

# 枯草芽胞杆菌甲壳素脱乙酰酶的筛选及酶学性质\*

黄惠莉\*\* 叶存印 姚云艳

(华侨大学生物工程系 泉州 362011)

**摘要:** 从海洋泥土中分离出产甲壳素脱乙酰酶菌株, 确定该菌株为产碱属芽胞杆菌, 其产酶适宜培养条件为: pH4.0, 添加金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ , 培养时间为 80 h, 温度为 35℃。所得甲壳素脱乙酰酶作用的最适温度为 40℃~50℃, 最适 pH 为 4.5~5.0 之间。

**关键词:** 甲壳素脱乙酰酶, 酶活, 脱乙酰度

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0033-05

## Screening and Properties of Chitin Deacetylase from *Bacillus subtilis*

HUANG Hui-Li\*\* YE Chun-Yin YAO Yun-Yan

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362011)

**Abstract:** A bacterium that contains a chitin deacetylase has been isolated from ocean soil. It has been identified *Bacillus*. The best suitable condition of producing this enzyme is that pH is 4.0, 35℃, and the incubate time is 80 hours in the present of  $\text{Ca}^{2+}$  as well as having no chitosan. The best temperature of this enzyme when it acts is 40℃~50℃ and the best pH range is 4.5~5.0.

**Key words:** Chitin deacetylase, Enzyme activity, Deacetylation.

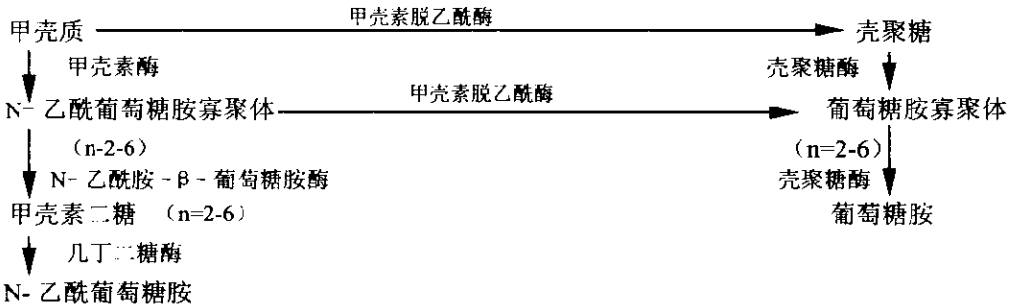
甲壳素 (chitin) 广泛存在于许多无脊椎动物的外壳或角质层以及真菌、藻类、酵母的细胞壁中。甲壳素容易获得, 但因其分子内部很强的氢键作用, 溶解性很低, 应用范围受到限制。但是, 甲壳素脱乙酰化产物——壳聚糖 (chitosan) 可溶解于大多有机和无机酸的水溶液中, 应用范围广。甲壳素脱乙酰化的方法常见的有化学法和酶法, 在化学法脱乙酰基反应中, 影响脱乙酰度的因素很多, 如: 碱液浓度、反应温度和反应时间等都对脱乙酰度有影响, 同时也会伴随甲壳素主链的降解, 从而影响产品的粘度和分子量, 其排放水还会对环境造成严重污染。用酶法降解几丁质和壳聚糖是一种节能、高效、无污染的新途径, 近 20 年国内外研究工作十分活跃, 已发现有 30 多种专一性或非专一性酶可用于甲壳素和壳聚糖的降解反应<sup>[1-5]</sup>。在酶法进行脱乙酰化的反应中, 常用的酶有: 甲壳素酶、壳聚糖酶、甲壳素脱乙酰酶, 从其作用机制分析<sup>[2]</sup>, 甲壳素脱乙酰酶的作用最彻底, 其效果也最好。

甲壳素脱乙酰酶 (chitin deacetylase, E.C.3.5.1.4, 简称 CDA) 是一种催化甲壳素中 N-乙酰基-D-葡萄糖胺的乙酰胺基水解的酶。1974 年, Araki 从真菌 *Mucorroxii* 培养

\* 华侨大学基金资助项目

\*\* 联系人 E-mail: jmlin@hqu.edu.cn

收稿日期: 2003-10-27, 修回日期: 2003-11-25



液中获得并部分纯化。1982年, Kauss 在植物病原体 *Colletotrichum lindemuthianum* 中也发现甲壳素脱乙酰酶, 这是首次报道从非接合菌类中分离得到该酶。最近美国专利报道了1株产碱杆菌属的细菌 *Alcaligenes* sp. ATCC55938 也可以产生甲壳素脱乙酰酶<sup>[4]</sup>。不同菌株所产的甲壳素脱乙酰酶的生化性质是不大一样的, 这又导致了不同来源的甲壳素脱乙酰酶的生理功能不同。

利用甲壳素脱乙酰酶的作用, 可以制备出高脱乙酰度且性能独特的壳聚糖。尤其是在生物、医学方面, 所应用的壳聚糖质量要求更高, 对于物理性质和化学性质均要求统一的指标。因此该酶还有重要的工业应用的潜在价值。本文从海洋泥土中分离出产甲壳素脱乙酰酶菌株, 并研究发酵条件对酶活的影响及酶的性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 筛选培养基: 酪蛋白 (不含维生素) 5 g, 壳聚糖 (市售) 2 g, 琼脂 15 g, 定容至 1L, pH 为 7.5。

1.1.2 斜面培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 定容至 1L, pH 为 7.0~7.2

1.1.3 检验培养基: 酪蛋白 5 g, 对硝基 N-乙酰苯胺 2 g, 5%磷酸氢二钾 7 g, 万分之一硫酸镁 5 g, 琼脂 15 g, 定容至 1L, pH 为自然。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选: 从泉州惠安洛阳桥附近采集泥土土样 2 份, 用常规平板稀释法进行初筛分离, 在复筛时以对硝基 N-乙酰苯胺作为检测试剂, 从细菌中筛选出的甲壳素脱乙酰酶可脱除对硝基 N-乙酰苯胺 (无色) 中的乙酰基, 将其转化为对硝基苯胺 (黄色), 根据颜色变化, 可以判断出产甲壳素脱乙酰酶菌株。

1.2.2 甲壳素脱乙酰酶活性测定: 采用文献 [6] 的方法测定。底物按照文献 [7] 的方法制备; DNS 试剂按照文献 [8] 方法制备。

1.2.3 脱乙酰度的测定: 依据文献 [8] 的方法测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 常规平板稀释法

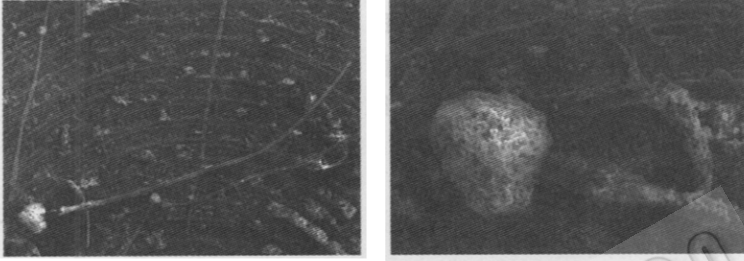
采用常规平板稀释法, 经初筛和复筛, 从 55 个平板中挑选出能够脱除对硝基 N-乙酰苯胺 (无色) 的乙酰基转化为对硝基苯胺 (黄色) 的 15 个平板, 每个平板内平均有 20~30 左右个菌落, 挑选 4 个变色较深的菌落到斜面保存。所挑选的菌落特征如下表 1。

表1 检验平板培养基中菌落的形态

原平板编号	平板培养基变色情况	菌落形态
13	整个平板变为黄色, 菌落较多的地方颜色较深	菌苔为从白色渐变绿色, 珊瑚状, 菌落隆起
16	整个平板变为黄色, 菌落较多的地方颜色较深	菌苔为黄色, 珊瑚状, 菌落隆起
20	整个平板均变成黄色, 颜色比较深	菌苔为绿色, 珊瑚状, 菌落隆起
25	整个平板均变成黄色	菌苔为黄色, 珊瑚状, 菌落隆起

## 2.2 形态镜检

通过染色法知该菌为革兰氏阳性芽孢杆菌; 通过高倍电子显微镜观察到该菌杆长约为  $400 \mu\text{m}$ , 其中孢子长度大约为  $30 \mu\text{m}$  大小, 如图1所示。

图1 产甲壳素脱乙酰酶菌株的形态 ( $\times 500$ )

## 2.3 产甲壳素脱乙酰酶菌种的性质研究

**2.3.1 产甲壳素脱乙酰酶菌种的生长曲线:** 依上述实验方法, 在  $30^\circ\text{C}$ 、以  $180 \text{ r/min}$  条件下培养, 每隔  $8 \text{ h}$  取样  $1$  次, 离心测其菌体干重, 得到结果如图2所示, 从图可知, 该菌株最佳培养时间为  $48 \sim 62 \text{ h}$ , 此时菌体量达到最大。

**2.3.2 生长过程中 pH 的变化:** 分别测定在不同培养时间的 pH, 结果如图3所示, 由此可知该菌在生长过程中 pH 值的变化为逐渐升高显示为碱性, 说明生长过程为产碱过程。

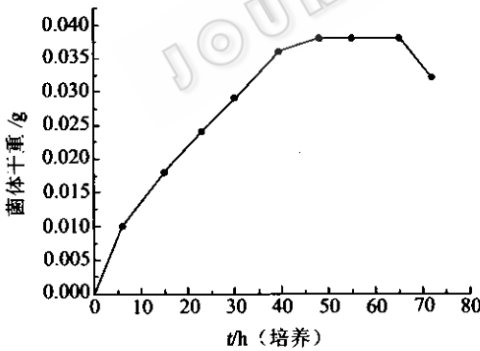


图2 甲壳素脱乙酰酶菌种的生长曲线

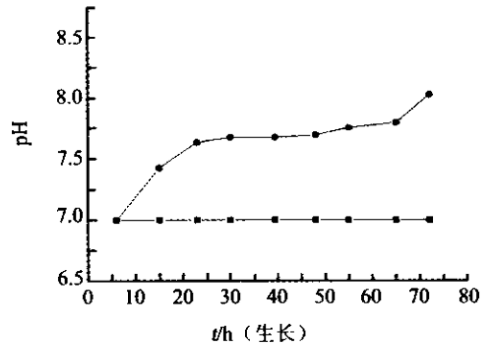


图3 生长过程中 pH 的变化

■ 初始 pH, ● 生长过程 pH

## 2.4 甲壳素脱乙酰酶性质的研究

**2.4.1 发酵生长条件对酶活的影响:** 影响酶活性大小的因素有: 培养时间, 温度, 金属离子<sup>[9]</sup> (分别配置  $110 \text{ mmol/L}$  的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$  溶液, 添加量以使培养基内含量为  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  为宜), pH, 底物 (壳聚糖) 等因素采用正交设计实验方法, 采用五因素四水平的实验条件进行发酵, 同时测定发酵后上清液与沉淀物 (菌体) 的酶活, 以确定最佳培养条件。正交实验结果如表2、表3所示。

依据文献[4],这种菌株产生的甲壳素脱乙酰酶不是胞外酶就是酶存在于周质中,通过比较上清液与菌体的酶活大小,如表2所示,上清液的酶活不是为零,就是远低于菌体(稍加研磨)的酶活,上清液存在少量的酶活可能是由于离心转速不够,上清液中仍存在微量菌体所造成。故认为该酶为存在于周质中的酶,属细菌类在大规模的发酵生产中,细菌的生长比真菌更容易且迅速。该酶的获得只需将发酵液离心去除上清液,即可获得具有一定活性的酶。因此,海洋细菌产甲壳素脱乙酰酶可以不经必要的酶的纯化就可以直接获得利用。

表2 上清液与菌体酶活

编号	酶活 u/mL	
	上清液	菌体
1	0	0.015
2	0	0.069
3	0	0.048
4	0.064	0.228
5	0	0.063
6	0.048	0.212
7	0	0.018
8	0.045	0.087
9	0.026	0.071
10	0	0.025
11	0	0.019
12	0.051	0.098
13	0	0.036
14	0	0.0340
15	0	0.020
16	0.051	0.076

表3 正交实验结果

序号	pH	金属离子	添加底物	培养时间 (h)	温度 (°C)	酶活 (u/mL)
1	3.0	无	有	48	25	0.015
2	3.0	Ca <sup>2+</sup>	否	56	30	0.069
3	3.0	Zn <sup>2+</sup>	有	72	35	0.048
4	3.0	Fe <sup>2+</sup>	否	80	40	0.228
5	4.0	无	否	72	40	0.063
6	4.0	Ca <sup>2+</sup>	有	80	35	0.212
7	4.0	Zn <sup>2+</sup>	否	48	30	0.018
8	4.0	Fe <sup>2+</sup>	有	56	25	0.087
9	5.0	无	有	80	30	0.071
10	5.0	Ca <sup>2+</sup>	否	72	25	0.025
11	5.0	Zn <sup>2+</sup>	有	56	40	0.019
12	5.0	Fe <sup>2+</sup>	否	48	35	0.098
13	6.0	无	否	56	35	0.036
14	6.0	Ca <sup>2+</sup>	有	48	40	0.034
15	6.0	Zn <sup>2+</sup>	否	80	25	0.020
16	6.0	Fe <sup>2+</sup>	有	72	30	0.076
偏差平方和	0.009	0.022	0.001	0.021	0.009	
自由度	3	3	3	3	3	
F	0.726	1.774	0.081	1.694	0.726	
极差 R	0.054	0.096	0.020	0.092	0.061	

由表3可知,在培养过程中,影响酶活大小的因素排列为:金属离子>培养时间>温度>pH>底物;其中,底物存在与否对酶活影响最小;而在金属离子的影响中,Zn<sup>2+</sup>离子对酶活有抑制作用,这是由于金属离子与壳聚糖能形成一种稳定的复合物,从而产生抑制作用,影响酶的活性<sup>[9]</sup>;从正交效应曲线图中显示Fe<sup>2+</sup>的指标较高,但由于Fe<sup>2+</sup>本身具有一定颜色,所测定出的酶活仅有序号3的条件下稍高一些,其它添加Fe<sup>2+</sup>的条件的酶活并不高;通过正交效应曲线图分析,得到培养的适宜条件为:pH=4.0,加金属离子Ca<sup>2+</sup>,添加底物壳聚糖,培养时间为80h,温度为35°C,酶活力为0.212(u/mL)。

**2.4.2 温度对甲壳素脱乙酰酶活性的影响:** 在 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液中 (pH = 4.0), 加入 1 mL 酶液与 1 mL 底物, 分别于不同温度测定酶活力, 得到结果如下图 4 所示, 甲壳素脱乙酰酶的最适作用温度为 50℃, 当温度高于 60℃ 时, 酶活力显著下降, 当温度达到 80℃ 时, 大部分酶活已经丧失。在同一温度下, 作用时间越长, 酶活损失就大。

**2.4.3 pH 值对甲壳素脱乙酰酶活性的影响:** 在 50℃ 水浴中, 将甲壳素脱乙酰酶分别于不同 pH 值的 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  与柠檬酸缓冲液中, 测定酶活力, 得到结果如图 5 所示, 甲壳素脱乙酰酶作用的最适 pH 为 4.5~5.00 之间。当 pH 大于 5.5 时, 酶活力明显下降。

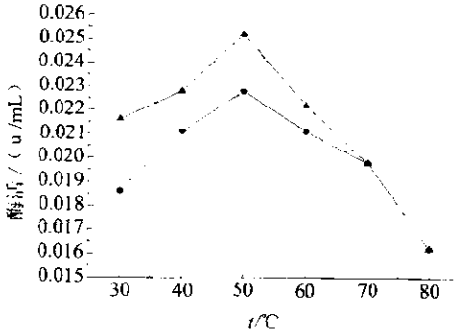


图 4 温度对甲壳素脱乙酰酶活性的影响

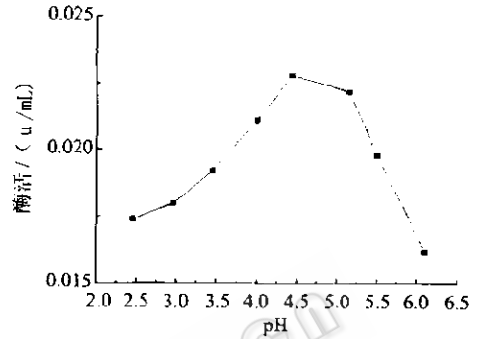


图 5 pH 值对甲壳素脱乙酰酶活性的影响

▲ 30min, ● 60min

**2.4.4 甲壳素脱乙酰酶对黑曲霉菌体中甲壳素作用:** 依上述酶的性质, 选择 50℃, pH 为 4.5 条件, 对从微生物法发酵得到的黑曲霉菌体中所得甲壳素进行脱乙酰化实验, 得到脱乙酰度为 22.8%, 说明所得到的甲壳素脱乙酰酶对甲壳素有脱乙酰的作用。具体酶作用的工艺条件需进一步研究。

### 3 结论

(1) 筛选到产甲壳素脱乙酰酶菌种为产碱属芽孢杆菌 (CDA 为酶存在于周质中), 其产酶适宜培养条件: pH = 4.0, 温度为 35℃, 加金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ , 培养时间为 80 h; 所得甲壳素脱乙酰酶适宜的作用条件为: pH: 4.5~5.0, 温度: 45℃~50℃。(2) 运用基因工程提高酶的活性及其酶学特性均有待于进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 段 杉, 彭志英. 食品与发酵工业, 2001, 28 (4): 65~68.
- [2] 吴潇潇, 朱旭芬. 东海海洋, 2001, 19 (2): 14~18.
- [3] 李兴旺. 食品工业, 2000, 5: 1~3.
- [4] Srinivasan V R. US patent 5739015, 1998.
- [5] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 等. 微生物学通报, 2001, 28 (3): 60~64.
- [6] 李智盈, 韩宝芹, 贾志良, 等. 青岛海洋大学学报, 1999, 29 (4): 643~648.
- [7] 顾真泉, 马承铸, 韩长安. 上海农业学报, 2001, 17 (3): 92~96.
- [8] 陈 盛, 陈祥旭, 黄丽梅, 等. 化学世界, 1996, 479~422.
- [9] 葛正红, 曾 嘉. 中国医药工业杂志, 2002, 33 (8): 378~380.