

木霉几丁质酶和几丁寡糖的制备及提纯

沈奕¹, 伍万荣¹, 高智谋^{1*}, 王革²

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 安徽合肥 230036; 2. 云南玉溪红塔集团生化研究中心, 云南玉溪 653100)

摘要 [目的]为木霉几丁质酶和几丁寡糖的开发应用提供必要的技术支持。[方法]由高产几丁质酶的木霉菌株 YHS-1 液体振荡培养得到木霉几丁质酶粗酶液, 分别测定了木霉菌株 YHS-1 在不同时间、不同温度下的几丁质酶活值, 优化木霉产酶条件。并研究了儿丁寡糖的制备及提纯方法。[结果]供试木霉最佳产酶温度为 35 ℃, 最佳产酶时间为 4 d, 此时酶活值为 55 U。几丁质酶粗酶液通过 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀、阴离子交换柱层析、SDS-PAGE 提纯后可以达到层析纯, 出现单一并且峰值很高的层析峰, 电泳确认 2 条带, 分别为几丁质外切酶和几丁质内切酶。几丁寡糖用初提纯的几丁质酶与过量的胶态几丁质反应得到粗溶液, 再经过蛋白质沉淀和冷冻离心后得到纯化。[结论]建立了木霉几丁质酶和几丁寡糖的制备及提纯方法, 为木霉几丁质酶和几丁寡糖的开发应用提供了必要的技术支持。

关键词 木霉; 几丁质酶; 几丁寡糖; 制备; 提纯

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)16-07332-02

Preparation and Purification of *Trichoderma* Chitinase and Chitooligosaccharide

SHEN Yi et al (College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The technical support for the preparation and purification of *Trichoderma* chitinase and chitooligosaccharide was provided. [Method] The crude solution of *Trichoderma* chitinase was obtained from the liquid of *Trichoderma* strain-YHS-1 cultured and the chitinase activity of *Trichoderma* strain-YHS-1 at the different times (1, 2, 3, 4 and 5 days) and temperatures (20, 30, 35 and 40 ℃) were determined, respectively, for the research on the its preparation and purification method. [Results] The results showed that the optimum temperature for the production of chitinase was 35 ℃ and the optimum time, the fourth day and at the condition, enzyme activity was 55 U. Chromatographically pure chitinase could be obtained by (NH₄)₂SO₄ fractional precipitation, anion-exchange chromatography, SDS-PAGE. A singular and high chromatography peak could be found and two electrophoretic bands could be validated from gel electrophoresis. The two bands are exochitinase and endochitinase. The crude extract of chitooligosaccharide was produced by enzymolysis of chitinase and colloid chitin. The pure chitooligosaccharide could be obtained through the purification of the crude extract with protein sedimentation and refrigerated centrifugation. [Conclusion] The preparation and purification method of *Trichoderma* chitinase and chitooligosaccharide was established.

Key words *Trichoderma*; Chitinase; Chitooligosaccharide; Preparation; Purification.

木霉(*Trichoderma* spp.)作为重要的植物生防因子(biocontrol agents),已被广泛用于植物病害的生物防治。木霉菌株产生的包括几丁质酶在内的细胞壁降解酶,在木霉重寄生中起着重要作用。几丁质酶具有广泛的生理功能,特别是抑制真菌生长发育、抵抗真菌感染,在植物体内的诱导和积累对增强植物的抗病能力发挥着重要的作用^[1]。木霉几丁质酶具有较长货架保存期,利用协同增效作用的原理可以与少量的化学杀菌剂混合,也可以与生防细菌混合,用以防治温室或大田作物病害^[2]。几丁寡糖(Chitooligosaccharide, COS)为几丁质的降解产物,是2~10个N-乙酰氨基葡萄糖以糖苷键连接而成的糖类总称。已有报道^[3-8]指出,几丁寡糖对多种植物病原菌具有良好的抑制作用,对环境安全,对人畜无害,不会导致产品的农药残留。可见,几丁质酶和几丁寡糖均具有重要的生物防治价值和广阔的开发应用前景。笔者以高产几丁质酶的木霉菌株 YHS-1 为供试菌株,就木霉几丁质酶和几丁寡糖的制备及提纯的方法进行了探索,旨在为木霉几丁质酶和几丁寡糖的开发应用提供必要的技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。木霉菌株(*Trichoderma* sp.) YHS-1 由云南玉溪红塔集团技术中心生理生化室提供。

1.1.2 供试培养基。

(1) 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。取200 g 马铃薯切成片状,加入少量水中煮沸30 min,4层纱布过滤后加入20 g 葡萄糖,用蒸馏水定容至1 000 ml,加入20 g 琼脂,待全部溶解后于121 ℃下湿热灭菌30 min。

(2) 木霉产酶培养基。参照李华等^[9]的配方配制。取2 g KH₂PO₄、3 g NH₄NO₃、0.6 g MgSO₄·7H₂O、0.1 g FeSO₄·7H₂O、0.5% 胶态几丁质,溶解于1 000 ml 蒸馏水中,加入5 g 胶态几丁质,待全部溶解后于121 ℃下湿热灭菌30 min。

1.2 方法

1.2.1 几丁质酶的制备。

1.2.1.1 粗酶液制备。供试木霉接种在含PDA培养基的培养皿中,26 ℃下培养7 d,以含0.1%吐温80的灭菌水洗下菌株孢子,4层纱布过滤,滤液即为孢子悬浮液。然后以每瓶10⁶孢子量接种到装有100 ml 产酶培养基的250 ml 锥形瓶中,放恒温摇床(200 r/min, 27 ℃)上培养7 d,4层纱布过滤并10 000 r/min 冷冻离心30 min,上清液即为粗酶液。

1.2.1.2 几丁质酶的提纯。

(1) (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀。粗酶液加固体(NH₄)₂SO₄至95%饱和度,过夜后10 000 r/min 离心30 min,弃去上清液,将沉淀溶于适量Tris-HCl 缓冲液(浓度0.05 mol/L, pH 值8.0)中,并在同样缓冲液中透析24 h。

(2) 阴离子交换柱层析。将已透析好的酶液施于经Tris-HCl 缓冲液(浓度0.05 mol/L, pH 值8.0)平衡好的阴离子交换柱。酶蛋白先用5倍柱床体积的相同缓冲液洗脱至A₂₈₀不变,再用100 ml 相同缓冲液和NaCl(浓度1 mol/L)进

基金项目 安徽省教育厅自然科学重点项目(2006KJ057A)。

作者简介 沈奕(1973-),男,江西九江人,硕士,工程师,从事真菌学及植物真菌病害研究。*通讯作者,博士,教授, E-mail: gaozhimou@126.com。

收稿日期 2009-03-17

行线性梯度洗脱,流速为 2 ml/min,在层析仪上出现洗脱峰时收集洗脱液。

1.2.2 几丁质酶的蛋白含量测定。蛋白含量测定采用 Bradford 法^[10],以标准牛血清蛋白为标准蛋白。

1.2.3 几丁质酶纯度和分子量测定。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)^[11]测定几丁质酶纯度和测定其分子量,方法略有改动:聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,以 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白为标准蛋白。0.1% 考马斯亮兰储存液的配制方法:溶解 0.2 g 考马斯亮兰于 80 ml 蒸馏水中并搅拌 5~10 min;加 120 ml 甲醇并搅拌至所有染料溶解;过滤,将上面的溶液以 1:1 的比例与浓度 20% 乙酸混合。染色和脱色的程序:①TCA(三氯乙酸)振荡漂洗 30 min;②蒸馏水振荡漂洗 30 min;③CBB(考马斯亮兰储存液)振荡浸泡 45 min;④蒸馏水振荡漂洗 30 min;⑤浓度 20% 乙醇振荡漂洗 30 min 2 次;⑥蒸馏水振荡漂洗 30 min 2 次;⑦浓度 5% 乙酸振荡漂洗 15 min;⑧蒸馏水漂洗 30 min 2 次。

1.2.4 木霉几丁质酶产生条件的优化。将供试木霉孢子悬浮液以 10^6 个/ml 接种到含产酶培养基 100 ml 的锥形瓶中,并在 20、30、35、40 °C 下发酵,每隔 24 h 分别测定各温度下几丁质酶的活性(采用 DNS 法^[12]),得出几丁质酶活性的曲线图,确定木霉产几丁质酶的最佳温度和时间。

1.2.5 几丁寡糖的制备。

(1) 胶态几丁质的制备。将 10 g 几丁质(Sigma 公司)在通风橱内溶解于 130 ml 浓盐酸中,4 °C 下静置 24 h,与 5 倍体积预冷至 4 °C 的浓度 50% 乙醇混合,2 h 后,用蒸馏水冲洗至中性,并将其定容至 1 000 ml。

(2) 几丁寡糖粗溶液的制备。用初提纯的几丁质酶与过量的胶态几丁质于 40 °C 下反应 3 h,10 000 r/min 离心 30 min 以去除多余的几丁质颗粒,上清液即为杂几丁寡糖溶液。

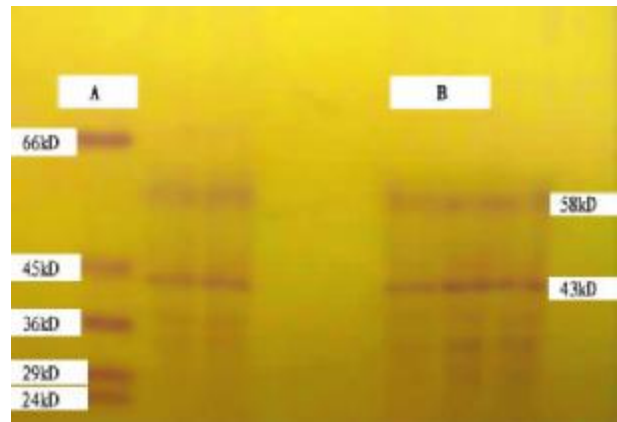
(3) 几丁寡糖提纯。将上清液置于高压蒸汽灭菌锅内 121 °C 保持 30 min(将所有反应体系内的蛋白质变性并沉淀析出),10 000 r/min 离心 30 min,上清液即为初提纯的几丁寡糖溶液。取 1 ml 几丁寡糖溶液与 3 ml DNS 在沸水浴中反应 15 min,置 470 nm 紫外光下比色,读取吸光度,根据寡糖浓度标准曲线确定几丁寡糖溶液的浓度。

2 结果与分析

2.1 木霉几丁质酶的提纯结果 木霉发酵液经过滤、冷冻离心后获得上清液即为粗酶液,经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、透析和阴离子交换柱层析后,对活性管酶液进行电泳确认纯度;收集酶活性强且谱带单一的管为初纯化的几丁质酶溶液。酶液经 SDS-PAGE 测定,与标准蛋白比较,分子量约为 58 kD 和 43 kD(图 1)。

由表 1 可知,提纯后的几丁质酶的比活是粗酶液的 4.9 倍。从木霉几丁质酶层析结果图可以看出,第 2 个(几丁质酶)峰单一并且峰值很高,但是经电泳确认纯度时却出现了 2 条明显的电泳带(图 1),分析后认为木霉产几丁质酶包括几丁质内切酶和几丁质外切酶。

2.2 木霉产酶条件的优化结果 结果由表 2 可知,40 °C 下,木霉在前 4 d 不产生几丁质酶,20 °C 下产酶呈不断升高的趋势,但是总产酶量却不及 30 °C 和 35 °C 下的高,而 30 °C



注:A 为标准蛋白;B 为几丁质酶。

Note: A. Standard protein marker; B. Chitinase.

图 1 木霉几丁质酶的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE result of *Trichoderma chitinase*

和 35 °C 下前 4 d 的产酶量呈上升趋势,从第 4 天开始下降。该试验没有测定 5 d 后的产酶情况,因为无论是生产上还是实验室内,都应该以节约成本和时间作为优先考虑的问题,虽然 20 °C 和 40 °C 下木霉有可能在 5 d 后产酶总量超过 30 °C 和 35 °C,但该试验还是认为最佳产酶的温度和时间应该为 35 °C 下第 4 天。

表 1 木霉几丁质酶提纯结果

Table 1 The purification result of chitinase in *Trichoderma*

酶样 Enzyme sample	总蛋白量 mg Total protein content	酶活//U Enzyme activity	酶比活 U/mg Specific enzyme activity	提纯倍数 Purified multiplication
粗酶液 Crude enzyme liquid	7.2	200	27.8	-
初提纯酶液 Initial purified enzyme liquid	1.6	217	135.6	4.9

表 2 不同温度条件下培养不同时间木霉产几丁质酶的活性

Table 2 Chitinase activity of *Trichoderma* with different culture time under different temperature conditions U

温度 //°C Temperature	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
20	0	30	33	35	36
30	0	29	42	51	48
35	0	39	52	55	52
40	0	0	0	0	27

2.3 几丁寡糖的制备与提纯 将几丁质在通风橱内溶解于浓盐酸中,4 °C 下静置 24 h,与 5 倍体积预冷至 4 °C 的浓度 50% 乙醇混合,2 h 后,用蒸馏水冲洗至中性,并将其定容至 1 000 ml,得到胶态几丁质。用初提纯的几丁质酶与过量的胶态几丁质于 40 °C 下反应 3 h,10 000 r/min 离心 30 min 以去除多余的几丁质颗粒,上清液即为几丁寡糖粗溶液。将几丁寡糖粗溶液置于高压蒸汽灭菌锅内 121 °C 保持 30 min,10 000 r/min 离心 30 min,上清液即为初提纯的几丁寡糖溶液。经测定,所制取的几丁寡糖溶液浓度为 2 mg/ml,可以用于生物活性测定和有关试验。

3 结论与讨论

(1) 高产几丁质酶的木霉菌株 YHS-1 能在一定的培养条件

(下转第 7369 页)

直链淀粉代谢体系适应于较高温度条件,而中、低直链淀粉品种的直链淀粉代谢体系则适应于较低温度条件^[20]。对于作米粉用的陆两优 996 可根据其直链淀粉积累的温度特性,调整播期或通过恰当的栽培管理措施,使其灌浆结实期温度维持在某一较高范围内,以提高陆两优 996 成熟籽粒的直链淀粉含量,进而提高稻米品质。

水稻籽粒的充实过程,主要为淀粉的合成与累积过程,淀粉的积累受一系列与淀粉合成代谢有关酶的调控。程方民等的研究表明,在籽粒灌浆初期,高温条件下籽粒中 ADPG 焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶的活性均不同程度高于适温处理,而在灌浆中后期,不同温度条件下籽粒中有关酶的活性变化与蔗糖含量、淀粉含量间的关系较为复杂,认为可溶性淀粉合成酶较 ADPG 焦磷酸化酶对温度敏感,温度可能是通过影响这两种酶的活性而影响籽粒中淀粉的合成^[6-7]。该文研究表明,高温条件下灌浆前期籽粒 ADPG 焦磷酸化酶和可溶性淀粉合成酶活性较适温条件下高,说明高温条件下灌浆前期籽粒中直链淀粉快速积累是与其籽粒中相对较高的 ADPG 焦磷酸化酶和可溶性淀粉合成酶活性联系在一起的。笔者根据高温条件下籽粒灌浆前期直链淀粉积累速率较适温条件下快,与淀粉合成有关酶活性高这一现象推测这些酶可能并不是直接对温度敏感的酶。高温导致籽粒过早停止灌浆可能主要是高温诱导一系列生理伤害,包括一些自由基对各种酶的破坏。因此,高温导致水稻稻米品质变差的机理还有待于从多方面进一步研究。

参考文献

- [1] 黄发松,孙宗修,胡培松,等.食用稻米品质形成研究的现状与展望[J].中国水稻科学,1998,12(3):172-176.
- [2] 莫惠栋.我国稻米品质的改良[J].中国农业科学,1993,26(4):8-14.
- [3] 郭银燕,张云康,王忠民.浙江省早籼稻近期区试品种(系)蒸煮品质研

究[J].作物学报,1997,28(5):573-579.

- [4] 朱旭东,熊振民,罗玉坤,等.异季栽培对稻米品质的影响[J].中国水稻科学,1993,7(3):172-174.
- [5] 汤圣祥,江云珠,李双盛,等.早籼稻胚乳淀粉体的扫描电镜结构观察[J].作物学报,1999,25(2):269-272.
- [6] 程方民,钟连进,孙宗修.灌浆结实期温度对早籼稻米淀粉 DSC 曲线和晶体特性的影响[J].自然科学进展,2003,13(5):490-494.
- [7] 程方民,蒋德安,吴平,等.早籼稻籽粒灌浆过程中淀粉合成酶的变化及温度效应特征[J].作物学报,2001,27(2):201-206.
- [8] 程方民,钟连进,孙宗修.灌浆结实期温度对早籼水稻籽粒淀粉合成代谢的影响[J].中国农业科学,2003,36(5):492-501.
- [9] 彭佑松,郑志仁,刘涤,等.淀粉的生物合成及其关键酶[J].植物生理学通讯,1997,33(4):297-303.
- [10] UMEMOTO T, NAKAMURA Y, ISHIKURA N. Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm[J]. Phytochemistry, 1995, 40(6): 1613-1616.
- [11] 沈鹏,金正勋,罗秋香,等.水稻灌浆过程中籽粒淀粉合成关键酶活性与蒸煮食味品质的关系[J].中国水稻科学,2006,20(1):58-64.
- [12] 何秀英,甄海,伍时照,等.糙米直链淀粉单粒测定研究[J].广东农业科学,1999(1):2-4.
- [13] 梁建生,曹显祖,徐生,等.水稻籽粒库强与其淀粉积累之间关系的研究[J].作物学报,1994,20(6):685-691.
- [14] STARK D M, TIMMERMAN K P, BARRY G F, et al. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase[J]. Science, 1992, 258: 287-292.
- [15] SMITH A M, DENYER K, MARTIN C R. What controls the amount and structure of starch in storage organs[J]. Plant Physiology, 1995, 107: 673-677.
- [16] OKITA T W. Is there an alternative pathway for starch synthesis[J]. Plant Physiology, 1992, 100: 560-564.
- [17] PREISS J. Starch biosynthesis and its regulation[J]. Biochemical Society Transactions, 1991, 19(3): 539-547.
- [18] KEELING P L, BACON P J, HOLT D C. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase[J]. Planta, 1993, 191: 342-348.
- [19] 沈波,陈能,李太贵,等.温度对早籼稻米垩白发生与胚乳物质形成的影响[J].中国水稻科学,1997,11(3):183-186.
- [20] GOMEZ K A. Effect of environment on protein and amylose content of rice[J]. 国外农学——水稻,1981(3):146-148.
- [21] 周德翼,张嵩午,高如嵩,等.稻米直链淀粉含量与结实期温度间的关系研究[J].西北农业大学学报,1994(2):2-5.

(上接第 7333 页)

下产生几丁质酶,其产几丁质酶的最佳温度为 35℃,产酶高峰期第 4 天,40℃条件下,前期几乎不产几丁质酶,但是从第 4 天开始,产酶量剧增,35℃条件下第 2 天开始产酶,之后每天递增,第 4 天到达产酶量的最高峰,20℃和 30℃条件下的产酶情况和 35℃条件下同,产酶总量低于 35℃的,因此,从生产的角度来看,在考虑成本和时间的双重前提下,应当以 35℃条件下,木霉发酵 4 d 为最佳的产酶条件。

(2) 木霉 YHS-1 在产酶培养基三角瓶内经过 4 d 发酵后,通过过滤去除菌丝体、高速冷冻离心、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、24 h 透析、阴离子交换柱层析后可以得到层析纯的几丁质酶,产生的层析峰单一且峰值高,电泳可以确认 2 条带,其中 1 条为几丁质内切酶,1 条为几丁质外切酶。将几丁质酶与过量的胶态几丁质于 40℃下反应 3 h,离心除去多余的几丁质,再经蛋白质沉淀和冷冻离心,即得到纯化的几丁质酶。

(3) 该研究建立了木霉几丁质酶和几丁质寡糖的制备及提纯的方法,为木霉几丁质酶和几丁质寡糖的开发应用提供了必要的技术基础。

参考文献

- [1] 蔡芷荷,吴清平.木霉和粘帚霉的生物防治研究进展[J].微生物学通

报,1998,25(5):284-286.

- [2] 徐同,柳良好.木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用[J].植物病理学报,2002,32(2):97-102.
- [3] 黄丽萍,刘宗明.几丁寡糖、壳寡糖的应用与开发[J].中国微生物学杂志,1998,10(3):180-183.
- [4] 王扬,姜永江,杨文鸽.酶法制备几丁寡糖和壳寡糖研究现状与进展[J].东海洋,2001,19(4):40-45.
- [5] RUBY D, GADELLE A, TOPPAO A. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 143(3):885.
- [6] BURKHANOVA F G, YARULLINA G L, MAKSIMOV V I. The control of wheat defense responses during infection with *Bipolaris sorokiniana* by chitin oligosaccharides[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(1): 119-126.
- [7] OLIVEIRA Jr EN, GUEDDARIEI EN, MOERSCHBACHER M B, et al. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitin oligosaccharides[J]. Mycopathologia, 2008, 166: 163-174.
- [8] SHEN Y, GAO Z, WANG G, et al. Control effects and mechanism of chitin oligosaccharide on tobacco black shank[J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 90:260.
- [9] 李华,刘开启,王革.利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性[J].仲恺农业技术学院学报,2003,16(1):19-22.
- [10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Ann Biochem, 1976, 72: 1105-1112.
- [11] LAEMMLI V K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-682.
- [12] D R 马歇克, J T 门永, R R 布格斯,等.蛋白质纯化与鉴定指南[M].北京:科学出版社,1999.