% 酵母膏,1% 蛋白胨,1% NaCl (pH

收稿日期: 2004-02-20 接受日期: 2004-04-29

\* 国家高技术研究发展计划 (2002AA245011) 和福建省重大科技计划项目 (2002N004) 的资助 Supported by the Grant 2002AA245011 from the National High Technology Research and Development of China (863 Program) and Fujian Provincial Key Sci-tech Project

\*\* 通讯作者 Corresponding author (Tel/ Fax: 0591-83789259; E-mail: gx@fjau.edu.cn)

7.0);产酶培养基含 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{KCl}$ , 2.0% 细粉几丁质和 1.0% 酵母膏 (pH 7.2). 摇瓶发酵产酶条件:将 Bt 接种于 LB 培养基中 30 活化 12 h, 后转接到产酶培养基中, 在 30 恒温下, 于  $175 \text{ r min}^{-1}$  往复式摇床振荡培养 72 h, 收集发酵液.

### 1.3 几丁质酶活力及蛋白浓度的测定

几丁质酶活力的测定参照文献 [7] 的方法并略有改进. 以 10% 胶体几丁质为底物, 在 0.5 mL 的测活体系中 (含终浓度为  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5.6 NaAc - HAc 缓冲液, 0.25% 胶体几丁质), 于 42 恒温水浴中加入 20  $\mu\text{L}$  酶液, 准确反应 15 min, 加入 0.5 mL  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH 终止反应. 离心, 取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL DNS 试剂, 在沸水浴中煮沸 5 min, 在 Beckman DU - 650 分光光度计测定  $D_{520 \text{ nm}}$ . 以 N - 乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 为产物对照. 酶活力单位 (U) 定义: 在上述条件下, 每升溶液中每分钟释放  $1 \mu\text{mol}$  NAG 的量为一个酶活力单位 ( $= 1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). 比活力定义为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数 ( $/ \text{U mg}^{-1}$ ). 蛋白浓度测定采用 Folin - 酚试剂法 [18] 测定蛋白浓度, 以牛血清蛋白为对照.

### 1.4 几丁质酶的分离和纯化

取细菌培养液于 4 下离心 ( $10\,000 \text{ r min}^{-1}$ ) 30 min, 得到上清液, 为分离 Bt 几丁质酶的材料. 采用硫酸铵分级分离, 收集 35% ~ 70% 饱和度的沉淀蛋白, 透析后得到粗酶制剂. 进一步通过 DEAE - 纤维素 (DE - 32) 离子交换柱层析纯化, 采用 0 ~  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl 线性梯度的缓冲液洗脱, 收集酶活性部分. 柱规格为  $1.5 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ , 洗脱缓冲液为  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.5 Tris - HCl (pH 7.0), 流速为  $15 \text{ mL h}^{-1}$ , 分部收集, 每管 4.0 mL.

## 2 结果与分析

### 2.1 酶的分离纯化及纯化鉴定

Bt 几丁质酶的 DEAE - 纤维素 (DE - 32) 离子交换柱层析纯化图谱见图 1. 粗酶经 DEAE - 纤维素柱层析分离出 2 个蛋白峰, 第一个蛋白峰具有酶活力, 合并活力峰, 测定酶的比活力 =  $150.5 \text{ U mg}^{-1}$  的酶制剂. 得到提纯 18.5 倍的部分纯化酶制剂.

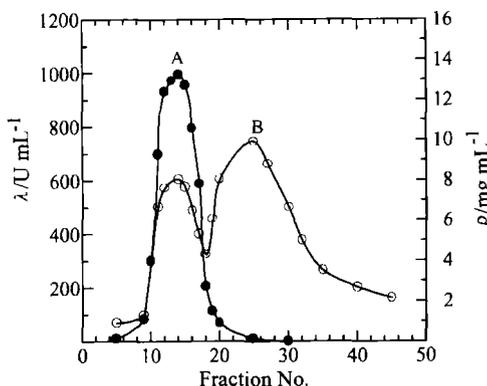


图 1 几丁质酶的分离纯化图谱 (DEAE - 32 柱层析)

Fig. 1 Purification chromatography of chitinase on DEAE cellulose  
A: ( ) 酶活力 Enzyme activity; B: ( ) 蛋白浓度; Protein concentration

### 2.2 酶催化胶体几丁质水解进行曲线的测定

在 pH 5.6, 42 下, 测定酶催化胶体几丁质水解的进行曲线, 产物量与酶催化反应的时间关系见图 2. 结果表明, 在 40 min 之内, 产物的生成量与酶反应的时间呈直线关系, 当反应时间大于 40 min, 产物浓度 ( $c / \mu\text{mol L}^{-1}$ ) 曲线随着反应的时间的延长而逐渐弯曲, 说明在 40 min 以内的速度是恒定的反应初速度.

### 2.3 酶浓度与酶活力的关系

在正常的测活体系中, 加入不同量的酶, 测定酶活力, 以酶活力对酶浓度作图, 结果见图 3. 表明在 pH 5.6, 42 的条件下, 苏云金芽胞杆菌几丁质酶的反应速度与酶浓度成正比. 说明该酶能有效催化胶体几丁质的水解.

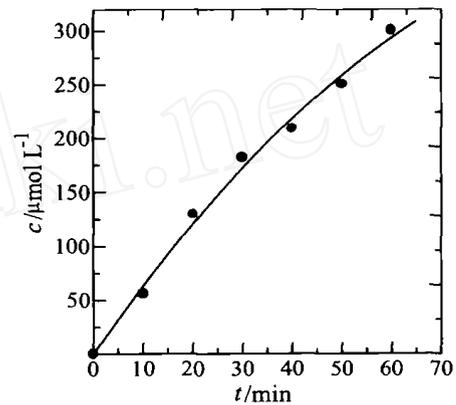


图 2 几丁质酶酶催化胶体几丁质水解的进行曲线

Fig. 2 Course of the hydrolysis of colloid chitin by chitinase from Bt

### 2.4 温度对酶活力的影响

在 pH 5.6 的  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaAc - HAc 测活体系中, 改变测活的温度, 测定不同温度下的酶催化底物胶体几丁质水解反应的初速度, 以酶活力对反应的温度作图, 为一个典型的钟罩型曲线 (图 4 A 曲线), 表明酶的作用有个最适温度区域, 其最适温度为 58.

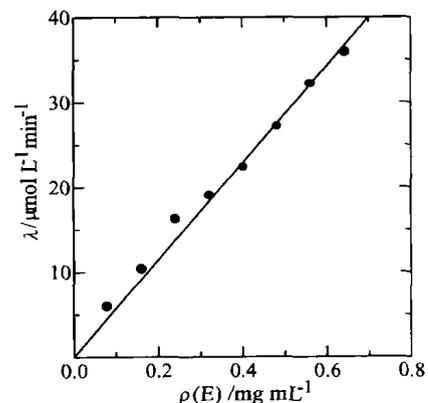


图 3 酶浓度对酶活力的效应

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on its activity

### 2.5 酶的热稳定性

天然酶在不同温度下 (30 ~ 75) 热处理 30 min 后, 迅速冷却到室温, 然后取出 20  $\mu\text{L}$  处理的酶液在正常的测活体系 (pH 5.6, 42) 中检测酶的剩余活力, 结果见图 4 B. 表明酶在 55 以下热变性 30 min, 酶活力基本保持不变, 在 55 以上酶活力开始下降, 随着处理的温度升高, 酶活力呈快速下降. 实

验说明酶在 55 以内都具有较好的热稳定性. 高于 55 , 酶极不稳定. 酶的热失活导致酶活力的丧失, 74 处理 30 min, 酶活力完全丧失, 酶的热失活完全.

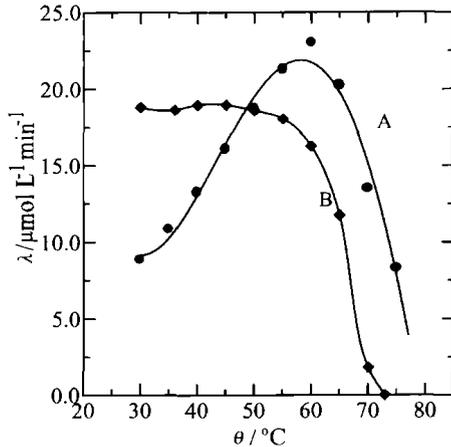


图4 温度对几丁质酶活力的影响(A)和酶的热稳定性(B)  
Fig. 4 Effect of different temperatures (B) on enzyme activity and stability (A)

## 2.6 pH 对酶活力的影响及酶的酸碱稳定性

在 42 的测活体系中, 改变不同的 pH 值, 研究 pH 值对酶催化底物胶体几丁质水解活力的影响, 结果(图 5A)表明酶活力与 pH 值呈钟罩形关系, 求得该酶的最适 pH 为 5.6. 将等量的酶液与不同 pH 值的缓冲液等量混合, 室温下放置 30 min 后, 然后取出 20 μL 处理的酶液在 pH 5.6 的测活体系中检测酶的剩余酶活力, 以酶活力对处理的 pH 作图, 分析酶的酸碱稳定性. 结果(图 5B)表明 Bt 几丁质酶的酸碱稳定性范围较宽, 在 pH 4.5 ~ 6.5 区域较稳定.

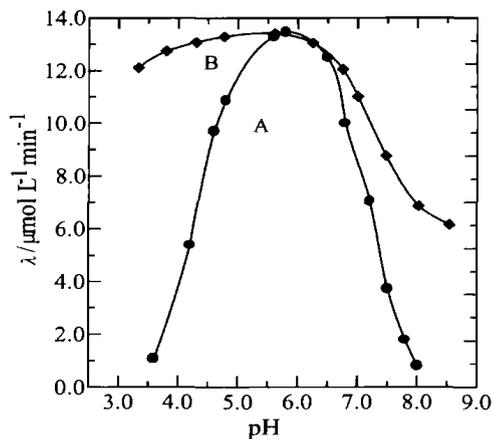


图5 pH 对几丁质酶活力的影响(A)和酶的酸碱稳定性(B)  
Fig. 5 Effect of different pH values (B) on enzyme activity and stability (A)

## 3 讨论

几丁质酶是一类差异较大的水解酶类, 不同来源的几丁质酶的性质差别很大. 本研究表明, Bt 几丁质酶与文献报道其它微生物几丁质酶对热和 pH 稳定性<sup>[9]</sup>基本一致. 但是, 从 Bt 来源的几丁质酶的最适 pH 和酸碱稳定性与从芽胞杆菌属短芽胞杆菌种分泌的胞外几丁质酶有所不同, 后者的最适 pH 为 8.0, 酸碱稳定范围是 pH 6.0 ~ 10.0<sup>[10]</sup>, 而 Bt 几丁质酶的最适 pH 值为 5.6, 并在 pH 4.5 ~ 6.5 区域较稳定. 说明不同微生物来源的几丁质酶有较大差异. 这些差异的产生, 可能是由于不同菌株所产生的酶具有不同的催化特性, 具有不同的分子结构特点.

## References

- 1 关雄. 苏云金芽胞杆菌 8010 的研究. 北京: 科学出版社, 1997
- 2 Glare TR. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. London: John Wiley & Sons, 2000
- 3 Huang ZP(黄志鹏), Guan X(关雄). Analysis for the encoding gene of active factors from *Bacillus thuringiensis* strain WB9. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, 9 (4): 377 ~ 381
- 4 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990
- 5 Jiang HB(蒋红彬), Zhang Y(张瀛), Jiang QL(蒋千里). Advances in the research of chitinase. *Shandong Sci* (山东科学), 2000, 13 (4): 41 ~ 45
- 6 Ouyang SW(欧阳石文), Liu JL(刘江良), Feng LX(冯兰香). Research on insect chitinases and their application. *Mount Agri Biol* (山地农业生物学报), 2001, 20(2): 147 ~ 153
- 7 Li L(李力), Huang SY(黄胜元), Guang X(关雄). Screening of *Bacillus thuringiensis* strains producing chitinase and study on its synthetic conditions. *Virolog Sin* (中国病毒学), 2000, 15: 94 ~ 97
- 8 Rojas - Avelizapa LI, Cruz - Camarillo R, Guerrero MI. Selection and characterization of a proteo - chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J Microbiol Biotechnol*, 1999, 15: 299 ~ 308
- 9 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265 ~ 269
- 10 Feng B 冯波). Studies on the chitinase from microorganisms. *J Tianjin Nor Univ (Nar Sci Ed)* (天津师大学报自然科学版), 1998, 18(3): 13 ~ 19
- 11 Li S(李盛), Zhao ZA(赵志安), Li M(李明). Purification and characterization of novel chitinase from *Bacillus brevis*. *Acta Biochim et Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2002, 34(6): 690 ~ 696