

# 有机溶剂对苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 几丁质酶的影响\*

黄小红<sup>1</sup> 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** 以苏云金芽孢杆菌(Bt)的发酵液为材料,经硫酸铵分级分离、DEAE-32离子交换柱层析分离,获得部分纯化的Bt几丁质酶(EC3.2.1.14)制剂。研究了几种有机溶剂对Bt几丁质酶的影响。结果表明,甲醇、丙三醇、甲醛和戊二醛对几丁质酶有抑制作用;乙醇、丙醇、乙二醇和二甲基亚砜在低浓度时对酶有激活作用,随着浓度的升高表现出抑制作用;二氧六环的浓度低于5%时,对酶的影响不明显,而高于5%时,对酶则有激活作用;丙酮对酶有激活作用。图1参10

**关键词** 苏云金芽孢杆菌;几丁质酶;有机溶剂;酶活力

CLC Q556

## EFFECTS OF DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS ON THE CHITINASE FROM *BACILLUS THURINGENSIS*\*

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

(Key Lab of Ministry of Education for Biopesticide and Chemical Biology, 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, 361005, Fujian, China)

**Abstract** A chitinase (EC3.2.1.14) was isolated from the culture of *Bacillus thuringiensis* and purified by ammonium sulfate fractionation and chromatography on DEAE-32. The effects of organic solvents on the enzyme activity were investigated. The results indicated that the methanol, glycerol, formaldehyde and glutaraldehyde solutions inhibited the enzyme activity, while the alcohol, propanol, glycol and dimethyl sulfoxide solutions activated the enzyme at low concentration and inhibited it at high concentration. Acetone and dioxane had active effects on the enzyme. Fig 1, Ref 10

**Keywords** *Bacillus thuringiensis*; chitinase; organic solvents; enzyme activity

CLC Q556

几丁质酶(chitinase, EC3.2.1.14)广泛存在于动植物和微生物体内,是一类能特异地催化水解几丁质的 $\beta$ -1,4-糖苷键生成N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG)的水解酶,直接参与几丁质的代谢过程,在生物体内的物质代谢中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。几丁质酶还具有水解几丁质破坏昆虫围食膜的作用,因而可用于防治植物病虫害<sup>[2-4]</sup>。

本文以苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)为材料,分离提取其几丁质酶,研究有机溶剂对Bt几丁质酶活力的影响,这对于探讨酶的催化和活力调控具有一定的意义。它不仅能为研究不同来源几丁质酶的结构与功能相互关系提供理论依据,为研究酶在有机溶剂中的催化反应提供新的信息,而且还能新型生物杀虫剂的开发利用提供理论指导。

## 1 材料与amp;方法

收稿日期:2004-06-03 接受日期:2004-07-16

\* 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)资助 Supported by 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 0591-3789259 E-mail gx@fjau.edu.cn)

### 1.1 材料

苏云金芽孢杆菌WB7菌株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保藏;细粉几丁质为上海微纳科技有限公司的产品;胶体几丁质的制备参照文献[3]的方法进行;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 方法

1.2.1 Bt几丁质酶的分离和纯化 参考文献[5]方法,将Bt接种于LB培养基(含0.5%酵母膏,1%蛋白胨,1%NaCl,pH7.0)中30℃活化12h后转接到产酶培养基(含0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.2%Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,0.05%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.05%KCl,2.0%细粉几丁质和1.0%酵母膏,pH7.2)中,30℃恒温下,往复式摇床振荡(175rmin<sup>-1</sup>)培养72h收集发酵液,于4℃下离心发酵液,去除菌体,得到上清液,作为分离几丁质酶的材料。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Bt几丁质酶制剂。进一步通过DEAE-纤维素(DE-32)离子交换柱层析纯化,以NaCl浓度梯度(0~1.0molL<sup>-1</sup>)的缓冲液洗脱。柱规格为1.5cm×30cm,洗脱缓冲液为0.01molL<sup>-1</sup>pH7.5 Tris-HCl(pH7.0),流速为15mLh<sup>-1</sup>,分部收集,每管4.0mL。

合并酶活性峰, 测定酶活力和蛋白浓度。

1.2.2 几丁质酶活力的测定 几丁质酶活力的测定参照文献[6]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  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $\text{pH } 5.6$  NaAc-HAc 缓冲液, 0.25% 胶体几丁质), 于  $42^\circ\text{C}$  恒温水浴中加入 20  $\mu\text{L}$  酶液, 准确反应 15 min, 加入 0.5 mL  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  的 NaOH 终止反应。离心, 取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中煮沸 5 min 用 Beckman DU-650 分光光度计测定  $D_{520 \text{ nm}}$ 。

1.2.3 有机溶剂对苏云金芽孢杆菌几丁质酶的影响 选择甲醇、乙醇、正丙醇、乙二醇、丙三醇、甲醛、戊二醛、丙酮、二氧六环、二甲亚砜等有机溶剂为效应物, 在 0.5 mL 的测活体系中 (含终浓度为  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $\text{pH } 5.6$  NaAc-HAc 缓冲液, 0.25% 胶体几丁质), 加入不同浓度的效应物, 测定酶的相对活力, 分析研究效应物对 Bt 几丁质酶活力的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 几种伯醇对 Bt 几丁质酶活力的影响

甲醇 (a)、乙醇 (b) 和正丙醇 (c) 对 Bt 几丁质酶活力的影响

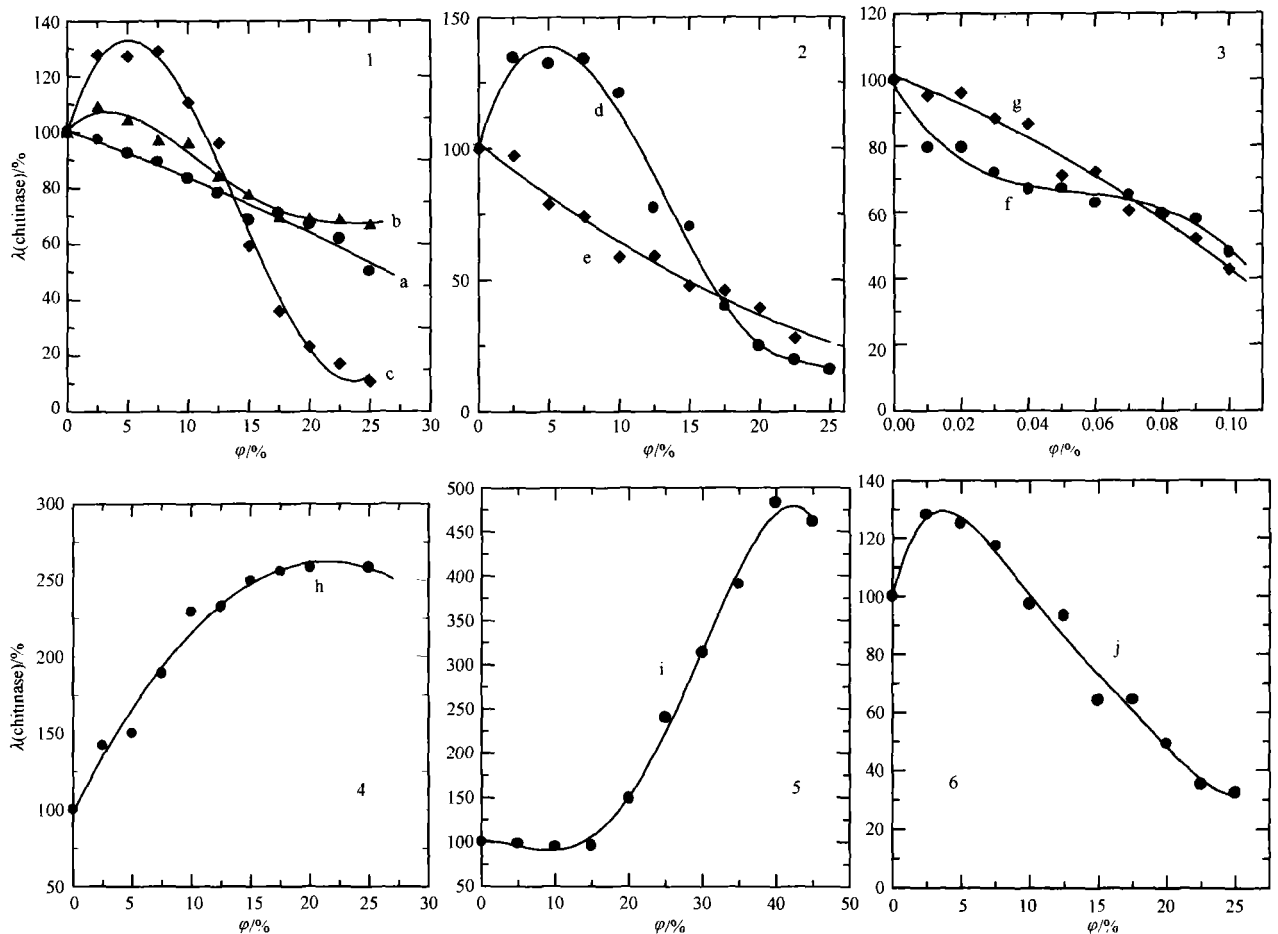


图 1 几种有机溶剂 ( $\varphi/\%$ ) 对 Bt 几丁质酶活力的影响

Fig 1 Effect of different organic solvents ( $\varphi/\%$ ) on the activity of chitinase from Bt

a 甲醇 Methanol; b 乙醇 Alcohol; c 正丙醇 Propanol; d 乙二醇 Glycol; e 丙三醇 Glycerol; f 甲醛 Formaldehyde; g 戊二醛 Glutaraldehyde; h 丙酮 Acetone; i 二氧六环 Dioxane; j 二甲亚砜 Dimethyl sulfoxide

响测定结果见图 1-1 甲醇对 Bt 几丁质酶的作用表现为抑制作用, 随着甲醇浓度的增大, 酶的活力呈直线下降, 导致酶活力丧失一半的甲醇浓度为 25%。乙醇对 Bt 几丁质酶的作用较为复杂, 在低浓度时 ( $< 5.0\%$ ), 对酶活力略有激活作用, 可以使酶活力提高 8% 左右; 当乙醇浓度高于 7.5%, 酶的活性反而被抑制; 酶活力随着乙醇浓度增大而下降直至维持在 70% 的水平。正丙醇对 Bt 几丁质酶的作用也是先扬后抑, 不过作用效果比乙醇强, 在 5% 浓度下可以使酶活力提高 30%, 16% 可以使酶活力丧失 50%, 而 20% 则抑制酶活力 80%。

### 2.2 多元醇对 Bt 几丁质酶活力的影响

不同浓度的乙二醇 (d)、丙三醇 (e) 对 Bt 几丁质酶活力的作用也显示了浓度效应, 实验结果见图 1-2 乙二醇和丙三醇对 Bt 几丁质酶的作用截然不同: 乙二醇对酶的作用先扬后抑, 在浓度低于 10% 以下, 对酶有激活作用, 当浓度为 2.5% 时, 激活作用达到最大, 可以使酶活性提高 34.5%, 随浓度的提高激活作用减弱; 当浓度高于 12%, 酶的活性开始被抑制, 当浓度升到 25% 时, 酶活力被抑制 84.3%。丙三醇的作用均使酶活力下降, 酶活力随着丙三醇浓度增大而呈指数下降, 当浓度为 22.5% 时, 酶的剩余活力为 27.8%。

### 2.3 醛类化合物对 Bt 几丁质酶活力的影响

选择甲醛 (f) 和戊二醛 (g) 为效应物, 研究醛类化合物对 Bt 几丁质酶的效应, 结果见图 1-3. 所试验的这两种醛类物质对该酶活力均有一定抑制作用, 当它们的浓度为 0.1% 时, 剩余活力分别为 47.8% 和 42.6%.

### 2.4 丙酮对 Bt 几丁质酶活力的影响

丙酮 (h) 对 Bt 几丁质酶活力的影响结果见图 1-4. 表明在 2.5% ~ 25% 的浓度范围内, 丙酮对 Bt 几丁质酶活力有较强的激活作用, 随着浓度的升高, 激活作用增强; 在较低浓度时, 激活作用呈直线上升, 浓度增大到一定值, 激活程度达到恒定最大值, 25% 的丙酮可以使酶活力提高到 258.4%.

### 2.5 二氧六环和二甲亚砷对 Bt 几丁质酶活力的影响

分别以二氧六环 (i) 和二甲亚砷 (j) 为效应物, 检测它们对酶活力的影响, 结果分别见图 1-5 和图 1-6. 二氧六环和二甲亚砷对 Bt 几丁质酶的效应截然不同, 低浓度 (< 1.5%) 的二氧六环对酶活力几乎没有影响, 而高浓度则表现出强烈的激活作用, 随着浓度的升高, 酶活力呈直线上升, 当浓度达 45% 时, 酶的相对活力增大到原来的 461.4%. 二甲亚砷在低浓度时 (< 7.5%) 表现出激活作用, 最高的可以使酶活力增加 30%; 当浓度高于 7.5% 时, 二甲亚砷对 Bt 几丁质酶表现为显著的抑制作用, 随着效应物浓度的增大, 酶活力几乎呈直线下降, 当浓度达到 23% 时, 酶活力下降了约 70%.

## 3 讨论

长期以来, 人们一直认为酶分子只能在水溶液中行使各自的生物学功能, 水溶液是这些大分子存在及其相互作用的天然介质. 随着非水酶学的掀起, 酶在有机介质中催化作用的研究取得令人瞩目的进展<sup>[7]</sup>. 实验发现, 酶可以在有机溶剂中发挥作用, 而且在不同的有机溶剂中会表现出不同的催化活性. 本试验也证实了这一结果.

在研究有机溶剂对 Bt 几丁质酶活性的影响时, 实验发现酶处于低浓度的乙醇、正丙醇、乙二醇和二甲亚砷介质中, 酶的活性增加. 只有当有机溶剂的浓度升高到一定程度时, 酶的活性才受到抑制. 这与长毛对虾酸性磷酸酶的研究结果有所不同<sup>[8]</sup>. 乙二醇对长毛对虾酸性磷酸酶起抑制作用, 并随乙二醇浓度的增大, 酶活力迅速呈直线下降至完全丧失, 并没有低浓度的激活作用. 以上几种有机溶剂作为酶的变性剂在低浓度时对酶不产生失活, 反而起激活作用, 这是由于它们的介电常数较小, 导致维持蛋白质分子构象的次级键, 尤其是氢键和疏水作用力发生变化, 这些变化可能使酶活性中心的柔性增强, 有利于酶功能的发挥. 随着介质中有机溶剂含量的增加, 酶的柔性随介质中水含量的下降而减小, 因而导致酶抵抗失活的能力降低.

甲醇对酶的抑制作用在文昌鱼酸性磷酸酶的研究中已有报道<sup>[9]</sup>. 在本试验测定的浓度范围内, 甲醇也表现出对酶的抑制作用. 丙三醇对豇豆根瘤腺苷酸琥珀酸裂解酶有激活作用<sup>[10]</sup>, 而在本试验中它却能抑制酶的活性. Bt 几丁质酶之所以被这两种有机溶剂抑制可能是由于两者都能介入酶分子的内部, 改变酶分子所处环境的介电常数, 引起肽链伸展, 从而改变了酶活性中心必需基团所处的微环境极性, 影响了酶的催化活

性. 这说明酶的活性中心处于对甲醇和丙三醇比较敏感的区域.

醛类化合物中醛基能与酶蛋白中的羟基、巯基和羧基起作用, 这些基团经常出现在酶的活性中心上, 其性质改变会使酶变性失活. 所以在本实验中出现甲醛和戊二醛对几丁质酶的抑制作用.

丙酮和二氧六环对 Bt 几丁质酶有激活作用. 二氧六环低浓度对酶的影响不大, 但浓度升高后, 表现出强烈的激活作用. 在实验过程中发现, 二氧六环可以增加胶体几丁质的溶解度, 间接导致底物浓度的增加, 以至加快酶促反应的进行.

总之, 酶的构象是靠酶分子中的次级键来维持的, 当反应体系中含有有机溶剂时, 体系的疏水性发生改变, 会影响酶分子的构象, 进而改变酶的活性. 不同有机溶剂对酶的构象有不同影响. 即使是同一种有机溶剂在不同浓度范围所起的作用也有差异. 当选择有机溶剂作为效应物与 Bt 几丁质酶一起用作辅助杀虫剂时, 不仅要选择好种类, 而且还要考虑到使用的浓度; 同时还要注意环境中的一些有机污染物会降低酶的活性.

## References

- 1 Sun SL (孙胜利), Yu ZN (喻子牛), Jia XC (贾新成). Advance in study and application on chitinase produced by microbes. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2002, 22(5): 47~50
- 2 Sha L (沙莉), Su ZX (苏争先), Huang XH (黄小红), Qiu ZJ (邱志君), Guan X (关雄). Microorganism chitinases molecular biology and potential use of biopesticides. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2003, 11(6): 642~647
- 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 Li L (李力), Huang SY (黄胜元), Guan X (关雄). Screening of *Bacillus thuringiensis* strains producing chitinase and study on its synthetic conditions. *Virologia Sin* (中国病毒学), 2000, 15: 94~97
- 5 Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), Wang J (王君), Sha L (沙莉), Huang ZP (黄志鹏), Guan X (关雄). Isolation, purification and some properties of the chitinase from *Bacillus thuringiensis*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, 10(6): 771~773
- 6 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
- 7 Peng LF (彭立凤). Effect of organic solvents on enzymatic activity and selectivity. *Progr Chem*, 2000, 12(3): 296~304
- 8 Chen QX (陈清西), Zhou XW (周兴旺), Yang PZ (扬佩真). Effect of ethylene glycol on activity and conformation of acid phosphatase from *Penaeus penicillatus*. *J Oceanogr Taiwan Strait* (台湾海峡), 1999, 18(4): 398~402
- 9 Xue XZ (薛雄志), Fu NY (符乃阳), Li XQ (李筱泉), Chen SL (陈素丽). Changes of conformation and activity of ACPase from *Branchoistoma belcheri* in methanol solutions. *J Oceanogr Taiwan Strait* (台湾海峡), 1996, 15(3): 275~279
- 10 Zhou YG (周跃钢). Effects of glycerol on activity of adenylosuccinate anhydrolase from cowpea nodules. *J Southwest Agric Univ* (西南农业大学学报), 1997, 19(3): 252~254