

# 一种简易、高效产几丁质脱乙酰酶菌种的筛选方法

刘丽萍<sup>1</sup>, 赵祥颖<sup>2</sup>, 刘建军<sup>1,2</sup>, 田延军<sup>2</sup>, 张家祥<sup>2</sup>

1(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安, 271018) 2(山东省食品发酵工程重点实验室, 山东济南, 250013)

**摘要** 几丁质脱乙酰酶是催化几丁质直接脱乙酰生成壳聚糖的一种酶, 已报道的酶活力测定方法存在操作复杂、底物昂贵等不足, 不适合用于菌种筛选。研究中建立了1种分光光度法测定几丁质脱乙酰酶酶活的新方法, 该方法具有操作简便、稳定性、重现性好等特点, 适合于菌种筛选工作。

**关键词** 几丁质脱乙酰酶, 对硝基乙酰苯胺, 对硝基苯胺, 菌株筛选

壳聚糖(chitosan)是几丁质的N-脱乙酰基形式, 具有良好的生物相容性和生物可降解性, 在食品、化妆品、轻工、印染、环保和生物医药等领域有着广泛的用途<sup>[1]</sup>。几丁质脱乙酰酶(chitin deacetylase, 简称CDA, E. C. 3. 2. 1. 41)是能够将几丁质分子中的乙酰基直接脱除而生成壳聚糖的酶。关于微生物产CDA的研究开始于1970年代, 但研究进展缓慢, 主要是由于几丁质作为酶解底物不溶于水, 而脱乙酰产物的测定也缺乏简便易行的方法, 造成CDA酶活力的测定非常困难。目前用于CDA酶活测定的方法主要有以放射性标记乙酰基的可溶性几丁质为底物, 酶作用后测定释放出的乙酸的放射性等<sup>[2~8]</sup>3种, 这些方法都存在底物昂贵、步骤繁琐、耗时长、仪器要求高等不足, 不适合用于菌株的筛选工作。因此, 建立1种简便、易行的CDA酶活力测定方法对产CDA微生物的筛选工作具有重要的现实意义。

笔者等人针对目前CDA酶活力测定方法存在的不足, 建立了1种简单的CDA测定新方法, 并有效地应用于CDA产生菌的筛选, 取得了良好的效果。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与仪器

用于菌株筛选的土样采自山东威海、吉林松原等地, 共15份。

实验仪器主要包括: 紫外可见分光光度计UV7500, 上海天美科技仪器有限公司; 气相色谱仪GC9790, 浙江福立分析仪器有限公司; 分析天平METTLER AE200, 梅特勒-托利多上海仪器有限公司; 酸度计PHS-2CpH, 上海伟业仪器厂。

### 1.2 平板筛选培养基(g/L)

胶体几丁质 2.5,  $K_2HPO_4$  0.7,  $KH_2PO_4$  0.3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, NaCl 0.1, 对硝基乙酰苯胺 2, 琼脂 2, 将胶体几丁质的酸溶液与其余组分分开灭菌(121℃灭菌20 min), 倒平板之前混合, 将pH调至7.2~7.4, 然后倒平板。

### 1.3 发酵培养基(g/L)

葡萄糖 5, 酵母膏 5,  $(NH_4)_2SO_4$  4,  $KH_2PO_4$  1.5, pH自然, 121℃灭菌20 min。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 样品特征吸收波长的测定

将对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺配制成10mg/L的水溶液, 采用紫外可见分光光度计UV7500在600~190 nm扫描, 以蒸馏水作参比, 测定特征吸收波长。

#### 1.4.2 对硝基苯胺标准曲线的绘制

精确称取0.010 0 g对硝基苯胺, 加水溶解并定容于100 mL容量瓶, 混匀后进行梯度稀释, 以蒸馏水作参比, 测定各稀释液在400 nm处的吸光值( $A_{400}$ )。以对硝基苯胺浓度为横坐标, 以 $A_{400}$ 为纵坐标绘制标准曲线。

### 1.5 产酶菌株的筛选

#### 1.5.1 平板筛选

样品适当处理后用无菌水进行梯度稀释, 涂布于筛选平板上, 30℃恒温培养2~7 d, 观察菌落周围的颜色变化, 挑取周围出现黄色的菌落, 移接至斜面, 30℃培养3 d。

#### 1.5.2 摇瓶筛选

将活化的斜面菌株刮取1环, 转接到250 mL无菌三角瓶(装液量30 mL)中, 30℃, 180r/min振荡培养3 d, 将培养液摇匀, 测定发酵液中的酶活力, 选取酶活力较高的菌株。

## 2 结果与分析

### 2.1 几丁质脱乙酰基酶活力测定方法的建立

第一作者: 在读硕士研究生(刘建军研究员为通讯作者)。

收稿日期: 2007-08-07, 改回日期: 2007-12-05

### 2.1.1 对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺特征吸收波长的确定

将对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺的水溶液在紫外可见分光光度计 UV7500 上进行扫描,结果如图 1 所示。

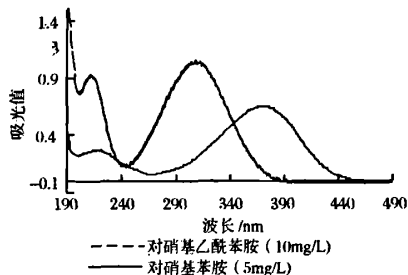


图 1 对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺吸收波长扫描图

含有乙酰基的对硝基乙酰苯胺经脱乙酰基酶催化脱乙酰基后生成对硝基苯胺,图 1 所示对硝基苯胺的最大吸收峰出现在 380 nm 处,而对硝基乙酰苯胺的最大吸收峰为 317 nm,2 者特征吸收交叉较少,采用分光光度法测定其混合液中各物质含量时,相互干扰较小,因此可以精确的测定反应体系中对硝基苯胺的生成量,间接反映酶活力的高低。

### 2.1.2 对硝基苯胺标准曲线的绘制及其含量的测定

由图 1 可知,在 400 nm 处对硝基苯胺的吸收值

约为最大吸收的 70%,而对硝基乙酰苯胺在此处基本没有吸收,选择测定波长 400 nm。对硝基苯胺标准曲线见图 2。

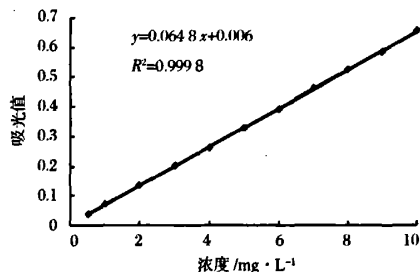
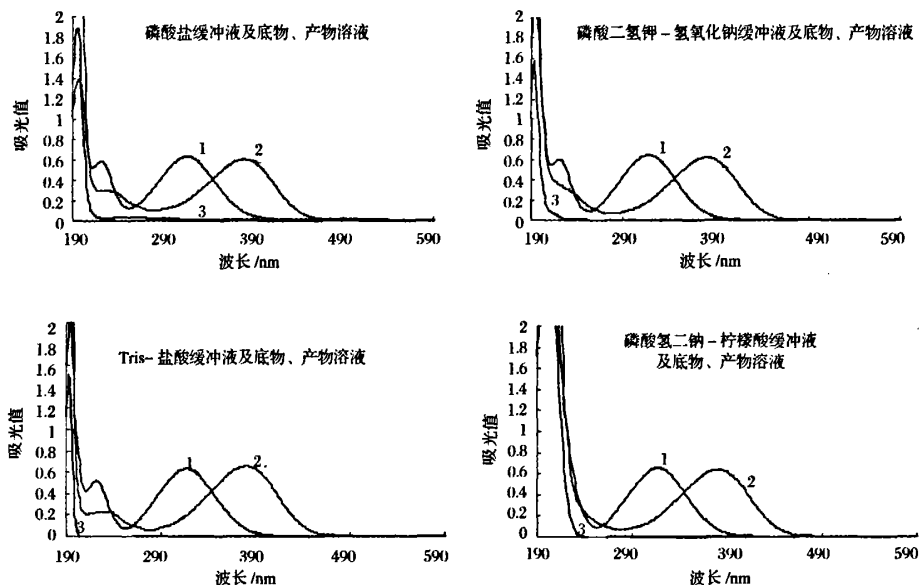


图 2 对硝基苯胺标准曲线

对硝基苯胺溶液在 400 nm 处的吸光值与溶液浓度之间具有良好的线性关系,此标准曲线的  $R^2 = 0.9998$ ,说明符合比尔定律,可以通过比色法进行定量测定。

### 2.1.3 缓冲体系对对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺特征吸收的影响

分别用 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸盐、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH 和 Tris-HCl 缓冲液配制对硝基乙酰苯胺底物和对硝基苯胺产物溶液,在 500~190 nm 波长范围内扫描,考察缓冲体系对底物或产物吸收波长的影响,结果如图 3 所示。



1—对硝基乙酰苯胺的相应缓冲体系溶液;2—对硝基苯胺+相应缓冲体系溶液;3—相应的缓冲体系

图 3 各种缓冲体系对两种物质特征吸收的影响

测定结果显示,所考察的 4 种缓冲体系在底物和产物的最大吸收峰处都没有吸收,说明上述缓冲液均

可以用于酶活力的测定。

#### 2.1.4 对硝基乙酰苯胺底物浓度的确定

由对硝基苯胺标准曲线的测定可知,在 1~10 mg/L 的浓度范围内吸光值在 0.1~0.8,在酶反应过程中也应控制产物对硝基苯胺的浓度在此范围内。酶活测定中要求底物过量,对硝基乙酰苯胺在冷水中的溶解度比较低,实验结果表明,在室温条件下 200 mg/L 的对硝基乙酰苯胺没有结晶析出,因此实验中将 200 mg/L 的对硝基乙酰苯胺溶液作为母液保存在 4℃ 冰箱中,用时取 1 mL,酶解液终体积为 5 mL,底物浓度为 40 mg/L。

#### 2.1.5 酶反应体系及反应条件的确定

在洁净的试管中加入 1 mL 200 mg/L 的底物、3 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液,50℃ 水浴保温 3 min,加入 1 mL 酶液,混匀后于 50℃ 水浴保温 15 min,沸水浴终止酶促反应,加水定容至 10 mL,混匀,3 000 r/min 离心 10 min,测定上清液的吸光值(A)。空白对照体系为 1 mL 200 mg/L 的底物加 3 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液,1 mL 灭活酶液(高温灭活),加水定容至 10 mL,混匀,离心,测定上清液的吸光值(A<sub>0</sub>)。

酶活单位的定义:在上述反应条件下每小时产生 1 μg 对硝基苯胺所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mL)。计算公式为:

$$\text{酶活力} = \frac{(A - A_0) \times \text{酶液稀释倍数}}{kT}$$

式中:A,定容后酶解液样品的吸光值;A<sub>0</sub>,定容后酶解液空白的吸光值;T,酶促反应时间,h;k,线性系数,0.064 8。

#### 2.2 几丁质脱乙酰酶菌株的筛选

从来自东北松原和山东威海等地的 15 份土样中,通过平板变色圈法共挑取 459 株菌株,经摇瓶发酵,用上述方法测定发酵液的酶活力,部分筛选结果见表 1。

结果证明,建立的脱乙酰基酶活力测定方法,用于产脱乙酰基酶菌种的筛选是可行的,从分析结果可以看出,摇瓶发酵后各菌株酶活存在较大的差别,批次摇瓶结果的重现性较好。

#### 2.3 菌株产酶对胶体几丁质<sup>[9]</sup>的脱乙酰作用

对筛选到的产脱乙酰基酶菌株发酵液对几丁质的脱乙酰基能力进行了验证。结果见图 4、图 5 和图 6。

表 1 摇瓶发酵筛选结果

菌号	酶活/(U·L <sup>-1</sup> )		
	初筛	复筛	
3-1	102.24	92.92	98.35
5-3	97.16	90.78	99.72
11-3	109.95	104.31	115.91
20-4	102.24	100.23	101.83
44-5	82.46	87.57	85.56
72-4	87.93	82.21	93.43
156-3	94.55	98.34	99.67
228-6	65.38	65.88	67.44
300-17	76.92	70.33	74.17
306-1	111.28	114.34	109.15

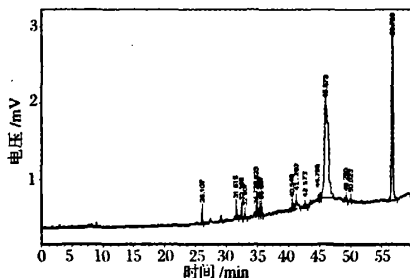


图 4 空白气相色谱图

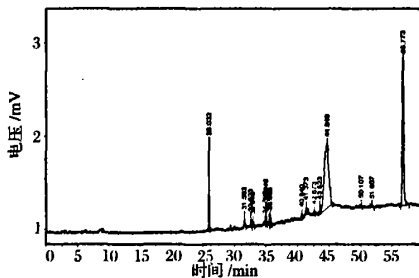


图 5 样品气相色谱图

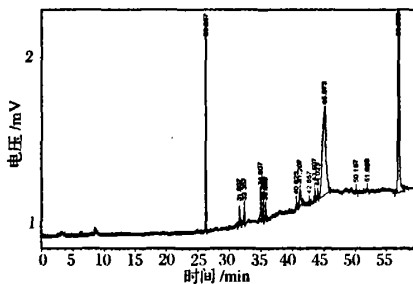


图 6 样品添加标准醋酸溶液气相色谱图

结果表明,醋酸保留时间为 26 min 左右;空白对照中 26.107 min 有 1 吸收峰,峰高为 191.212,峰面积为 924.000;酶解液中 26.032 min 处有 1 吸收峰,峰高为 935.857,峰面积为 4593.100,在 26 min 处有 1 吸收峰,说明有醋酸存在。说明该菌株所产的酶作用于几丁质,反应体系中有醋酸生产,而醋酸是由几

丁质脱乙酰产生的,证明该酶对几丁质具有脱乙酰作用,建立的 CDA 测定新方法用于菌株筛选是可行的。

### 3 结 论

根据对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺颜色的不同,采用变色平板定向筛选产脱乙酰基酶菌株;以对硝基乙酰苯胺、对硝基苯胺分别作为酶的作用底物和产物,建立了 1 种测定脱乙酰基酶活力的新方法,实践证明,该方法操作简单、准确度高,适合从大批量样品中筛选目标菌株,采用该方法初步筛选到 1 支产酶菌株,研究证实该菌株产的酶对几丁质具有脱乙酰基作用,表明建立的测定对硝基苯胺生产量间接反映几丁质脱乙酰酶活力高低的新方法用于产酶菌株的筛选是可行的。

### 参 考 文 献

- 1 Duarte M L, Ferreira M C, Marvao M R, et al. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by spectroscopy [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2001, 28: 359~363
- 2 Araki Y, Ito E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* [J]. Enzymatic deacetylation of chitin [J]. Eur J Biochem, 1975, 55: 71~78
- 3 Kauss H, Jeblick W, Young D H. Chitin deacetylase from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* [J]. Plant Science Letters, 1982/83, 28: 231~236
- 4 Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* [J]. Proceedings of the National Academy of the United States of America, 1993, 90(7): 2 564~2 568
- 5 Gao Xiao dong, Tetsumoto, Onodera K. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia coerulea* [J]. J Biochem(Tokyo), 1995, 117: 257~263
- 6 Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin Deacetylation by Enzymatic Means: Monitoring of Deacetylation Processes [J]. Carbohydrate Research, 1995, 273: 235~242
- 7 Tsigos I, Bouriotis V. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 274(44): 26 286~26 291
- 8 Amorim R V S, Ledingham W M, Fukushima K, et al. Screening of chitin deacetylase from *Mucoralean* strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32: 19~23
- 9 Sun Chul Kang, Sanggyu Park, Dong Gyu Lee. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizumansopliae* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 73(3): 276~281

## A Simple and Rapid Method for Screening Chitin Deacetylase Producing Strains

Liu Liping<sup>1</sup>, Zhao Xiangying<sup>2</sup>, Liu Jianjun<sup>1,2</sup>,

Tian Yanjun<sup>2</sup>, Zhang Jiaxiang<sup>2</sup>

1(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University<sup>1</sup>, Taian 271018, China)

2(Shandong Food and Fermentation Engineering Research Major Laboratory, Jinan 250013, China)

**ABSTRACT** Chitin deacetylase (EC 3. 5. 1. 41) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of acetamine groups of N-acetyl-D-glucosamine in chitin, converting it to chitosan. Although the previous methods are very sensitive, they need costly equipments or substrates. Those methods cannot be used for screening of chitin deacetylase producing strains. In this paper we reported a new spectrophotometric method for screening of highly efficient chitin deacetylase producing strains, and determining chitin deacetylase activity. The new method is fast, simple, and reproducible, and can therefore be used routinely for estimating chitin deacetylase activity.

**Key words** chitin deacetylase, 4-Nitroacetanilide, *p*-Nitroaniline, screening strains