

壳聚糖酶的基因克隆表达及酶学性质研究

王琦¹, 崔阳¹, 刘进宝¹, 孙慧慧², 郭娜¹, 孙建安¹, 毛相朝^{*1,3}

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 作者从 NCBI 数据库中挖掘到来源于 *Butyrivibrio* sp. MC2013 的壳聚糖酶基因, 命名为 BUT, 该壳聚糖酶基因大小为 903 bp, 编码 301 个氨基酸。通过 NCBI 数据库和进化树比对发现, 该壳聚糖酶(BUT)属糖苷水解酶 46 家族(后简称 GH-46), 与其它壳聚糖酶相似度为 59%, 是一种新型的壳聚糖酶。序列经密码子优化后进行全基因序列合成, 与表达载体 pET21a(+)连接构建重组质粒 pET-21a-BUT, 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)表达宿主, 进行诱导表达。所得重组壳聚糖酶通过 Ni-NTA 亲和层析进行纯化, SDS-PAGE 确定其蛋白分子量为 35 kDa, DNS 法测定其酶活为 146.0 U/mg。对 BUT 酶的酶学性质进行探究, 结果表明 BUT 酶最适温度和 pH 分别为 45 °C、8.0, 在中性偏碱性条件下稳定性较强。Mn²⁺对其酶活力具有促进作用, SDS、Fe³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺等的抑制作用极强。通过 TLC 对其水解产物分析发现, BUT 水解壳聚糖的产物是壳二糖、壳三糖和壳四糖。

关键词: 壳聚糖酶; 壳聚糖; 壳寡糖; 克隆表达; 酶学性质

中图分类号: Q 814.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.022

Cloning, Expression, and Characterization of Chitosanase

WANG Qi¹, CUI Yang¹, LIU Jinbao¹, SUN Huihui², GUO Na¹, SUN Jianan¹, MAO Xiangzhao^{*1,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: A chitosanase gene BUT from the *Butyrivibrio* sp. MC2013 was selected from the NCBI database, which contains 903 bp and encodes a protein with 301 amino acids. Research has suggested that the chitosanase belongs to the GH-46 by sequence alignment in NCBI database and phylogenetic analysis. It is a novel chitosanase which shares 59% identities with any other chitosanases. The genes were synthesized after codon optimization and inserted into pET21a (+), then the recombinant plasmid, pET-21a-BUT, was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The chitosanase was induced in ZYP-5052 and purified with the affinity chromatography of Ni-NTA. The molecular weight was

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 宁波市科学技术局市级科技计划项目(ZD-A02-农业重大科技专项)(2017C110006)。

* 通信作者: 毛相朝(1981—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术、海洋生化工程研究。E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

引用本文: 王琦, 崔阳, 刘进宝, 等. 壳聚糖酶的基因克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 147-155.

estimated to be 35 kDa by SDS-PAGE. The maximum activity of purified enzyme was 146.0 U/mg. The enzymatic properties of recombinant chitosanase showed that the optimal temperature and pH of the BUT were 45 °C and 8.0, respectively. The stability in alkaline conditions was higher than that in acidic conditions. Mn^{2+} could significantly enhance the enzymatic activity, while SDS, Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} could inhibit the activity strongly. The analysis of hydrolysates by TLC demonstrated that chitosan was degraded into $(GlcN)_2$, $(GlcN)_3$, and $(GlcN)_4$.

Keywords: chitosanase, chitosan, chitooligosaccharide, cloning and expression, enzymatic properties

壳聚糖是一种阳离子碱性多糖,由 D-氨基葡萄糖(葡萄糖胺)通过 β -1,4 糖苷键连接而成,是甲壳素部分或完全脱去乙酰基后得到的产物。当甲壳素脱乙酰度(degree of deacetylation, DD)大于 55% 时则为壳聚糖^[1]。作为阳离子多糖,壳聚糖具有抑菌杀菌、降低胆固醇、预防高血压以及吸附重金属的重要机能。

尽管壳聚糖具有重要的生物活性,但溶解度低,不能溶于水和有机溶剂等缺点限制了其在食品、药品、化工制品中的应用。而壳聚糖的水解产物壳寡糖^[2]由于分子链长较短和 D-氨基葡萄糖中游离的氨基而具有很好的水溶性,得以更为广泛地应用于食品^[3]、农业、生物医药^[4]等领域。在食品行业中,壳寡糖是一种良好的天然防腐剂,安全且无毒副作用^[5],壳寡糖还可用作天然保鲜剂,可保持食品中的水分,并促进矿物质的吸收^[6]。农业上,壳寡糖可用作生物农药发挥抗虫害作用以提高植物抗病性,加速植株生长发育。在生物医药领域,具有潜在的医学应用价值^[7]。壳寡糖还能够保护人体胚胎干细胞的氧化应激反应,并有效抑制脯氨酰肽链内切酶活性^[8]。

壳聚糖酶可水解壳聚糖产生壳寡糖,是一种专一性作用于糖苷键,降解壳聚糖的水解酶^[9-10]。与非专一性酶相比,壳聚糖酶水解壳聚糖所需酶量较少,水解更彻底,产物活性更高,反应速度快,产物更单一,易于控制条件得到特定相对分子质量的产品^[11]。壳聚糖酶最适反应温度为 30~70 °C,反应的最适 pH 为 4~8,等电点在 4.0~10.1 之间^[12]。

壳聚糖酶按照不同的分类方式可分为不同类型。按氨基酸序列来划分,壳聚糖酶共分为 2、5、8、46、75、80 6 个糖苷水解酶家族,且以 46 族^[13-15]最多。按作用机制来划分,壳聚糖酶分为内切型和外切型,内切型壳聚糖酶在糖链上随机切割,产生聚

合度不同且以低聚物为主的寡糖混合物,大多壳聚糖酶为内切型。而外切型壳聚糖酶从糖链的非还原端进行切割,依次切下单体,得到单一产物。按水解方式划分,壳聚糖酶分为专一水解壳聚糖的酶和可水解壳聚糖和羧甲基纤维素两种物质的酶^[16]。虽然多种微生物可产生壳聚糖酶,但酶活性低,成分复杂难以分离纯化,较高的成本限制了壳聚糖酶的生产^[17]。作者通过克隆表达得到的酶与其它壳聚糖酶不完全相同,是一种较为新型的壳聚糖酶,且酶活较高,易于分离纯化。

近些年,由 NCBI 数据库进行基因挖掘已成为一种高效、便捷、筛选得到目的产物的重要方法得到广泛应用。作者通过基因挖掘由 NCBI 数据库检索到来源于 *Butyrivibrio* sp. MC2013 的壳聚糖酶基因,并尝试对基因进行克隆,与表达载体连接构建重组质粒,转入 *E. coli* BL21(DE3)表达宿主进行表达。然后研究重组壳聚糖酶的酶学性质和水解产物,为其工业制备和应用提供理论依据^[18]。

1 材料与方法

1.1 主要材料

*Bam*H I 和 *Hind* III 等限制性内切酶及 T₄ DNA 连接酶:Thermo Fisher Scientific 公司产品;感受态细胞 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3):北京天根生化科技公司产品;壳聚糖:Solarbio 公司产品;壳寡糖样品(聚合度 1-6):青岛博智汇力生物科技有限公司产品;琼脂糖:Invitrogen 公司产品;核酸染料 Redsafe:iNtRON 公司产品;蛋白胨、酵母粉、琼脂粉:Oxoid 公司产品;其他试剂等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

WD-9405B 型水平摇床:北京市六一仪器厂产品;HH-3A 水浴锅:常州智博瑞仪仪器制造有限公司产品;TGL16 离心机:长沙英泰仪器有限公司产

品;高速离心机:Sigma公司产品;PCR仪:Eppendorf公司产品;DYY-6C型电泳仪:北京市六一仪器厂产品;凝胶成像仪:上海培清科技有限公司产品;酶标仪:基因有限公司产品;JY92-IIN超声波细胞破碎仪:宁波新芝生物科技公司产品;恒温培养箱:上海喆图科学仪器公司产品;Haier生物冰箱:青岛海尔产品;DW-86L386立式超低温保存箱:青岛海尔特种电器产品;酶标仪:基因有限公司产品;JY92-IIN超声波细胞破碎仪:宁波新芝生物科技公司产品。

1.3 培养基

LB培养基:酵母提取物 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂粉 15 g/L(固体培养基时加入),121 °C灭菌 20 min。

ZYP-5052培养基:25 mL体系中,23.2 mL(胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L),50 μ L $MgSO_4$ (1 mol/L),1.25 mL 20 $\times$ P(1 mol/L 磷酸氢二钠;1 mol/L 磷酸二氢钾;0.5 mol/L 硫酸铵),高压灭菌后加入 0.5 mL 的母液(25 g/L 葡萄糖,100 g/L α -乳糖和体积分数 25%的甘油)。

1.4 壳聚糖酶重组质粒构建

1.4.1 目的基因选取 从NCBI数据库中检索到 *Butyrivibrio* sp. MC2013 菌种的基因序列中含有编码壳聚糖酶基因的序列(Genbank 序列号:WP_026508362)。密码子优化后,进行全基因序列合成。

1.4.2 引物设计 Primer premier 设计 PCR 上游、下游引物,引物序列包含 *Bam*H I 和 *Hind* III 的酶切位点。上游引物 BUT-F:5'-CGGGATCCATGCGTAAAGAAAAAAC-3',下游引物 BUT-R:5'-CCCAAGCTTTTATAGCGATAGCTTTCAGT-3'。

1.4.3 BUT 菌的目的片段扩增 以合成好的基因片段为模板进行 PCR 扩增。反应体系(50 μ L)为:KOD 酶 1 μ L,基因片段 DNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,dNTP 10 μ L,2 $\times$ buffer 25 μ L,ddH₂O 10 μ L。PCR Touchdown 程序为:95 °C预变性 5 min;95 °C变性 20 s,65~50 °C退火(每 2 次循环降低 1 °C)20 s,72 °C延伸 60 s,循环 30 次;95 °C变性 5 min;95 °C再变性 20 s,50 °C退火 20 s,72 °C延伸 60 s,15 个循环;最终 72 °C延伸 8 min。

1.4.4 核酸电泳及目的片段回收 制备 10 g/L 的琼脂糖凝胶,凝胶冷却凝固后将所有 PCR 产物注入凝胶孔中并于 120 V 电压下进行琼脂糖凝胶电泳。

电泳结束后使用紫外投射仪观察条带结果,切下含有单一条带的胶条并称重记录,使用 Omega 公司的 DNA 胶回收试剂盒进行目的片段的回收,得到的产物于 -20 °C 低温保存。

1.4.5 质粒 pET21a(+)的提取 将含 pET21a(+)的 *E. coli* 接种于 LB 培养基,37 °C,培养 8 h。质粒 pET21a(+)的提取使用 Omega 公司的质粒提取试剂盒完成。

1.4.6 目的片段及载体的双酶切与回收 使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切目的片段及 pET21a(+),酶切体系(50 μ L)为:*Bam*H I 和 *Hind* III 各 2.5 μ L,DNA 25 μ L,buffer 5 μ L,ddH₂O 15 μ L。在 37 °C 下酶切 2 h。酶切完成后进行琼脂糖凝胶电泳,并以未酶切的空质粒作为对照,核酸电泳方法同 1.4.4。酶切后的 DNA 片段在进行下一步连接前要进行纯化,使用 Omega 公司的 DNA 纯化试剂盒完成。

1.4.7 目的片段与载体的连接 连接反应总体积为 10 μ L,按酶切片段和酶切质粒摩尔浓度 3:1 计算连接体系,加入样品和 T₄ DNA 连接酶后,放置 16 °C 下进行过夜连接。

1.4.8 转化 10 μ L 的重组质粒与 50 μ L 感受态细胞 *E. coli* DH5 α 均匀混合,静置冰浴 30 min,再于 42 °C 热激 2 min,重复冰浴 1~5 min,加入 900 μ L LB 液体培养基,37 °C 下培养 45 min。将转化后的培养液 5 000 r/min 离心 2 min,吸取弃去 600 μ L 上清液,剩余部分均匀混合后吸取 200 μ L 涂入含 Amp 抗性的 LB 平板,37 °C 静置培养 12 h。

1.4.9 重组体的阳性克隆验证 挑取平板上的重组体单菌落,接种到含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 摇床培养 3~4 h 后取出。培养结束后,进行 PCR 验证,体系为:重组体 DNA 2 μ L,上下游引物(T7 通用、T7ter 通用)各 1 μ L,2 $\times$ Taq 酶 12.5 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。琼脂糖凝胶电泳,以 Marker 作为标准参照对照条带大小以确定是否为阳性克隆,后将 PCR 验证成功的相应克隆子菌液送测序比对。

1.5 壳聚糖酶基因连接体培养

选择测序成功的阳性克隆子对应菌液,提取重组质粒转入表达宿主 *E. coli* BL21 内,方法同 1.4.8。37 °C 过夜培养后,挑菌接种于 LB 试管,37 °C 摇床培养 8~10 h,获得目的菌的菌液。取一部分菌液于体积分数 20%甘油管中,-20 °C 低温保存。

1.6 壳聚糖酶重组蛋白的诱导表达

将构建好的重组 pET-21a-BUT 菌体接种至 5 mL 含 Amp 抗性 (1 000 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 液体培养基中, 菌体接种量为培养基液体体积的 1%, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床内震荡培养 12 h 以活化菌种。按体积分数 1% 接种量接种活化菌种至 ZYP-5052 诱导培养基中, 20 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 诱导 48 h。用含空载体的菌株, 在相同条件下进行诱导表达作为空对照。

1.7 SDS-PAGE 蛋白电泳

样品前处理: 上样样品与蛋白上样缓冲液按体积比 1:1 比例混合后, 沸水处理 10 min。煮沸后的样品与蛋白标准品各取 15 μL 注入胶孔内, 调节电压为 80 V 使蛋白在浓缩胶中运动下移, 当样品运动到分离胶后电压设定为 120~150 V, 当蛋白跑至胶底部时结束电泳, 关闭电源后将胶取下依次进行染色、脱色, 最后将胶样品放入凝胶成像仪拍照。

1.8 壳聚糖酶的纯化

ZYP-5052 培养基诱导 pET-21a-BUT 表达后, 收集菌液, 8 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 弃去上清, 向菌体沉淀中加入 10 mL pH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液, 超声波破碎处理 40 min, 在 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min 收集破碎后获得的粗酶溶液。

采用镍离子亲和层析法纯化重组壳聚糖酶粗酶液。将粗酶液、水、体积分数 20% 的乙醇和各梯度洗脱液先进行过膜预处理。按照 1 mL/min 的速度将粗酶液加入 Ni^{2+} 柱中, 收集穿透峰, 再用 10 mmol/L 的咪唑溶液洗去非特异性结合蛋白以平衡 Ni^{2+} 柱。依次使用 20~200 mmol/L 的咪唑溶液 (溶于 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 的 pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中) 进行洗脱, 考马斯亮蓝 G-250 用于蛋白的检测, 最后用 500 mmol/L 咪唑溶液将镍柱冲洗干净。收集的各梯度洗脱液后续进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

1.9 壳聚糖酶酶活测定

DNS 方法用于确定重组酶的酶活性。壳聚糖酶将壳聚糖链上的糖苷键断裂, 生成游离的还原糖, DNS 与还原糖发生显色反应。底物: 20 g/L 壳聚糖醋酸溶液 (醋酸溶液体积分数 1%)。

反应体系: 200 μL 壳聚糖底物, 200 μL pH=8 的 Tris-HCl 缓冲液, 20 μL BUT 酶液。45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。

壳聚糖酶酶活的定义: 壳聚糖酶水解底物壳聚

糖产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。比酶活是指 1 mg 酶蛋白具有的酶活。酶活计算公式 (1), 比酶活公式 (2) 如下^[19]。

$$\text{酶活 (U)} = ((C_t - C_0) \times V_0) / (t \times 0.18) \quad (1)$$

式中, C_t 为实验组还原糖质量浓度, (mg/mL); C_0 为对照组还原糖质量浓度, (mg/mL); V_0 为反应体系体积, (mL); t 为反应时间, min; 0.18 为葡萄糖相对分子质量, (mg/ μmol)。

$$\text{比酶活 (U/mg)} = U / (V_1 \times C_p) \quad (2)$$

式中, V_1 为反应体系中酶液体积, mL; C_p 为酶蛋白质量浓度, (mg/mL)。

1.10 壳聚糖酶 BUT 的最适反应温度和温度稳定性

选择 30~80 $^{\circ}\text{C}$ (每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 设置一个梯度) 作为反应的温度范围, 并在标准条件下取等量的酶液, 测定其在 30~80 $^{\circ}\text{C}$ 相应温度下的酶活力。逐一比较各结果, 根据确定最大酶活性所对应的温度即可确定壳聚糖酶的最佳反应温度。分别在上述温度下将等量酶溶液孵育 3 h, 然后加入底物和缓冲液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应, 以探究壳聚糖酶的温度稳定性。以上每个处理做 3 个平行。

1.11 壳聚糖酶 BUT 的最适反应 pH 和 pH 稳定性

选取 pH 3~10 为本反应的 pH 范围, 其中包括柠檬酸缓冲液 pH 3~6, 磷酸缓冲液 pH 6~8, Tris-HCl 缓冲液 pH 8~9, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 pH 9~10。等量酶液内添加上述缓冲液作为反应的 pH 值进行反应, 绘制 pH 曲线。测定酶的 pH 稳定性, 需取等量酶液分别置于上述不同 pH 值的缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h。处理后的酶液再加入底物反应, 绘制酶的 pH 稳定性曲线。以上每个处理做 3 个平行。

1.12 金属离子及化学试剂对壳聚糖酶 BUT 酶活的影响

将金属离子溶液和化学试剂溶液加入到酶液中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 3 h, 加入底物和缓冲液, 并保证最终反应体系离子浓度均为 10 mmol/L。分别测定酶活。空白对照为不加任何离子溶液及化学试剂的酶液, 相同条件 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h 后加入到底物和缓冲液中反应, 测定酶活。以上每个处理做 3 个平行。

1.13 TLC 薄层层析水解产物分析

选用 TLC 法分析壳聚糖酶水解壳聚糖的产物。使用壳寡糖混合物 (1~6 糖, 相对分子质量 $\leq 1\ 000$) 作为标准品, 相同的壳聚糖酶反应体系置于相同温度下反应 (45 $^{\circ}\text{C}$), 依次选取反应时间为 15、

30 min, 1、6、12、24 h 的反应液进行实验。毛细管点样于硅胶板, 并重复 4 次。于体积比为 2:1 的异丙醇和氨水中进行展开, 展开结束后吹风机吹干, 置于显色剂为 1 g/L 的茚三酮乙醇溶液中进行染色, 110 °C 下显色 5 min, 观察壳寡糖条带。

2 结果与分析

2.1 *Butyrivibrio* sp. 中壳聚糖酶重组质粒 pET-21a-BUT 的构建及分析

从 NCBI 数据库中检索到 *Butyrivibrio* sp. MC2013 菌种中编码壳聚糖酶的基因序列, 对该基因进行大肠杆菌的密码子优化后全基因序列合成。PCR 扩增后, 使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切处理, T4 DNA 快速连接酶连接过夜, 后续转化以 *E. coli* DH5 α 作为表达载体构建重组质粒 pET-21a-BUT。图 1 为 pET-21a-BUT 的重组质粒图谱, 重组质粒大小为 6 327 bp, 存在 C 末端的 His-tag 标签。阳性克隆验证电泳检测结果如图 2, 挑取的 4 个克隆子均呈现相同相对分子质量的单一条带, 且条带大小与预期吻合, 经测序证实转化成功, 重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 表达宿主内进行表达。

重组壳聚糖酶 BUT, Genbank 序列号为: WP_026508362。经过 NCBI 数据库比对, BUT 属于 GH-46。通过进化树序列分析发现, BUT 与其他 GH-46 家族的壳聚糖酶相似性最高为 59% 且从图 3 进化树分析可知, BUT 没有相同分支, 说明 BUT 是一种新型的壳聚糖酶。

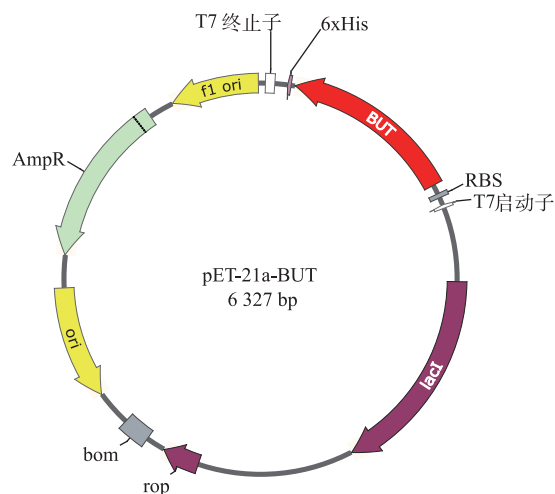


图 1 pET-21a-BUT 重组质粒图谱

Fig. 1 pET-21a-BUT recombinant plasmid map

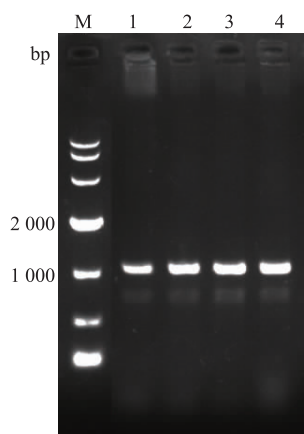


图 2 阳性克隆验证电泳图

Fig. 2 Positive clone verification electropherogram

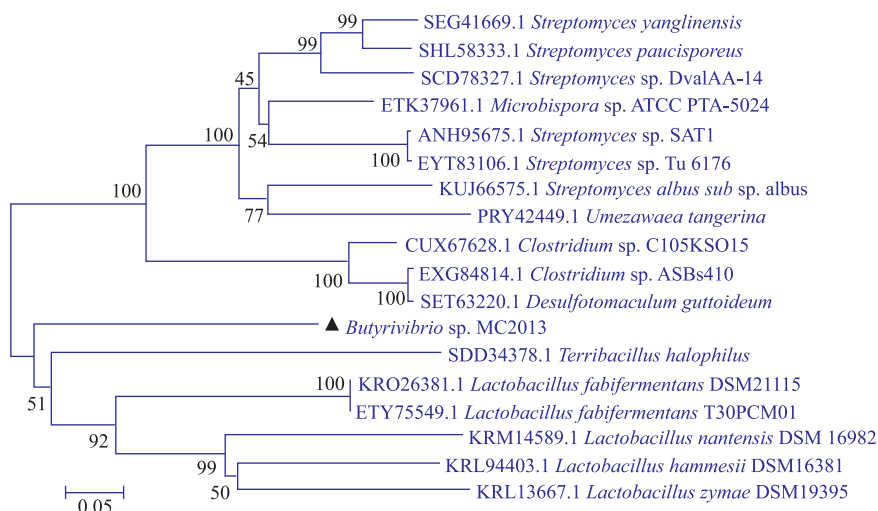
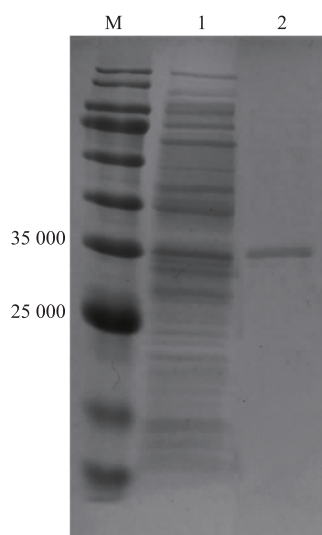


图 3 BUT 进化树分析

Fig. 3 BUT evolution tree analysis

2.2 壳聚糖酶 BUT 蛋白纯化

构建的表达菌株在自诱导培养基 ZYP-5052 诱导发酵 48 h 后,收集发酵液进行破碎离心,得到重组酶的粗酶液。经过纯化后获得单一目的蛋白, SDS-PAGE 电泳结果如图 4 所示。150 mmol/L 咪唑溶液洗脱出纯 BUT 酶蛋白,并呈现单一条带,经比对重组酶蛋白相对分子质量大小大约为 3.5×10^4 ,与预期理论值相符。



M:标准蛋白 Marker;1:粗酶蛋白;2:纯化的 BUT 蛋白

图 4 BUT 蛋白纯化 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 BUT protein purification SDS-PAGE results

2.3 壳聚糖酶 BUT 酶活测定

葡萄糖标准曲线:以 0.1~1 g/L 的不同浓度葡萄糖溶液代替 200 μ L 反应上清液,制作标准曲线。如图 5 所示,标准曲线方程: $Y=0.949x-0.013$, $R^2=0.99773$ 。

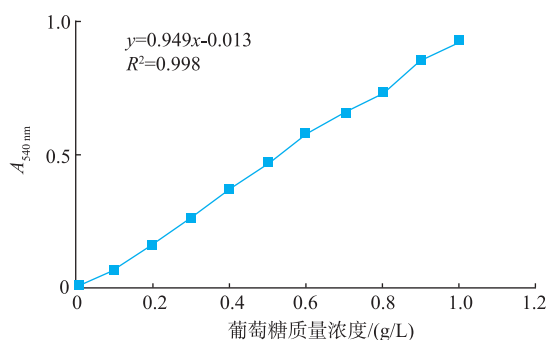


图 5 葡萄糖标准曲线

Fig. 5 Glucose standard curve

酶活测定结果如表 1 所示,粗酶的比酶活为

63.6 U/mg,纯酶为 146.0 U/mg,纯化倍数为 2.3 倍。

表 1 BUT 蛋白纯化分析

Table 1 BUT protein purification analysis

样品	蛋白质质量浓度/ (mg/mL)	比酶活/ (U/mg)	纯化倍数
粗酶	0.3	63.6	1
纯酶	0.1	146.0	2.3

2.4 壳聚糖酶 BUT 的最适反应温度和温度稳定性

在 30~80 $^{\circ}$ C 范围内测定纯化后的重组壳聚糖酶相对酶活的温度梯度变化和温度稳定性。相对酶活以最高酶活为基准(100%),将其他梯度酶活进行换算,绘制温度曲线如图 6(a),温度稳定性曲线如图 6(b)。从图 6(a)的结果可以看出,壳聚糖酶最适反应温度为 45 $^{\circ}$ C,在 30 $^{\circ}$ C 时相对酶活为 45.7%。在 30~45 $^{\circ}$ C 范围内,酶活逐渐增强至最大值。随后,随着温度升高,曲线持续下降,在 80 $^{\circ}$ C 时相对酶活呈现极低状态,仅有 10.8%。在 40~50 $^{\circ}$ C 范围内,相对酶活力均在 80%以上,在 30~60 $^{\circ}$ C 范围内,相对酶活力保持在 45%以上。酶的温度稳定性由图 6(b)所示,30 $^{\circ}$ C 条件处理的酶活性最高,30~45 $^{\circ}$ C 范围内随温度升高,酶活呈下降趋势,但相对酶活都在 88%以上,当温度达到 50 $^{\circ}$ C 酶活急剧下降,随后 50~80 $^{\circ}$ C 范围内,酶活持续下降,并维持在 10%以下。说明此酶不宜在高于 50 $^{\circ}$ C 条件下过久存放,在 30~45 $^{\circ}$ C 范围内可稳定存在。

2.5 壳聚糖酶 BUT 的最适反应 pH 和 pH 稳定性

在 pH 3.0~10.0 范围下测定了重组壳聚糖酶的相对酶活的 pH 梯度变化和稳定性。从图 7(a)可看出,壳聚糖酶的最适反应 pH 为 8 (Tris-HCl 缓冲液)。在 pH 3~6(柠檬酸盐缓冲液)范围内,相对酶活性较低,均低于 40%。pH 6~9 范围内,酶活都维持在 77%以上。然而,具有相同 pH 值的不同类型的缓冲液对酶活会起到不同的影响。当 pH 为 6 时,柠檬酸缓冲液会明显抑制酶活,相对酶活为 30%,而 pH 6 的磷酸缓冲液作用下相对酶活为 88%。类似地,在 pH 9 的 Tris-HCl 缓冲液中相对酶活很低,仅为 27%,而在同 pH 值的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中,酶活则高达 80%。总体而言,重组酶的酶活性在酸性条件下较差,中性偏碱性条件下酶活较高。由图 7(b)可看出,在 pH 为 8(Tris-HCl 缓冲液)的条件下,重组酶不但酶活最高同时也最为稳定,说明此酶属于碱性壳聚糖酶,生产利用环节将环境 pH 控

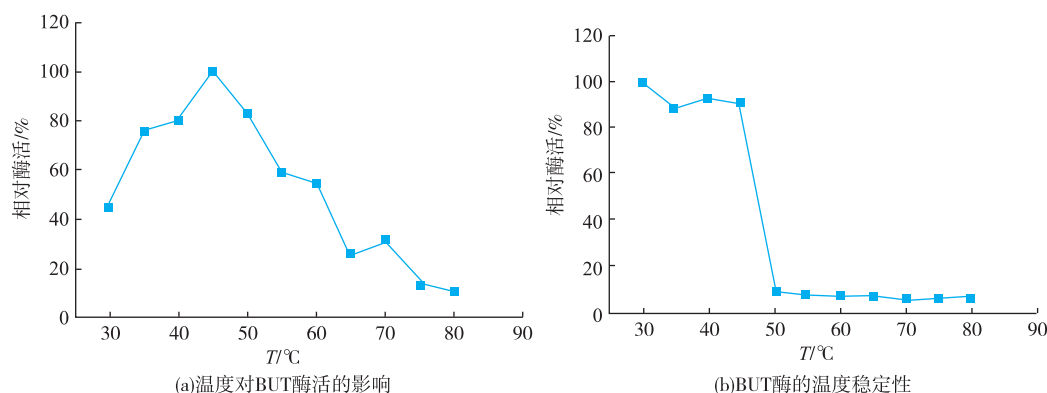


图6 温度对 BUT 酶活的影响及 BUT 酶的温度稳定性

Fig. 6 Effect of temperature on BUT enzyme activity and temperature stability of BUT enzyme

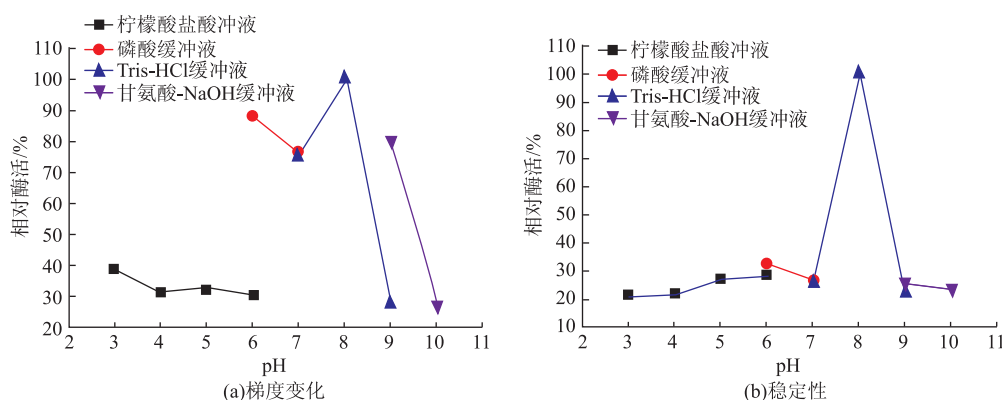


图7 pH 对 BUT 酶活的影响及 BUT 酶的 pH 稳定性

Fig. 7 Effect of pH on BUT activity and PH stability of BUT enzyme

制在 8 时酶活最高最稳定。

2.6 金属离子以及化学试剂对壳聚糖酶 BUT 酶活的影响

从图 8 可以看出, Mn^{2+} 增强了重组酶的酶活性, 使其增加约 6.7%。 Ni^{2+} 处理后酶活仅有轻微抑制, 变化不大。其他离子: Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、以及化学试剂 SDS 和 EDTA, 抑制酶活性。其中 SDS、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活抑制作用显著, 可使相对酶活抑制在 10% 以下。与 *Pseudomonas* sp. OUC1 克隆表达的重组酶性质相似, Mn^{2+} 可促进酶活增强, Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 以及 SDS 和 EDTA 显著抑制酶的活性^[19]。一般来说, 金属离子不直接参与壳聚糖酶的催化过程, 但会促进或抑制酶的活性, 如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子通过共价配未键与酶的侧链基团连接, 这种效应改变了蛋白质的构像并使酶失活。 Mn^{2+} 可能在构建酶的活性中心方面有参与作用, 进而影响酶解反应^[20]。EDTA 对重组酶有一定抑制作用表明, 该重组酶属于金属酶, 发挥作用时需

要金属离子参与。在工业生产应用时应注意避免抑制性离子与酶接触, 必要时可添加 Mn^{2+} 提高酶活, 弥补生产利用过程中出现的酶活损失。

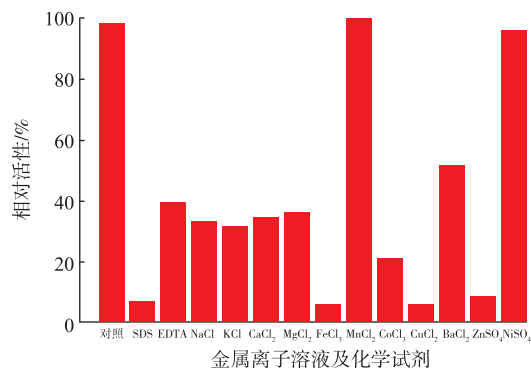


图8 金属离子溶液及化学试剂对 BUT 酶活的影响

Fig. 8 Effect of metal ion solution and chemical reagent on BUT activity

2.7 壳聚糖酶 BUT 水解壳聚糖产物分析

作者使用壳聚糖(脱乙酰度>90%)为底物, 壳寡糖混合物(1-6 糖, 相对分子质量 $\leq 1\ 000$)作为标准

品参照。相同的壳聚糖酶反应体系置于 45 °C 条件下反应, 图 9 反映了不同反应时间下的产物。由 BUT 壳聚糖酶水解底物壳聚糖后的产物主要是壳二糖、壳三糖和壳四糖^[21]。到 15 min 时, 产物以壳三糖和壳四糖为主, 基本未产生壳二糖, 反应 6 h 后壳二糖与壳三糖明显增多, 且壳三糖占总水解产物的大部分。这与 *Streptomyces roseolus* DH 菌所产生壳聚糖酶水解产物相似, 薄层层析结果显示产物同为壳二糖、壳三糖、壳四糖, 且随时间延长三种产物变化趋势相同, 都呈上升趋势^[21]。观察到 6、12、24 h 的水解产物相似, 表明壳聚糖已在 6 h 时水解彻底, 最终水解产物为聚合度 2~4 的壳寡糖。

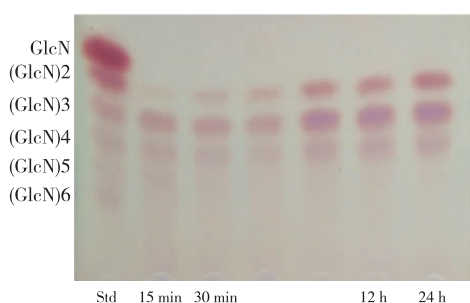


图 9 BUT 酶水解壳聚糖产物薄层层析分析

Fig. 9 Thin layer chromatography analysis of chitosan product hydrolyzed by BUT

3 结 语

壳寡糖由于相对分子质量小、溶解性强、以及

多种药理功能, 使其在保健品、食品、医药制品中有了更大的应用价值, 因此, 壳聚糖酶在壳寡糖生产及产业化利用中起到了重要作用。许多研究已将壳聚糖酶成功克隆表达, 无论是产量还是生产速率上都有了明显提高。作者通过基因挖掘由 NCBI 数据库检索到来源于 *Butyrivibrio* sp. MC2013 的壳聚糖酶基因, 并尝试对基因进行克隆, 与表达载体连接构建重组质粒, 转入 *E. coli* BL21(DE3) 表达宿主进行表达, 成功克隆表达了一个新型壳聚糖酶, 经序列比对和进化树分析, 此壳聚糖酶属于 GH46。通过镍离子金属螯合亲和层析, 获得蛋白质相对分子质量大小约为 3.5×10^4 的纯酶。测定了壳聚糖酶纯酶酶活为 146.0 U/mg, 纯化倍数为 2.3。壳聚糖酶最适反应温度和 pH 分别为 45 °C、8.0 (Tris-HCl 缓冲液)。且在 40~50 °C 温度范围下最稳定, 保温 3 h 后相对酶活仍在 80% 以上, 具有较好的热稳定性。 Mn^{2+} 可促进酶活, SDS、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活显著抑制, 可使相对酶活抑制在 10% 以下。借助 TLC 进行分析酶解产物, 结果显示壳聚糖酶 6 h 已完全水解, 产物是聚合度为 2~4 的壳寡糖。壳聚糖酶酶学性质及水解机制对指导酶在生产应用有着重大的意义, 研究酶的最适温度和 pH 有助于发挥酶的最大酶活, 提高反应速率和降解产物产量, 分析酶解产物有助于对重组酶性质的充分了解, 因而为其在壳寡糖制备的工业化生产制备提供理论依据。

参考文献:

- [1] YANG Jiulin, XIE Hongguo, YU Weiting, et al. Research progress in chitosan for tissue engineering [J]. **Functional Materials**, 2013, 44(11): 1521-1525. (in Chinese)
- [2] THADATHIL N, VELAPPAN S P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review [J]. **Food Chemistry**, 2014, 150(1): 392-399.
- [3] KIM S K, RAJAPAKSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2005, 62(4): 357-368.
- [4] BALAN V, VERESTIUC L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review [J]. **European Polymer Journal**, 2014, 53(1): 171-188.
- [5] CHEN X, XIA W, YU X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus*, sp. CJ22-326 [J]. **Food Research International**, 2005, 38(3): 315-322.
- [6] LI Songlin. Cloning, expression and site-directed mutagenesis of chitosanase gene produced by *Aspergillus* CJ22-326 [D]. **Jiangnan University**, 2009.
- [7] LU Huading, LIAN Liyi, CHEN Mingwei, et al. Cloning of *Aspergillus* gene and its expression in *Escherichia Coli* [J]. **Chinese Journal of Tissue Engineering Research**, 2014, 18(34): 5490-5496. (in Chinese)
- [8] ZHENG Fuchun. Cloning, expression and enzymatic analysis of chitosanase gene from *Bacillus subtilis* [D]. **East China University of Technology**, 2017. (in Chinese)

- [9] ZHANG J, CAO H, LI S, et al. Characterization of a new family 75 chitosanase from *Aspergillus* sp. W-2 [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015, 81 (NOV): 362-369.
- [10] NIDHEESH T, PAL G K, SURESH P V. Chito-oligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2015, 121: 1-9.
- [11] PECHSRICHUANG P, YOOHAT K, YAMABHAI M. Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides[J]. **Bioresource Technology**, 2013, 127 (127C): 407-414.
- [12] LIU Wanshun, WANG Jiao, YANG Yan, et al. Expression of chitosanase gene in *Yarrowia lipolytica* and recombinase properties [J]. **Journal of Ocean University of China**, 2011, 41 (12): 58-62. (in Chinese)
- [13] KURITA K. Chemistry and application of chitin and chitosan[J]. **Polymer Degradation & Stability**, 1998, 59 (1-3): 117-120.
- [14] PECHSRICHUANG P, LORENTZEN S B, AAM B B, et al. Bioconversion of chitosan into chito-oligosaccharides (CHOS) using family 46 chitosanase from *Bacillus subtilis* (BsCsn46A)[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 186: 420-428.
- [15] PASCAL V, MARIE-EVE L H, RYSZARD B. Chitosanases from family 46 of glycoside hydrolases: From proteins to phenotypes [J]. **Marine Drugs**, 2015, 13 (11): 6566-6587.
- [16] YANG Jilin. Preparation and analysis of chitosanase separation, purification, properties and degradation products chito-oligosaccharides[D]. **Ocean University of China**, 2005. (in Chinese)
- [17] KIM P I, KANG T H, CHUNG K J, et al. Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene[J]. **Fems Microbiology Letters**, 2010, 240 (1): 31-39.
- [18] ZOU P, YANG X, WANG J, et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides [J]. **Food Chemistry**, 2016, 190: 1174-1181.
- [19] SUN Beibei. Development and application of key enzymes for the recycling of crustacean waste [D]. **Harbin Institute of Technology**, 2016. (in Chinese)
- [20] XIA W, LIU P, LIU J. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases [J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99 (15): 6751-6762.
- [21] LÜ Qianqian. Study on substrate binding and catalytic mechanism of chitosanase OU01 [D]. **Ocean University of China**, 2015. (in Chinese)

科技信息

澳新批准聚山梨醇酯 20 作为食品添加剂

2018 年 11 月 29 日, 澳新食品标准局 (FSANZ) 发布食品标准法典第 182 号修正案, 批准将聚山梨醇酯 20 作为新型乳化剂食品添加剂, 用于的食品包括生的整块肉或碎肉, 家禽或野生动物产品 (包括但不限于山羊、袋鼠、水牛、鹌鹑、鳄鱼、野猪和雉) 以及加工鱼和鱼产品, 最大使用限量为 500 mg/kg。

[信息来源] 中华人民共和国海关总署. 澳新批准聚山梨醇酯 20 作为食品添加剂 [EB/OL]. (2018-12-6). <http://www.customs.gov.cn/customs/jyjj>

欧盟将胡椒烯酮等 3 种物质从调味物质清单中删除

欧盟官方公报消息, 2018 年 11 月 5 日, 欧盟委员会发布法规 (EU) 2018/1649, 根据欧洲议会和理事会条例 (EC) 1334/2008 及评估结果, 将胡椒烯酮 (p-Mentha-1,4(8)-dien-3-one)、邻氨基苯乙酮 (2-Aminoacetophenone) 和 4-(乙酰氧基)-2,5-二甲-3(2H)-呋喃酮 (4-Acetyl-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one) 3 种物质从调味物质清单附件 I 的 A 部分中删除。

[信息来源] 中华人民共和国海关总署. 欧盟将胡椒烯酮等 3 种物质从调味物质清单中删除 [EB/OL]. (2018-11-14). <http://www.customs.gov.cn/customs/jyjj>