

地衣芽孢杆菌几丁质酶在枯草芽孢杆菌中的重组表达及其制备氨基寡糖的研究

袁 源^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 张 康^{1,2}, 朱煦飏^{1,2}, 夏 伟^{1,2}, 吴 敬^{1,2}

1. 江南大学/食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要: 将地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 来源的几丁质酶基因 *blchiA* 在枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中进行重组表达, 构建了枯草芽孢杆菌工程菌株 (*B. subtilis* WS9/pHY300PLK-*blchiA*), 发酵上清液的酶活为 $0.73 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对重组酶 BLCHIA 的酶学性质进行表征, 其在 pH 6.0 和 60 °C 时表现出最佳活性, 比活为 $3.68 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜离子 (Cu^{2+}) 和亚铁离子 (Fe^{2+}) 对其活性有一定促进作用, 在 pH 5.0~8.0 和 50~60 °C 下稳定性较好。此外, 研究表明重组酶对脱乙酰度 >95% 的壳聚糖的催化能力明显优于胶体几丁质, 并且水解胶体几丁质和壳聚糖的产物类型具有明显差异, 以胶体几丁质为底物主要生成几丁二糖, 以壳聚糖为底物可生成聚合度为 2~7 的壳寡糖。研究获得的重组酶 BLCHIA 在壳聚糖降黏和制备不同聚合度的低聚糖方面具有良好的应用前景。

关键词: 几丁质酶; 枯草芽孢杆菌; 重组表达; 氨基寡糖

中图分类号: Q 556

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID): 



Recombinant expression of *Bacillus licheniformis* chitinase in *B. subtilis* and preparation of amino-oligosaccharides

YUAN Yuan^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, ZHANG Kang^{1,2}, ZHU Xuyang^{1,2}, XIA Wei^{1,2}, WU Jing^{1,2}

1. Jiangnan University/State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China

2. School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In this study, a chitinase *blchiA* from *Bacillus licheniformis* was recombinantly expressed in *B. subtilis*, and the *B. subtilis* engineering strain (*B. subtilis* WS9/pHY300PLK-*blchiA*) was constructed. The enzyme activity in the fermentation supernatant was $0.73 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. The enzymatic properties of recombinant enzyme BLCHIA were characterized, and its best activity was obtained at pH 6.0 and 60 °C, and the specific activity was $3.68 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} and Fe^{2+} could promote its activity, and its stability was good at pH 5.0~8.0 and 50~60 °C. In addition, the catalytic ability of the recombinant enzyme on chitosan with a degree of deacetylation > 95% was significantly better than that of colloidal chitin, and the types of hydrocolloid chitin and chitosan were significantly different. Using colloidal chitin as substrate, the recombinant enzyme could mainly produce chitobiose, but using chitosan as substrate, it could produce chitosan oligosaccharide with polymerization degree of 2~7. The results have a good application prospect for viscosity reduction of chitosan and preparation of oligosaccharides with different polymerization degrees.

Keywords: Chitinase; *Bacillus subtilis*; Recombinant expression; Amino oligosaccharide

收稿日期: 2021-10-12; 修回日期: 2022-01-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD0901901)

作者简介: 袁 源 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为酶工程与技术。E-mail: 6200208066@stu.jiangnan.edu.cn

通信作者: 吴 敬 (1969—), 女, 教授, 博士, 从事酶工程与技术研究。E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

几丁质又称甲壳素，是自然界中含量仅次于纤维素的天然高分子多糖^[1]，广泛存在于虾蟹、昆虫等甲壳类动物外壳及节肢动物外骨骼中，是真菌细胞壁的基本组分。由于天然存在的几丁质性质稳定，难溶于水、稀酸、碱，只溶于强无机酸，故很难被高效利用^[2]。壳聚糖是甲壳素部分脱乙酰基的衍生物，是天然多糖中唯一的碱性多糖^[3]，壳聚糖具有优异的生物学功能^[4]，如抗菌、抗肿瘤、提高免疫力，且安全无毒，是拥有巨大应用潜力的功能性生物材料。但壳聚糖分子量较大，人体难以吸收，未处理的壳聚糖只能溶于某些酸性溶液，黏度较高，使其在开发应用上受到极大限制。

几丁质断裂 β -1,4-糖苷键生成的产物几丁寡糖和壳聚糖解聚生成的壳寡糖统称为氨基寡糖，聚合度低于 10。氨基寡糖具有优越的溶解性和多种生理功能，如益生元特性^[5]；这些寡糖可作为碳源支持有益肠道细菌的选择性生长；壳寡糖中的氨基和羟基可以结合养殖用水中的金属离子，净化养殖用水，防止金属离子对水产动物的毒害^[6]。氨基寡糖具有高聚合度多糖不可比拟的优越性能，在食品、医药、水产养殖等领域具有极好的应用价值，其规模化生产越来越受到关注。

几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 能催化水解 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 多聚物中的 β -1,4-糖苷键，根据与底物作用的位置不同，几丁质降解酶可分为 β -N-乙酰葡萄糖苷酶、内切几丁质酶和外切几丁质酶^[7]。其中 β -N-乙酰葡萄糖苷酶能够从非还原末端切割糖苷键释放 GlcNAc 单体；内切几丁质酶能够在多聚物中随机切割糖苷键生成不同聚合度的寡糖；外切几丁质酶能够在多聚物末端以二聚体为单位切割糖苷键生成几丁二糖。

据统计，每年海洋生物的几丁质合成量超 10 亿吨^[8]，水产及食品工业都会排放大量的甲壳素垃圾，造成严峻的环境问题。另一方面，通过几丁质酶高效降解几丁质及其衍生物的废弃物以提高其利用率、获得优良的氨基寡糖具有广阔前景^[9]。本文将从海洋藻类中分离得到的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中的几丁质酶基因 *blchiA* 在枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中进行重组表达，表征其酶学性质，重组酶有较广泛的 pH 耐受性和良好的热稳定性，研究发现重组酶对壳聚糖和胶体几丁质的水解模式有明显区别，可获得不同类型和不同聚合度的氨基寡糖，为制备氨基寡糖的工业应用奠定了

基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

blchiA (WP_016886405) 经密码子优化由上海捷瑞生物工程有限公司合成，并与载体 pET-20b (+) 连接获得 pET-20b (+)-*blchiA*。表达载体 pHY300PLK^[10] 和表达宿主菌 *B. subtilis* WS9^[10-11] 由笔者实验室前期构建并保存，JM109 感受态购于大连宝生物有限公司；无缝克隆试剂盒购于诺唯赞生物科技股份有限公司；蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物公司；壳聚糖、壳寡糖标准品购于青岛博智汇力生物科技有限公司；盐酸氨基葡萄糖购于上海甄准生物有限公司；胶体几丁质、N-乙酰氨基葡萄糖购于 Sigma 公司；其他分析纯试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

LB 培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)：酵母粉 5.00，胰蛋白胨 10.00，氯化钠 10.00；TB 培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)：酵母粉 24.00，甘油 5.00，胰蛋白胨 12.00，磷酸氢二钾 12.54，磷酸二氢钾 2.31。

1.2 方法

1.2.1 *blchiA* 基因克隆与表达载体构建

设计正向引物 (5'-CTGCGAGTGCTGAAGCCA TGGATAGCGGCAAAATTATAAAATCATCGG-3') 和反向引物 (5'-TTTTTATTACCAAGCTTTATTCTG CAGCCGCCGATAAG-3')，以 pET-20b (+)-*blchiA* 为模板扩增 *blchiA* 基因。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳验证，回收目的基因片段。设计正向引物 (5'-TAAAAGCTTGGTAATAAAAAACACCTCCAA G-3') 和反向引物 (5'-CATGGCTTCAGCACTCGCA G-3') 通过 PCR 扩增 pHY300PLK 载体，采用无缝克隆的方法将几丁质酶基因 *blchiA* 重组到质粒 pHY300PLK 载体上，获得重组表达质粒 pHY300PLK-*blchiA*。将重组质粒转化到感受态细胞 *E. coli* JM109 中，挑选阳性转化子进行酶切验证并送测序。将测序正确的质粒转化到感受态细胞 *B. subtilis* WS9 中，获得枯草芽孢杆菌工程菌 WS9/pHY300PLK-*blchiA*。

1.2.2 *blchiA* 基因表达

将构建的枯草芽孢杆菌工程菌接种至含有 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 四环素 (Tet) 的 LB 液体培养基中，37 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养，当菌液 OD_{600} 达 0.6~0.8 时，调整温度至 33 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 48 h，

每隔 6 h 取样。将菌液 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液, 适当稀释测定酶活。取 OD₆₀₀ 为 5.0 的菌体沉淀用一定体积的缓冲液重悬菌体, 超声破碎 10 min (功率 135 W, 破碎 3 s, 间歇 2 s), 将获得的悬液 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集细胞破碎上清液。

1.2.3 重组酶 BLCHIA 的纯化

利用亲和层析镍柱纯化上述制备的重组蛋白。平衡液 (pH 7.4) 为 25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、500 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.45 μm 滤膜过滤除菌; 洗脱液 (pH 7.4) 为 25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、500 mmol·L⁻¹ NaCl 和 300 mmol·L⁻¹ 咪唑, 0.45 μm 滤膜过滤除菌。梯度洗脱得到 BLCHIA 纯化蛋白, 将洗脱液超滤浓缩, 用缓冲液复性并检测几丁质酶活性, 用 Bradford 方法测定其蛋白浓度, 利用 SDS-PAGE 分析纯化 BLCHIA 蛋白。

1.2.4 重组酶 BLCHIA 的胶体几丁质水解酶活

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法^[12-13] 测定总还原糖量。以 10 mg·mL⁻¹ 的胶体几丁质为底物, 250 μL 胶体几丁质和 150 μL 磷酸柠檬酸盐缓冲液 (50 mmol·L⁻¹) 在反应温度下预热 10 min, 加入 100 μL 适当稀释的发酵上清液/纯酶液混合均匀, 60 °C 水浴反应 1 h, 加入 2 mL 的 DNS 混合均匀以终止反应, 在沸水中煮沸 10 min, 立即冷却至室温; 以加入等量灭活的酶液作为空白对照。12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液于 540 nm 检测吸光度。由标准曲线计算酶活。将 60 °C 每分钟释放 1 μmol GlcNAc 所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

1.2.5 重组酶 BLCHIA 的壳聚糖水解酶活

以脱乙酰度>95% 的壳聚糖为反应底物, 在 10 mg·mL⁻¹ 的底物浓度和最适反应条件下测定重组酶的酶活。350 μL 的壳聚糖中加入 50 μL 稀释的纯酶液, 混合均匀在 60 °C 水浴反应 15 min, 加入 600 μL DNS 混合均匀以终止反应, 在沸水中煮沸 10 min, 立即冷却至室温; 以加入等量灭活的酶液作为空白对照。12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液于 540 nm 检测吸光度。由标准曲线计算酶活。将 60 °C 每分钟释放 1 μmol 氨基葡萄糖 (GlcN) 所需的酶量定义为 1 U。

1.2.6 重组酶 BLCHIA 的酶学性质研究

1) pH 对重组酶 BLCHIA 酶活和稳定性的影

响。将重组酶 BLCHIA 用不同 pH 的 50 mmol·L⁻¹ 缓冲液稀释 (pH 为 3.0 的甘氨酸-盐酸缓冲液、pH 为 4.0~8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、pH 为 9.0~10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液), 以 1.2.4 中的方法测定酶活, 定义最高酶活为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活, 确定重组酶的最适反应 pH。

将重组酶 BLCHIA 与不同 pH 的上述缓冲液混合, 4 °C 保温 24 h, 在最适 pH 下测定残余酶活, 以未处理的酶活为 100%, 计算各 pH 下重组酶的相对残余酶活。

2) 温度对重组酶 BLCHIA 酶活和稳定性的影响。在不同温度 (30~70 °C) 和最适 pH 下以 1.2.4 中的方法测定 BLCHIA 的酶活。定义最高酶活为 100%, 计算不同温度下的相对酶活, 确定重组酶的最适反应温度。将重组酶在 60 °C 保温不同时间, 在最适 pH 和温度下测定酶活, 以未处理的酶活为 100%, 计算保温不同时间后重组酶的相对残余酶活。

3) 金属离子对重组酶 BLCHIA 活性的影响。选择硫酸亚铁 (FeSO₄)、氯化钙 (CaCl₂)、氯化锰 (MnCl₂)、氯化铜 (CuCl₂)、氯化镍 (NiCl₂)、氯化镁 (MgCl₂)、氯化铁 (FeCl₃)、氯化锌 (ZnCl₂)、氯化钴 (CoCl₂) 测定金属离子对 BLCHIA 酶活性的影响。在最适 pH 下, 将酶液与 50 mmol·L⁻¹ 的盐溶液混合, 确保最终反应体系的金属离子浓度为 10 mmol·L⁻¹, 4 °C 保温 24 h, 以 1.2.4 中的方法测定加入不同金属离子的酶活, 定义最高酶活为 100%, 计算加入金属离子后重组酶的相对酶活。

1.2.7 重组酶 BLCHIA 水解特性测定

以脱乙酰度>95% 的壳聚糖、胶体几丁质为底物测定重组酶 BLCHIA 的水解特性。将纯酶液按照 3% 的加量添加到 30 mg·mL⁻¹ 的壳聚糖溶液和胶体几丁质中, 60 °C、200 r·min⁻¹ 反应 5 h, 分别在反应第 15、第 30、第 60、第 180、第 300 分钟时取样, 沸水浴 10 min 灭酶以终止反应, 采用薄层色谱法 (TLC) 鉴定产物组成。取 5 μL 标准品和样品在 TLC Silica gel 60 F254 高效硅胶板上每间隔 10 mm 进行点样, 将硅胶板置于预饱和好的层析缸中, 采用上行法展开。按 V(正丁醇) : V(甲醇) : V(28% 氨水) : V(水)=5 : 4 : 2 : 1 作为展开剂^[14], 5% 硫酸乙醇溶液作为显色剂, 将充分展开后显色的硅胶板置于 95 °C 烘箱中观察显色情况。

采用 Shodex NH2P-50 4E 色谱柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$) 进行检测, 柱温为 30°C , 乙腈-水为流动相, 以 75%~50% 的乙腈进行梯度洗脱, 流速设置为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 以 $10 \mu\text{L}$ 进样体积进样, 检测器为蒸发光散射检测器。

1.2.8 数据处理

采用 OriginPro 2021 软件对数据进行统计分析, 每组试验做 3 次平行, 结果用“平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$)”表示。采用 SPSS 20.0 软件对数据进行显著性差异分析 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 表达载体构建与重组酶的表达

使用 *Hind* III 限制性内切酶对构建的表达载体 pHY300PLK-blchiA 进行酶切验证 (图 1)。在 5 126 和 2 415 bp 处有明亮的条带, 与预期结果相符。由金唯智生物技术有限公司测序确定表达载体 pHY300PLK-blchiA 构建成功后, 转入枯草芽孢杆菌宿主菌 WS9。将该重组菌进行摇瓶发酵并每隔 6 h 取样测定产酶情况 (图 2)。几丁质酶的酶活随发酵时间延长不断上升, 48 h 发酵上清液酶活可达 $0.72 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时, 检测发现发酵 48 h 的破碎上清液无几丁质酶酶活, 表明几丁质酶 BLCHIA 已完全分泌到胞外。此外, 本研究对将不含 *blchiA* 基因的空载体 pHY300PLK 转化至 WS9, 摆瓶发酵后进行了几丁质酶酶活的测定, 未检测到酶活。表明地衣芽孢杆菌来源的几丁质酶基因 *blchiA* 在枯草芽孢杆菌中成功表达。

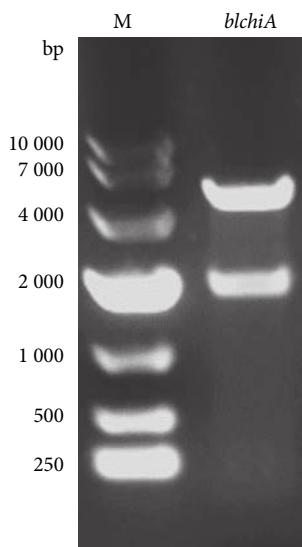


图1 pHY300PLK-blchiA表达载体的鉴定

Fig. 1 Identification of pHY300PLK-blchiA expression vector

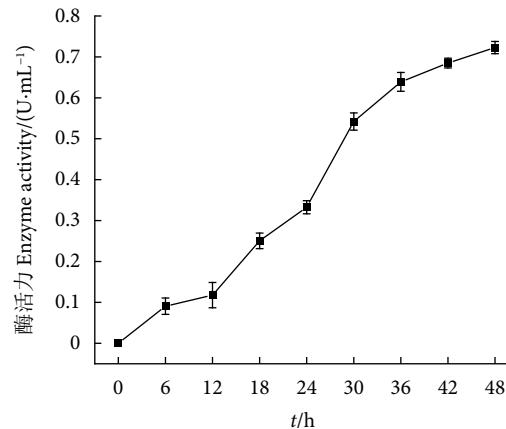
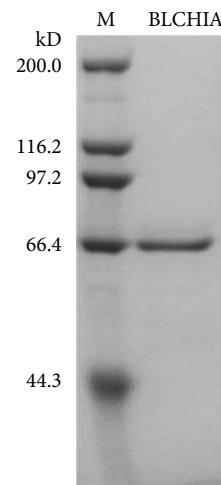


图2 重组几丁质酶BLCHIA摇瓶发酵过程的酶活

Fig. 2 Enzyme activity of recombinant chitinase BLCHIA in shake flask fermentation

2.2 重组酶 BLCHIA 的纯化

发酵上清经过膜预处理后加载到亲和层析柱上, 经梯度咪唑浓度对目的蛋白初步分离, SDS-PAGE 检测结果见图 3。当咪唑浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 洗脱液经超滤浓缩, 在 66.4 kD 左右处可见单一的目的蛋白条带。经测定, 该条带对 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胶体几丁质及脱乙酰度 $>95\%$ 的壳聚糖均有水解活性。以胶体几丁质为底物测定 BLCHIA 纯酶液的比活为 $0.92 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。



M. 蛋白高分子量标准。
M. Protein high molecular mass standards.

图3 重组几丁质酶BLCHIA的分离纯化

Fig. 3 Separation and purification of recombinant BLCHIA

2.3 重组酶性质表征

2.3.1 pH 对重组酶 BLCHIA 酶活和稳定性的影响

重组酶在 pH 4.0~9.0 内都有较高活性, 在 pH 6.0 时, 酶活达到最高 (图 4-a), 由此确定 BLCHIA 适合在中性偏弱酸的环境中进行水解反应; 重组几丁质酶在 pH 介于 3.0~10.0 内能保持 70%

以上的活性, 在 pH 介于 4.0~8.0 内能保持 90% 以上的活性, 在 pH 7.0 时酶活保持效果最佳(图 4-b),

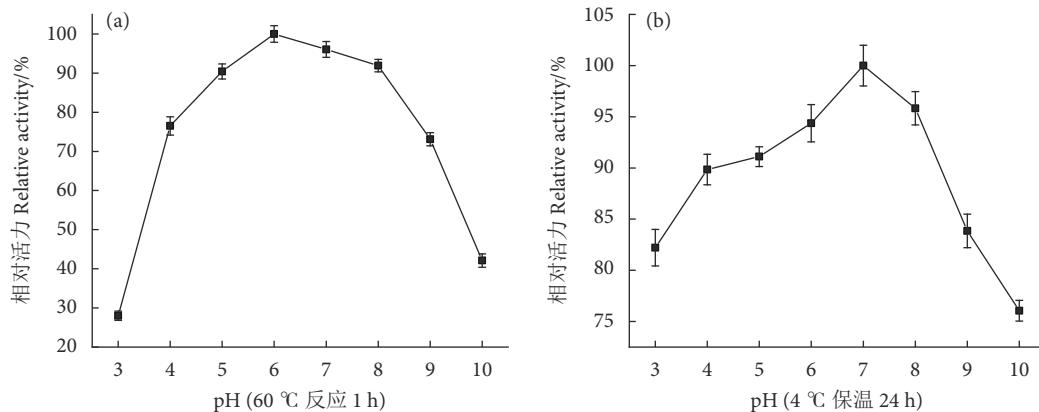


图4 重组几丁质酶BLCHIA的最适pH (a) 和pH稳定性 (b)

Fig. 4 Optimal pH (a) and pH stability (b) of recombinant chitinase BLCHIA

2.3.2 温度对重组酶 BLCHIA 酶活和稳定性的影响

提高反应温度可以增加酶促反应速率, 但温度过高会破坏酶的三维结构导致酶变性失活, 而具有良好的热稳定性是酶制剂工业化生产和应用的基础。重组几丁质酶 BLCHIA 在温度介于 40~70 °C 内均有一定活性, 在 50~60 °C 的活性较高, 在 60 °C 时酶活达到最高(图 5-a), 由此确定 BL-

CHIA 的最适反应温度为 60 °C, 而温度高于 60 °C 酶活下降明显。重组几丁质酶在 60 °C 放置 60 min 时, 残留酶活为 85% 以上; 60 min 后 BLCHIA 开始变得不稳定, 酶活迅速降低; 放置 120 min 后, 酶活约为初始的 50%; 放置 180 min 残留酶活约为初始的 30% (图 5-b)。

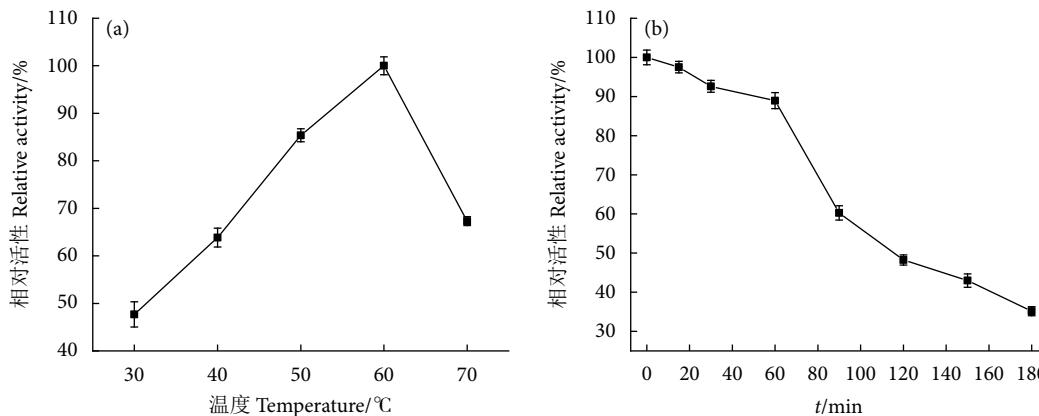


图5 重组几丁质酶BLCHIA的最适温度 (a) 和热稳定性 (b)

Fig. 5 Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of recombinant chitinase BLCHIA

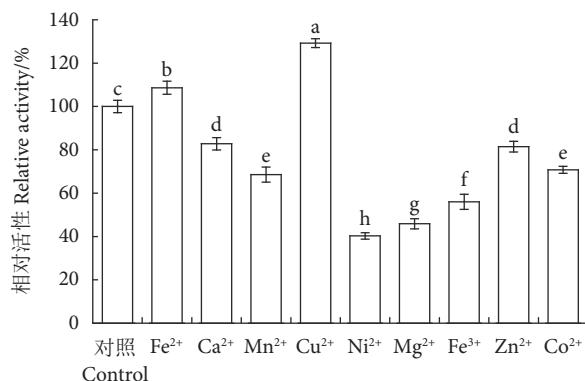
2.3.3 金属离子对重组酶 BLCHIA 活性的影响

金属离子可能会影响蛋白分子的结构稳定性或催化活性, 适当浓度的盐可以减轻蛋白表面的静电力, 使蛋白不容易形成紊乱结构, 降低产生不可逆失活的概率^[15]。加入 10 mmol·L⁻¹ 铜离子 (Cu²⁺) 可以使 BLCHIA 的酶活提至 129.2%, 亚铁离子 (Fe²⁺) 可以轻微提高 BLCHIA 的活性, 而镍离子 (Ni²⁺)、镁离子 (Mg²⁺)、钙离子 (Ca²⁺) 和锌离子 (Zn²⁺) 会在一定程度上抑制 BLCHIA 的活性, 其

中 Ni²⁺ 和 Mg²⁺ 将酶活降至 40.2% 和 45.8%, 抑制程度较明显(图 6)。有研究报道, Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 等多种金属离子对几丁质酶活性均有明显的抑制作用^[16], 与其他报道的几丁质酶不同, 重金属离子 Cu²⁺ 明显提高了 BLCHIA 的活性。

2.4 重组酶 BLCHIA 水解几丁质特性测定

通过薄层色谱分析了 BLCHIA 水解胶体几丁质的产物(图 7)。反应初期只有少量几丁二糖生成, 随着反应时间的延长, 几丁二糖逐渐累积并且没有



不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different letters indicate significant difference ($P<0.05$)。

图6 金属离子对重组几丁质酶BLCHIA酶活的影响

Fig. 6 Effect of metal ions on activity of recombinant chitinase BLCHIA

更大聚合度的几丁寡糖生成。在以胶体几丁质为底物时, 重组几丁质酶 BLCHIA 仅表现出外切活性, 能够在几丁质末端以二聚体为单位切割 β -1,4-糖苷键。

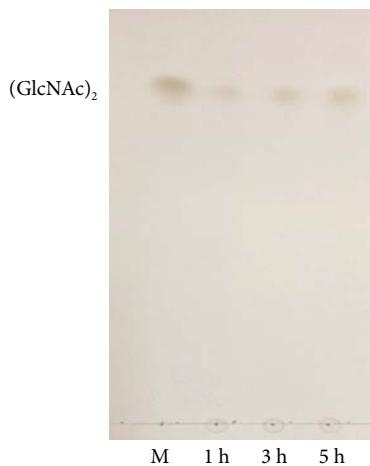


图7 BLCHIA水解胶体几丁质的薄层色谱分析

Fig. 7 TLC analysis of BLCHIA hydrolyzed colloidal chitin

2.5 重组酶 BLCHIA 水解壳聚糖特性测定

本研究首先测定了重组几丁质酶 BLCHIA 纯酶液对脱乙酰度>95% 的壳聚糖的水解活性, 发现对壳聚糖的活性明显高于胶体几丁质, 在 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的底物浓度和最适反应条件下, 以相同的酶活定义计算 BLCHIA 对壳聚糖的水解活性为 $4.52 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 约为以胶体几丁质为底物酶活的 4 倍, 说明 BLCHIA 更易和脱 N-乙酰基的壳聚糖相互作用, 更快速地切割壳聚糖链的糖苷键。

进一步通过薄层色谱检测了壳聚糖的水解产物(图 8), 以 3% BLCHIA 加酶量在最适反应条件下反应不同时间。反应过程中有一系列不同聚合度的壳寡糖生成, 在反应初期只生成少量的壳二糖和壳

三糖, 以及较多的壳四糖、壳五糖。随着反应时间的延长, 壳二糖占比增加, 壳五糖和壳六糖占比明显减少, 反应 3 h 后, 壳五糖和壳六糖基本消失, 说明 BLCHIA 持续将高聚合度的壳寡糖水解成低聚合度的壳寡糖。

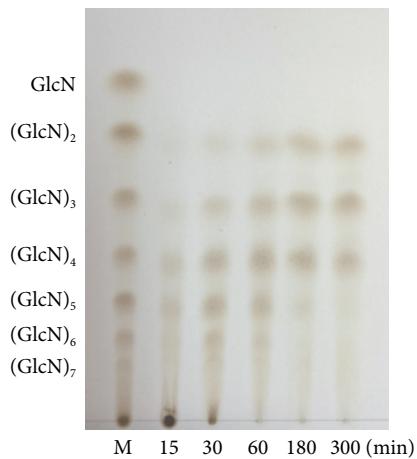


图8 BLCHIA水解壳聚糖的薄层色谱分析

Fig. 8 TLC analysis of BLCHIA hydrolyzed chitosan

本研究还将 BLCHIA 水解壳聚糖的产物进行 HPLC 检测, 并采用面积归一化法定量分析水解壳聚糖不同时间生成的各产物比例(表 1)。结果显示, 反应 30 min 即有二糖到七糖生成, 其中三糖到五糖的占比超过 70%; 反应 1 h 以上, 水解产物主要为二糖到五糖, 其中壳三糖占比最高。反应 1~3 h, 壳二糖的相对占比从 17.35% 增至 26.54%。根据壳四糖、壳五糖和壳二糖的相对占比可知 BLCHIA 持续将高聚合度的寡糖分解成低聚合的寡糖; 水解后期生成的壳三糖的占比超过 35%, 但是氨基葡萄糖始终没有明显增加, 占比不超过产物总量的 1%。结果表明, 根据实际需求通过控制反

表1 BLCHIA水解壳聚糖的产物峰面积占比

Table 1 Proportion of peak area of BLCHIA hydrolyzed chitosan

产物类型 Product type	反应时间 Reaction time				%
	30 min	1 h	3 h	5 h	
氨基葡萄糖 Aminoglucose	0.00	0.42	0.80	0.79	
壳二糖 Chitobiose	12.87	17.35	22.65	26.54	
壳三糖 Chitotriose	24.37	30.63	36.70	38.44	
壳四糖 Chitotetraose	27.73	27.49	26.26	24.94	
壳五糖 Chitopentaose	21.27	17.26	7.98	4.21	
壳六糖 Chitosan	8.85	4.56	2.99	2.67	
壳七糖 Chitoheptaose	3.37	2.28	2.61	2.40	

应时间可获得不同含量的聚合度为 2~7 的壳寡糖。

3 讨论

近年来, 随着对海洋生物资源的开发, 利用海洋微生物来源的多糖降解酶对多糖进行高效降解进而获得多种功能的低聚糖受到较高关注。几丁质及其衍生物是非常丰富且功能性很强的多糖资源, 高表达量的几丁质降解酶对降解几丁质并生成有价值的氨基寡糖意义重大。如何获得几丁质酶在食品安全菌中的高效表达并催化降解几丁质及其衍生物成为研究热点。

目前已报道的海洋微生物来源的几丁质酶酶活普遍较低, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophilia*) 几丁质酶 QDC01 在基础发酵条件下所产粗酶液酶活为 $0.21 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[17], 优化后最高酶活为 $0.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 海洋发光杆菌 *Photobacterium* sp. LG-1 几丁质酶经发酵条件优化最大酶活为 $0.34 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (根据文中数据, 按照本文的酶活定义折算)^[18]; 近海海域的海泥中分离得到的扩展短杆菌 (*Brevibacterium linens*) 最适条件产几丁质酶活为 $0.508 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[19]。将分离到的几丁质酶在野生菌中表达, 培养基成分复杂且发酵时间长达 72~96 h。异源表达可以一定程度提高产量, 根据实际需求选择合适的表达宿主也很必要。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[20] 虽然是使用最广泛的表达宿主, 但其周质空间内存在各种内毒素, 产品的安全性需要考量; 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)^[20] 作为表达宿主虽然分泌效率高, 但发酵周期长, 其产品的安全性也需考量; 枯草芽孢杆菌^[21] 具有非致病性的特点, 安全性高, 同时培养周期短, 对于工业生产缩短发酵周期也具有重要意义, 是一种目前食品、药品、畜牧等行业生产各种工业用酶的理想表达宿主。本研究将几丁质酶基因 *blchiA* 在枯草芽孢杆菌中重组表达, 重组几丁质酶的酶活为 $0.72 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 具有较高的最适反应温度和良好的 pH 耐受性, 具有工业化生产和应用的潜力。

海洋生物外壳(虾、蟹壳)是甲壳素类海洋多糖的主要来源, 高度结晶致密, 难以降解。对结晶甲壳素具有高活性的几丁质酶主要存在于 GH18 家族, 且具有由 2 个几丁质插入结构域 (CID) 形成深的催化裂隙增强底物结合的结构特征, 部分酶还含有几丁质结合域 (CBD)。此外, 一些 GH20 家族的酶也具有该活性。本研究中的几丁质酶 BLCHIA 属

于 GH18 家族糖昔水解酶, 同时具有几丁质和壳聚糖水解活性, 且对壳聚糖的水解活性更高。与米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 来源的 β -乙酰己糖昔酶 AoNagase^[22] 相似, AoNagase 是能同时水解壳聚糖和几丁质的 GH20 家族 β -乙酰己糖昔酶, 该酶对胶体几丁质的水解活性也低于壳聚糖。据报道, 几丁质酶对不同底物的偏好性可能是 CBD 和结合位点附近的芳香族残基使其能够更有效地降解结晶几丁质, 而缺乏 CBD 的几丁质酶可能偏好较少的结晶形式^[23-25]。此外, 催化区域中催化裂隙和底物结合位点的长度和深度似乎对底物特异性也有影响。在底物相互作用方面, 氨基的氮原子比亚氨基的氮原子更能发生氢键作用, 而乙酰氨基的氧原子更能与邻近的残基形成接触^[26]。本研究推断 BLCHIA 对壳聚糖的水解能力优于几丁质可能由酶与两种底物可及性的差异所造成, 有必要进一步研究 BLCHIA 的三维结构以及催化结构域与其功能的关系。

本研究进一步检测了重组酶 BLCHIA 降解几丁质的产物。BLCHIA 降解胶体几丁质主要生成几丁二糖, 体现出外切活性, 产物类型单一易于分离纯化。在医疗方面, 几丁二糖能防止术后组织粘连, 是一种安全性高、易吸收和降解的生物材料。此外, 几丁二糖被证明能强烈诱导几丁质酶在某些微生物中的表达, 如链霉菌和蘑菇^[27-28]。

壳寡糖是甲壳素类海洋多糖资源化利用的主要产品类型, 目前其酶解制备主要存在降解效率低、酶解产物特异性差的问题。未经降黏处理的高浓度的壳聚糖酶解效果普遍较差^[29-30], 原因在于壳聚糖黏度过高影响酶的扩散, 会限制酶与底物的有效接触。据洋洋^[31] 报道的壳聚糖酶以 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 未降黏处理的壳聚糖为底物, $58 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物的加酶量在最适反应条件下反应 3 h 才能达到水解终点; 朱玉霞等^[32] 报道了一种商品壳聚糖酶以 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 未降黏处理的壳聚糖为底物, $10 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物的加酶量在最适反应条件下反应 6 h 生成的还原糖量基本趋于平缓。重组酶 BLCHIA 对壳聚糖有较强水解能力, 在最适反应条件下, 以 $16.1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物加酶量与 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 未降黏处理的壳聚糖反应 15 min, 壳聚糖的黏度显著降低, 同时生成多种聚合度的壳寡糖, 在反应 1 h 生成的寡糖总量便基本达到平衡, 在工业化大规模生产氨基寡糖中有明显优势。

上述结果表明重组几丁质酶对壳聚糖降解体现

出内切活性, 可得到多种聚合度的壳寡糖。不同聚合度的壳寡糖在生理功能和活性上体现出差别。随着聚合度的增大, 壳二糖到壳五糖降低细胞内胆固醇和甘油三酯的作用逐渐减弱^[31]; 壳寡糖的抗肿瘤活性与其分子量有关, 与低分子量的壳寡糖相比, 高分子量的壳寡糖对小鼠 (*Mus musculus*) S180 细胞具有更高的抑制活性^[33]; 因为羟基、氨基等活性基团的作用, 壳寡糖具有很强的抗氧化活性, 通过比较几种低分子量壳寡糖的抗氧化活性, 发现壳二糖和壳三糖比氨基胍、维生素 B 和一种维生素 E 类似物有更强的羟自由基清除活性^[34]; 此外, 壳聚糖及其衍生物具有广谱抗菌活性, 研究表明分子量的升高, 壳寡糖对金黄色葡萄球菌的抑制效果增强^[35]。后期通过控制反应时间及优化加酶量有望获得主产物为特定聚合度的壳寡糖。

4 结论

本研究构建了枯草芽孢杆菌工程菌株, 并实现了几丁质酶基因 *blchiA* 在枯草芽孢杆菌中的重组表达。该重组几丁质酶 BLCHIA 具有广泛的 pH 耐受性 (pH 3.0~9.0) 和较高的最适反应温度 (60 °C), 适用于工业应用。重组酶对壳聚糖和胶体几丁质的水解模式有明显区别, 有望通过条件优化得到不同类型的氨基寡糖制品, 对高效利用甲壳素类多糖具有较高的实际价值。

参考文献:

- [1] 赵沙, 颜子娟, 张舒, 等. 细菌几丁质酶结构、功能及分子设计的研究进展 [J/OL]. 生物化学与生物物理进展. (2021-09-24). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20210924.1033.002.html>.
- [2] DOAN C T, TRAN T N, WANG S L. Production of thermophilic chitinase by *Paenibacillus* sp. TKU052 by bioprocessing of chitinous fishery wastes and its application in N-acetyl-D-glucosamine production [J]. Polymers, 2021, 13(18): 3048-3065.
- [3] 马帅, 杨绍青, 刘翊昊, 等. 枯草芽孢杆菌壳聚糖酶在毕赤酵母中的高效表达及其酶解特性 [J]. 食品科学, 2019, 40(14): 99-106.
- [4] 李汶澧, 李亚鹤, 徐年军, 等. 壳聚糖酶法降解工艺优化及其产物的抗氧化活性 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(11): 121-130.
- [5] AFFES S, MAALEJ H, ARANAZ I, et al. Enzymatic production of low-Mw chitosan-derivatives: characterization and biological activities evaluation [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 144: 279-288.
- [6] 杨春贵, 王纪亭. 壳寡糖在水产养殖中的应用研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2009, 30(4): 44-46.
- [7] OYELEYE A, NORMI Y M. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications [J]. BiosciRep, 2018, 38: BSR2018032300.
- [8] 文霞, 周少璐, 杨秀莊, 等. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 38-46.
- [9] 张新月, 张月琪, 王凤彪, 等. 海洋细菌来源几丁质酶的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 383-389.
- [10] 张康. 枯草芽孢杆菌菌株改造、启动子优化和普鲁兰酶的高效制备研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018: 29.
- [11] ZHANG K, SU L Q, WU J. Enhanced extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* using proteasedeficient strains and optimal feeding [J]. Appl Microbiol Bio, 2018, 102(12): 5089-5103.
- [12] SANDHYA C, ADAPA L K, NAMPOOTHIRI K M, et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation [J]. J Basic Microbiol, 2004, 44(1): 49-58.
- [13] 罗酒. 新型壳聚糖酶的高效表达及壳寡糖制备工艺研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2019: 15.
- [14] SONGSIRIRITTHIGUL C, LAPBOONRUENG S, PECHSRIC-HUANG P, et al. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (chiA), suitable for bioconversion of chitin waste [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(11): 4096-4103.
- [15] AFOLAYAN I A, OYUN J F, EKUNDAYO E A, et al. Purification and characterization of a thermostable chitinase produced by a fungus isolated from fruit tree rhizosphere [J]. Asian J Biochem, 2020, 6(2): 46-56.
- [16] DEBADITYA B, ANAND N, RAJINDER K G. Bacterial chitinases: properties and potential [J]. Crit Rev Biotechnol, 2007, 27: 21-28.
- [17] 王振东, 罗春艳, 杨晨, 等. 海洋细菌 QDC01 的鉴定及其几丁质酶基因的克隆与分析 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(6): 734-744.
- [18] 陈立功, 吴家威, 张冉, 等. 发光杆菌产几丁质酶的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 110-114, 131.
- [19] 张灿, 黄德智, 李丰硕, 等. 海洋产几丁质酶菌株的筛选及发酵条件优化 [J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 141-146.
- [20] 同子祥, 杨然, 李秀婷. 微生物表达系统研究进展 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 126-135.
- [21] 康倩, 向梦洁, 张大伟. 枯草芽孢杆菌在系统与合成生物技术中研究进展及工业应用 [J]. 生物工程学报, 2021, 37(3): 923-938.
- [22] QU T L, ZHANG C Y, QIN Z, et al. A novel GH family 20 β -N-acetylhexosaminidase with both chitosanase and chitinase activity from *Aspergillus oryzae* [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 684086.
- [23] LI Q, WANG F, ZHOU Y, et al. Putative exposed aromatic and hydroxyl residues on the surface of the N-terminal domains of chi1 from *aeromonas caviae* CB101 are essential for chitin binding and hydrolysis [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 7559-7561.
- [24] THIMOTEO S S, GLOGAUER A, FAORO H, et al. A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library [J]. Brazilian J Med Biol Res, 2017, 50(1): 1-13.

- [25] SYNSTAD B, VAAJE-KOLSTAD G, CEDERKVIST F H, et al. Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(3): 715-723.
- [26] LIU S J, SHAO S J, LI L L, et al. Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 418: 50-56.
- [27] SAITO A, FUJII T, SHINYA T, et al. The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *streptomyces coelicolor*A3(2) [J]. *Microbiology*, 2008, 154(11): 3358-3365.
- [28] NIU X, LIU Z H, YUAN S. The modes of action of chIIII, a chitinase from mushroom *Coprinopsis cinerea*, shift with changes in the length of GlcNAc oligomers [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(37): 6958-6968.
- [29] 许磊, 焦思明, 张文昌, 等. 微波强化壳聚糖固定相酸解研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 6-11.
- [30] 吴健锋, 张立彦. 高浓度壳聚糖溶液酶解条件优化 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 126-131.
- [31] 瑶洋洋. 壳寡糖的制备、分离纯化及生物活性研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2016: 22-23.
- [32] 朱玉霞, 李恒, 陈列欢, 等. 低聚合度壳寡糖制备及其组分的色谱行为分析 [J]. 食品工艺科技, 2013, 34(15): 281-283, 288.
- [33] QIN C Q, DU Y M, XIAO L, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2002, 31(1): 111-117.
- [34] ZHOU J, WEN B, XIE H, et al. Advances in the preparation and assessment of the biological activities of chitosan oligosaccharides with different structural characteristics [J]. *Food Funct*, 2021, 12(3): 926-951.
- [35] ZHENG L Y, ZHU J F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights [J]. *Carbohydr Polym*, 2003, 54(4): 527-530.