维氏气单胞菌来源几丁质酶的克隆表达及应用

鲁梦唯[1,2]，陈 晟[1,2]，吴 敬[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：丰年虾是一种小型甲壳类动物，孵化后的幼虫是水产动物的优质饵料，残留的卵壳则作为废弃物处理。然而丰年虾卵壳含有丰富的蛋白质和几丁质，具有极大的应用潜力。为了从丰年虾卵壳中制备几丁寡糖，选择了水解产物分布宽泛和含有几丁质结合域的维氏气单胞菌来源的几丁质酶 ChiB565，将其在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中进行重组表达，对其酶学性质和高密度发酵条件进行研究后，建立了以中性蛋白酶和重组几丁质酶 ChiB565 为主协同处理丰年虾卵壳以制备几丁寡糖的绿色工艺。结果显示，重组菌发酵的最高酶活为 13.2 U/mL，是摇瓶发酵酶活的 3.88 倍；当先以中性蛋白酶（30 mg/g（以底物质量计），4 h）处理丰年虾卵壳以脱除蛋白质，再用重组几丁质酶 ChiB565（40 U/g（以底物质量计），5 h）来水解几丁质时，水解产物主要为几丁二糖到几丁四糖，伴随少量几丁五糖和几丁六糖，且水解产物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率分别为 59.94%和 53.15%。上述研究表明以丰年虾卵壳为底物采用生物酶法制备几丁寡糖相较于传统化学法回收率更高，时间更短。该研究为几丁寡糖的工业化制备奠定了重要基础。

关键词：几丁质酶；克隆表达；丰年虾卵壳；几丁寡糖

中图分类号：Q556+.2　**文章编号：**1673-1689（2022）04-0055-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.04.008

Cloning, Expression and Application of Chitinase from *Aeromonas veronii*

LU Mengwei[1,2]，*CHEN Sheng*[1,2]，*WU Jing*[*1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；2. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract：*Artemia salina* is a small crustacean. The hatched larvae are high-quality bait for aquatic animals, and the remaining eggshells are treated as waste. However, *Artemia salina* eggshells are rich in protein and chitin, which have great potential for application. To prepare chitin oligosaccharides from *Artemia salina* eggshells, chitinase ChiB565, which is derived from *Aeromonas veronii*, and has a wide distribution of hydrolysates and contains chitin binding domain, is selected and recombinantly expressed in *Pichia pastoris*. The enzymatic properties are studied and high-density fermentation is carried out. A green process for preparation of chitin oligosaccharides by synergistic treatment of *Artemia salina* eggshells with neutral protease and recombinant chitinase ChiB565 is established. The results show that the highest enzyme activity of recombinant bacteria fermentation is 13.2 U/mL, which is 3.88 times that of shake flask fermentation. When *Artemia salina* eggshells are treated with neutral protease (30 mg/g substrate and 4 h) first to remove protein, and then treatd with recombinant

收稿日期：2021-05-14

基金项目：高等学校学科创新引智计划项目（111-2-06）。

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

ChiB565 (40 U/g substrate and 5 h) to hydrolyze chitin, products are mainly chitobiose to chitotetraose, with a small amount of chitopentaose and chitohexaose. And the scavenging ability of the hydrolysate to DPPH and ABTS are 59.94% and 53.15%, respectively. The studies above illustrat that the preparation of chitin oligosaccharides by biological enzymatic method using *Artemia salina* eggshells as substrate has a higher recovery rate and a shorter time than traditional chemical methods. This research has laid an important foundation for the industrial preparation of chitin oligosaccharides.

Keywords: chitinase, fermentation expression, *Artemia salina* eggshells, chitin oligosaccharides

丰年虾(*Artemia salina* L.),俗称卤虫,是一种小型甲壳类动物,常见于高盐度水域,物种多样性低且结构较为简单[1]。其繁殖能力和休眠卵抗逆性强[2],孵化时间短,18~30 h 即可孵化成无节幼虫[3]。孵化后的幼虫含有丰富的蛋白质,常用作水产动物的饵料[4],而孵化残留的卵壳属于废弃物。研究表明,丰年虾卵壳含有丰富的蛋白质和几丁质[5-6],以丰年虾卵壳为原料制备几丁寡糖,不仅成本低廉,还能废物利用,具有极大的应用价值。

几丁寡糖是几丁质酶(EC 3.2.1.14)通过断裂几丁质链中的 α-1,4-糖苷键生成的产物,不仅能作为一种天然食品防腐剂来抑制腐败菌滋生,还具有较好的抗氧化性和保湿性,能有效延缓衰老,在功能性食品领域具有极大的应用潜力[7-9]。孙文敏等利用化学法以丰年虾卵壳为原料制备几丁寡糖[1];黄晓燕采用酸碱法,以丰年虾卵壳为原料制得了食品级几丁质[10]。Yosefali 等采用将丰年虾卵壳和多种细菌共培养的方法提取几丁寡糖,能获得较高的产率和纯度[11]。

鉴于传统化学法存在环境污染严重且成本较高等缺点[12-13],以丰年虾卵壳为原料,采用生物酶法制备几丁寡糖具有极大的应用潜力。丰年虾卵壳的主要成分为蛋白质和几丁质,其中卵壳几丁质因受到蛋白质包裹导致其暴露在外的结合位点较少,因此添加中性蛋白酶对丰年虾卵壳进行蛋白质脱除处理后再使用几丁质酶水解,理论上能获得较高的几丁寡糖的回收率[14]。作者采用高效且环境友好的生物酶法,以丰年虾卵壳为原料有效制备出具有抗氧化性能的几丁寡糖。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

携带几丁质酶 ChiB565 基因的质粒 pPIC9K-*ChiB565*:苏州金唯智生物科技有限公司合成;菌株 *Pichia pastoris* GS115:作者所在实验室前期保藏;丰年虾卵壳:山东省潍坊市浩海水产饲料有限公司产品;酵母粉、蛋白胨:英国 Oxoid 公司产品;中性蛋白酶:北京夏盛生物技术有限公司产品;DPPH、ABTS:上海阿拉丁试剂有限公司产品;其他国产分析纯试剂均购于国药集团。

YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母提取物 10,胰蛋白胨 20。

MD 培养基(g/L):葡萄糖 20,YNB 13.4,生物素 4×10^{-4},琼脂粉 15。

BMMY 培养基(g/L):酵母提取物 10,YNB 13.4,胰蛋白胨 20,生物素 4×10^{-4}。

BMGY 培养基(g/L):酵母提取物 10,YNB 13.4,胰蛋白胨 20,甘油 10,生物素 4×10^{-4}。

种子培养基(g/L):甘油 30,酵母提取物 10,胰蛋白胨 20,YNB 13.4。

BSM 培养基:甘油 40 g/L,$MgSO_4\cdot7H_2O$ 14.9 g/L,$CaSO_4\cdot2H_2O$ 0.94 g/L,KOH 0.83 g/L,K_2SO_4 18.2 g/L,KH_2PO_4 6 g/L,PTM 4.32 mL/L。

补料培养基:甘油 500 g/L,PTM 5 mL/L。

诱导培养基:甲醇,PTM 12 mL/L。

PTM 培养基(g/L):生物素 0.2,$ZnCl_2$ 20,$FeSO_4\cdot7H_2O$ 65,$CuSO_4\cdot5H_2O$ 6,$MnSO_4\cdot H_2O$ 3,$CoCl_2$ 0.5,KI 0.08,$Na_2MoO_3\cdot2H_2O$ 0.2,H_3BO_3 0.02,H_2SO_4 5。

1.2 仪器与设备

小型高速离心机:德国 Eppendorf 公司产品;分析电子天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司产品;烘箱和恒温振荡培养箱:上海知楚仪器有限公司产品;凝胶成像系统、Mini Protein 3 蛋白电泳系统:美国 Bio-Rad 公司产品;3 L 全自动发酵罐:荷兰 Applicon 公司产品;紫外可见分光光度计:日本 Shimadzu 公司产品;色谱柱:安捷伦科技有限公司

产品;Waters e2695 系统:Waters 科技(上海)有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-*ChiB565* 的构建及高拷贝转化子筛选 将合成得到的质粒 pPIC9K-*ChiB565* 经 *Sac* I 线性化后,在 1 500 V 条件下电击转化进入已制备好的 *P. pastoris* GS115 感受态细胞,迅速加入 1 mL 1 mol/L 的山梨醇,吹吸混匀后于 30 ℃复苏 2 h。随后取 200 μL 菌液均匀涂布到 MD 培养基,30 ℃培养至长出可见的单菌落。挑取单菌落经抗性平板筛选、摇瓶筛选后测定菌液的 OD_{600} 和上清液的几丁质酶活性,OD_{600} 和几丁质酶活性较高的即为毕赤酵母的高拷贝转化子。

1.3.2 重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-*ChiB565* 的培养方法

1)摇瓶发酵 将重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-*ChiB565* 的高拷贝转化子菌液以体积分数 0.2%的接种率接入 10 mL YPD 培养基中,30 ℃、200 r/min 培养 24 h。再以体积分数 0.2%的接种率接入 100 mL BMGY 培养基中,30 ℃、200 r/min 培养 24 h。随后将菌液在 4 ℃、5 000 *g* 离心 10 min 后,弃去上清液,用 50 mL BMMY 培养基复溶,同时添加 375 μL 纯甲醇诱导。菌液于 30 ℃继续培养,且每 24 h 补加 250 μL 的纯甲醇诱导,共培养 4~6 d。

2)种子培养 取保藏于-80 ℃的甘油管在 YPD 培养基上划线活化,挑取生长良好的单菌落接种于 100 mL 的种子培养基中,在 30 ℃、200 r/min 的条件下培养 24 h 获得种子液。

3)3 L 罐发酵 将培养 24 h 的种子液全部接入已灭菌的 0.9 L 发酵培养基中,通过流加体积分数为 30%氨水调节发酵罐内的 pH,使发酵过程 pH 稳定在 5.0 左右;同时设置搅拌转速与通气进行结合,使发酵过程的溶氧维持在不超过 30%;待第 1 次溶氧反弹后,开始流加补料培养基。继续补料培养 12~14 h 后,停止补料,饥饿处理 1 h,此时取样测量,控制 OD_{600} 在 130 左右或湿菌质量分数达到 30%,并调节发酵罐温度至 28 ℃;待溶氧明显回升且温度稳定后,开始甲醇诱导,按菌体实际生长状况逐渐提高甲醇流量;甲醇诱导阶段可每 12 h 间歇停止补加甲醇,观察溶氧反弹情况以确保甲醇并未过量,待发酵酶活不再上升时终止发酵。其中甲醇诱导速度采用分阶段恒流补加甲醇的方法。

1.3.3 重组几丁质酶 ChiB565 的酶学性质研究

1)最适温度 在 pH 5.0 下,分别测定等量重组酶液在不同温度(20~70 ℃)条件下的酶活,定义最高酶活为 100%,计算不同温度条件下的相对酶活(残留酶活)。

2)温度稳定性 将重组酶液放置于 37、50、60 ℃中,定时取样测其酶活。定义 0 h 的酶活为 100%,计算相对酶活(残留酶活)。

3)最适 pH 分别在不同 pH 条件下(pH 3.0~9.0)测定酶活,定义最高点酶活为 100%,计算相对酶活(残留酶活)。

4)pH 稳定性 在 50 ℃条件下,将一定量的重组酶液分别于 pH 3.0~9.0 的缓冲液中孵育 2 h 后测定酶活(残留酶活)。

1.3.4 重组几丁质酶 ChiB565 的活性检测 几丁质酶活性采用 DNS 法[15]进行测定。在 50 ℃、pH 5.0 条件下,以 250 μL 的 10 g/L 胶体几丁质为底物,添加 100 μL 的重组几丁质酶粗酶液和 150 μL 的 20 mmol/L 磷酸柠檬酸盐缓冲液,精准反应 1 h,再添加 2 mL 的 DNS 终止反应,随后立即煮沸 5 min 再冷却至室温,在 12 000 *g* 下离心 5 min,测量上清液于 540 nm 的吸光度。根据乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)的 DNS 显色标准曲线计算酶活。几丁质酶活性的定义为在 50 ℃条件下,每小时释放出 1 μmol 的 GlcNAc 所需的酶量,即为一个单位酶活。

1.3.5 丰年虾卵壳成分分析 取足量丰年虾卵壳充分研磨压碎并过 50 目筛得到卵壳粉末。卵壳水分质量分数测定参照《饲料水分的测定方法》(GB 6435—86)中方法,在 90 ℃下卵壳粉末干燥 2 h 后准确称质量进行测定;卵壳灰分按照《饲料中粗灰分的测定》(GB 6438—2007)中燃烧法测定;准确称量 1.00 g 卵壳粉末在 20 mL 1 mol/L 的 NaOH 中于 40 ℃充分搅拌 3 h,运用《油料粗蛋白质的测定法》(GB/T 14489.2—1993)中凯氏定氮法测量上清液中蛋白质质量分数来确定卵壳蛋白质质量分数;将上一步残留的沉淀置于 20 mL 1 mol/L 的 HCl 在25 ℃下充分搅拌 3 h,去除上清液并充分洗涤干燥残余沉淀并称质量,记录为卵壳几丁质质量。

1.3.6 丰年虾卵壳蛋白质的脱除

1)中性蛋白酶加酶量优化 在 1.3.5 研磨得到的卵壳粉末中加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液配置成 10 g/dL 的反应底物,设置中性蛋白酶加酶量为 10、

20、30、40、50、60 mg/g(以底物质量计),在 50 ℃、pH 5.0 条件下振荡培养 3 h,反应结束后在 12 000 *g* 下离心 5 min,保留沉淀并称质量。

2)水解时间优化 将反应底物置于最适中性蛋白酶加酶量下相同条件反应 1、2、3、4、5、6 h 后与上一步相同条件离心,保留沉淀并称质量。

$$I=\frac{A_1-A_2}{A_0}\times 100 \quad (1)$$

式中:I 为蛋白质脱除率,%,A_1 为卵壳粉底物质量,g;A_2 为残留沉淀质量,g;A_0 为底物卵壳粉中蛋白质质量,g。

1.3.7 丰年虾卵壳几丁质的水解

1)重组几丁质酶 ChiB565 加酶量优化 将 1.3.6 得到的沉淀加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液配置成 10 g/dL 的反应底物,设置重组几丁质酶 ChiB565 加酶量为 10、20、30、40、50、60 U/g (以底物质量计),在 50 ℃、pH 5.0 条件下振荡培养 3 h,反应结束后在 12 000 *g* 离心 5 min,保留沉淀并称质量。

2)水解时间优化 将反应底物置于最适重组几丁质酶 ChiB565 加酶量下相同条件反应 1、2、3、4、5、6 h 后离心对沉淀称质量,同时保留上清液以备后续检测。

$$W=\frac{B_1-B_2}{B_0}\times 100 \quad (2)$$

式中:W 为几丁质回收率,%;B_1 为沉淀底物质量,g;B_2 为残留沉淀质量,g;B_0 为沉淀底物中几丁质质量,g。

1.3.8 丰年虾卵壳水解产物成分测定 1.3.7 所得上清液即为丰年虾卵壳几丁质水解产物,通过 DNS 法测定水解产物的总还原糖。水解产物中组成成分通过 HPLC 测定。将水解产物用乙腈稀释并过滤膜(0.22 μm)得到样品,以体积分数为 75%乙腈为流动相,在 30 ℃和 0.8 mL/min 流量下,将样品进样于 HPLC 系统(Separations module),采用 Hypersil APS 色谱柱(250 mm×4.6 mm)进行产物分析。

1.3.9 丰年虾卵壳水解产物抗氧化性测定 DPPH 自由基清除能力的测定参照文献[16],ABTS 自由基清除能力的测定参照文献[17]。

2 结果与分析

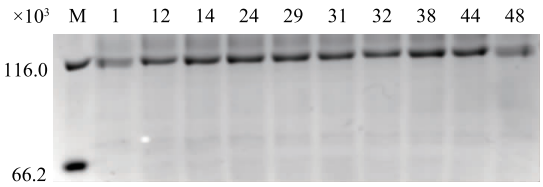
2.1 丰年虾卵壳水解酶的选择

对丰年虾卵壳的成分进行分析,经检测丰年虾卵壳中蛋白质质量分数为 58.92%,几丁质质量分数为 24.18%,灰分质量分数为 2.44%,水分质量分数为 2.51%。鉴于丰年虾卵壳中蛋白质和几丁质质量分数较高,因此选择以中性蛋白酶和几丁质酶协同处理对丰年虾卵壳进行水解以获得几丁寡糖。由于中性蛋白酶商品化程度较高,且具有较为广泛的底物亲和性和较高的比酶活,因此选用商品中性蛋白酶进行处理。

丰年虾卵壳中存在的天然几丁质一般以结晶形式存在。研究表明,几丁质结合域 CBD(Chitin binding domain)的存在能高效促进几丁质酶对晶体几丁质的水解[18]。相关研究表明,几丁质酶水解几丁质生成产物大多为几丁四糖以下的寡糖[19-20],而聚合度较高的几丁寡糖具有更好的生物活性。因此,选择维氏气单胞菌来源的几丁质酶 ChiB565,其具备 GH18 家族典型的催化结构域和 CBD 结构域[21],对晶体几丁质催化效率高,且同时具有内切和外切活性,水解速度快;其水解虾壳几丁质产物为几丁二糖到几丁六糖,无论是从水解效率还是水解产物分布角度,理论上都应对丰年虾卵壳具有较好的水解效果。

2.2 重组几丁质酶 ChiB565 在 *P. pastoris* 中的克隆表达及酶学性质

将合成得到的质粒 pPIC9K-*ChiB565* 电击转化进入 *P. pastoris* GS115 的感受态细胞中,经过抗性平板筛选和摇瓶筛选对重组菌进行高拷贝转化子筛选,结果显示,重组几丁质酶 ChiB565 水解胶体几丁质的酶活为 3.40 U/mL。通过 SDS-PAGE 分析(见图 1),重组几丁质酶 ChiB565 的蛋白质相对分子质量大小约为 114 800。

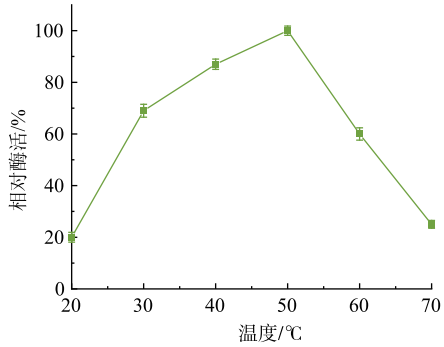


1、12、14、24、29、31、32、38、44、48 为不同转化子的发酵上清液。

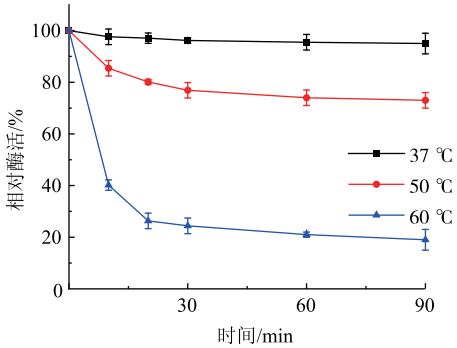
图 1 重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-*ChiB565* 转化子的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant strain *P. pastoris* GS115/pPIC9K-*ChiB565* transformant

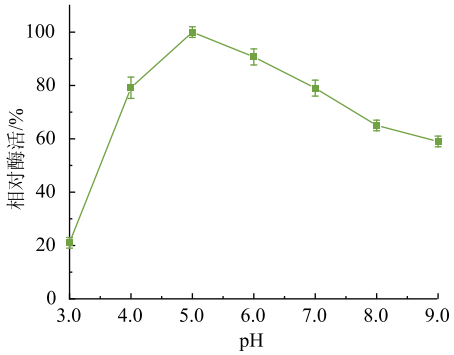
如图 2(a)和(b)所示,在 20~70 ℃条件下,重组几丁质酶 ChiB565 最适温度为 50 ℃。在 37 ℃条件下孵育 90 min,重组几丁质酶 ChiB565 的相对酶活(残留酶活)仍有 90%;在 50 ℃孵育 90 min,重组几丁质酶 ChiB565 的相对酶活为 70%;而当在 60 ℃孵育 10 min 时,重组几丁质酶 ChiB565 相对酶活迅速降低至 40%,孵育 90 min 后相对酶活仅为 20%。如图 2(c)和(d)所示,在 pH 3.0~9.0 条件下,重组几丁质酶 ChiB565 的最适 pH 为 5.0。在 pH 5.0 条件下,孵育 2 h 后相对酶活最高,在 pH 4.0~7.0 孵育2 h 后残留酶活都不低于最高值的 80%,pH 稳定性较好。



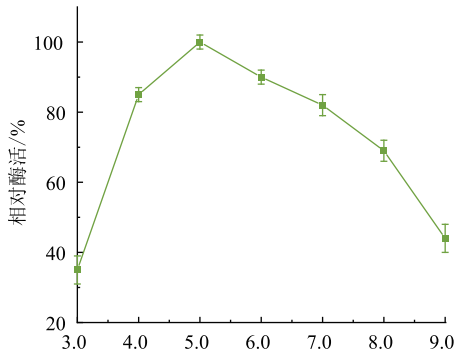
(a) 最适温度



(b) 温度稳定性



(c) 最适pH



(d) pH稳定性

图 2 重组几丁质酶 ChiB565 的酶学性质

Fig. 2 Enzymatic properties of recombinant chitinase ChiB565

2.3 重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K–*ChiB565* 的发酵优化

2.3.1 发酵培养基的氮源优化 在 BSM 培养基中添加 40 g/L 的无机氮源 $(NH_4)_2HPO_4$,进行 3 L 罐发酵,菌体湿菌质量分数和发酵上清液的酶活曲线如图 3 所示。结果显示整个发酵周期内,添加无机氮源组的菌体湿菌质量分数均高于未添加无机氮源组,并且发酵酶活也均高于未添加无机氮源组。其中在诱导 120 h 时,添加无机氮源组的最高酶活为 11.8 U/mL,是未添加无机氮源组最高酶活的 1.37 倍。上述结果表明,添加无机氮源能有效促进菌体生长,提高重组菌的发酵酶活。

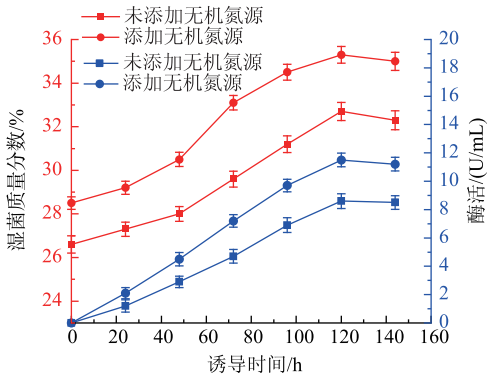


图 3 培养基中氮源对菌体生长及酶活的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen source in medium on *P. pastoris* growth and enzyme activity

2.3.2 诱导温度优化 由于 *P. pastoris* 的最适生长温度在 28~30 ℃,同时低温条件有益于蛋白质折叠,因此设置 20、25、28 ℃温度梯度进行上罐优化。发酵过程菌体生长湿菌质量分数和发酵上清液酶活曲线如图 4 所示。在诱导 0~24 h 阶段,3 个温度

下菌体湿菌质量分数无明显差别；在诱导 24 h 后，菌体进入快速生长阶段，菌体湿菌质量分数随诱导温度的升高而升高。发酵酶活结果显示，随着诱导温度的升高，重组几丁质酶活性也随之升高。当诱导温度为28 ℃时，诱导 120 h 后酶活达到最高，为 11.9 U/mL，是摇瓶酶活的 3.5 倍；当诱导温度为 20 ℃时，同期发酵酶活始终低于28 ℃，且诱导 96 h 酶活开始下降。

由上述结果分析可知，虽然在 20 ℃低温条件下有益于蛋白质折叠，但此时菌体生长速率也较缓，同时重组几丁质酶 ChiB565 的积累会破坏菌体细胞壁，限制菌体生长，进而影响蛋白质的表达，最终导致菌体量较少，酶活较低；而 28 ℃诱导时，菌体生长速率较快，在发酵前、中期受到甲醇细胞毒性的影响较小，菌体得以快速积累，更利于其在发酵后期减小甲醇毒性以及重组几丁质酶 ChiB565 对菌体的降解，从而提高酶活。结果表明，诱导温度设置为 28 ℃将有利于前期菌体的生长和后期蛋白质的表达。

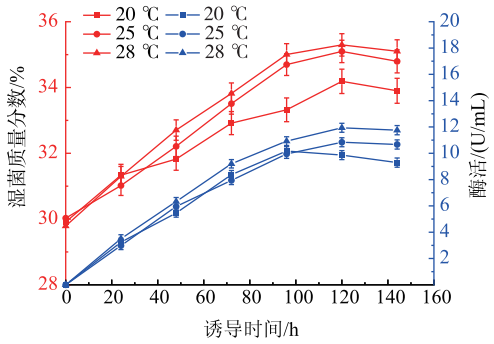


图 4　20、25、28 ℃诱导温度下重组菌生长及重组几丁质酶 ChiB565 表达情况

Fig. 4　Growth of recombinant bacteria and expression of recombinant chitinase ChiB565 at induction temperature of 20, 25, 28 ℃

2.3.3　*诱导补料条件优化*　*P. pastoris* 在诱导阶段以甲醇作为生长碳源，生长速率较低，相关研究表明此阶段使用复合碳源补料可以提高菌体生长速率，并减小甲醇对菌体生长造成的影响。本研究中选择在诱导中期 48 h 开始以甲醇诱导速度的 10% 进行甘油补料，在诱导温度 28 ℃条件下，发酵过程菌体生长及发酵酶活曲线如图 5 所示。湿菌质量分数结果显示，在诱导 48 h 前由于均未添加甘油，湿菌质量分数无较大差异，当 48 h 后添加甘油补料后，菌体湿菌质量分数均高于对照组（不添加甘油补料）。酶活结果显示，当不添加甘油补料时，酶活在诱导 120 h 达到最高，为 11.9 U/mL；添加甘油补料后，酶活在 132 h 达到最高，为 13.2 U/mL，是不添加甘油补料组最高酶活的 1.11 倍，是摇瓶酶活的 3.88 倍。发酵上清液的 SDS-PAGE 如图 6 所示。由上述结果分析可知，发酵中期添加甘油补料可以缓解菌体受细胞毒性的影响，从而促进菌体生长，延长发酵周期，同时还能促进蛋白质的表达，提高发酵液酶活。结果表明，诱导阶段进行甘油补料能有效促进菌体生长和蛋白质表达。

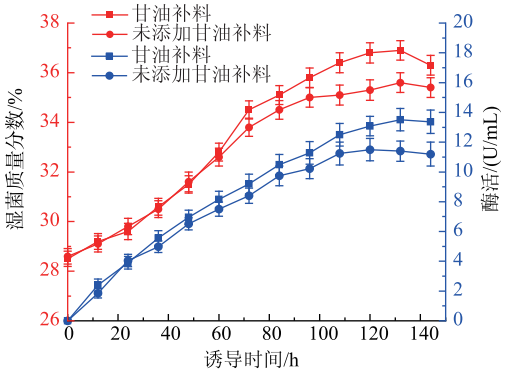
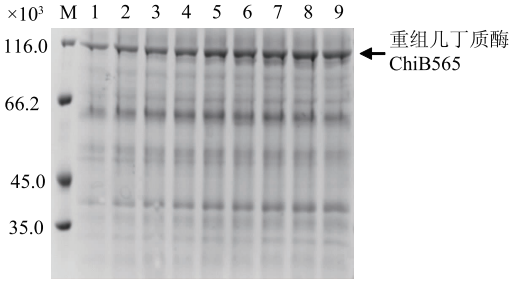


图 5　诱导阶段补加甘油对重组几丁质酶 ChiB565 表达的影响

Fig. 5　Effect of supplementation of glycerol on recombinant chitinase ChiB565 expression in the induction phase



泳道 1~9 代表诱导时间分别为 48、60、72、84、96、108、120、132、144 h 的发酵上清液。

图 6　重组几丁质酶 ChiB565 发酵表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6　SDS -PAGE analysis of recombinant chitinase ChiB565 expression

2.4　重组几丁质酶 ChiB565 在制备几丁寡糖中的应用

2.4.1　*中性蛋白酶脱除丰年虾卵壳蛋白质的加酶量和水解时间优化*　为充分脱除卵壳中的蛋白质，选择以蛋白质脱除率为指标对中性蛋白酶加酶量

和水解时间进行优化。中性蛋白酶加酶量优化结果如图 7(a)所示,随着中性蛋白酶加酶量增加,蛋白质脱除率不断上升,当中性蛋白酶加酶量为 30 mg/g 时,蛋白质脱除率达到峰值,约为 41.75%,且此时当加酶量继续增加时,蛋白质脱除率不再上升。中性蛋白酶水解时间优化结果如图 7(b)所示,随着水解时间延长,蛋白质脱除率不断上升,当水解时间为4 h 时,蛋白质脱除率达到峰值,约为 50.13%,且此时当水解时间继续增加时,蛋白质脱除率不再上升。因此选择 30 mg/g 加酶量和 4 h 水解时间来脱除蛋白质。

以丰年虾卵壳为底物制备几丁寡糖的研究,卵壳蛋白质的脱除通常采用酸碱法,其蛋白质脱除率能达 80%以上,但环境污染严重且作用时间长[10]。而全酶法脱除蛋白质尚未见报道,作者采用中性蛋白酶处理丰年虾卵壳,较优条件下蛋白质脱除率为 50.13%,理论上能打开几丁质–蛋白质的复合物结构,在后续处理中能提高几丁质酶和卵壳几丁质的结合效率,从而获得更高几丁质回收率。

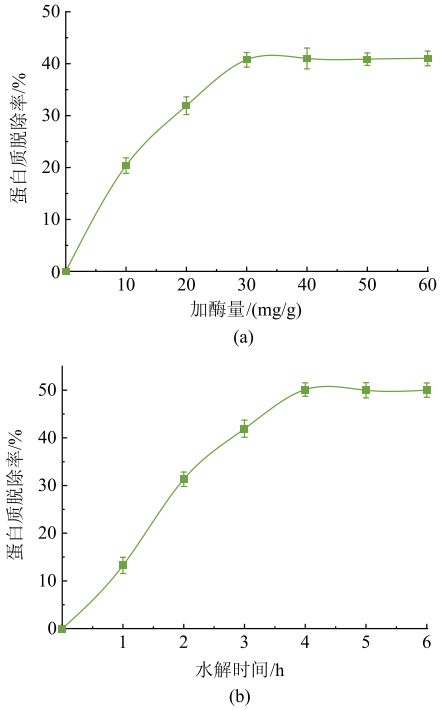


图 7　中性蛋白酶脱除卵壳蛋白质的条件优化

Fig. 7　Optimization of conditions for removing eggshell protein by protease

2.4.2　重组几丁质酶 ChiB565 水解丰年虾卵壳的加酶量和水解时间优化　为获得更多的几丁寡糖,选择以几丁质回收率为指标对重组几丁质酶 ChiB565 加酶量和水解时间进行优化。加酶量优化结果如图8(a)所示,随着加酶量增加,几丁质回收率不断上升,当加酶量为 40 U/g 时,几丁质回收率达到峰值,为 42.01%,且此时当加酶量继续增加时,几丁质回收率不再上升。水解时间优化结果如图 8(b)所示,随着水解时间延长,几丁质回收率不断上升,当水解时间为 5 h 时,几丁质回收率达到峰值,约为 60.17%,且此时当水解时间继续增加时,几丁质回收率不再上升。因此选择 40 U/g 加酶量和 5 h 水解时间来回收几丁质。

在最适条件下,丰年虾卵壳制备几丁质的回收率为 60.17%,结果表明大多数丰年虾卵壳被转化为可溶性几丁寡糖。几丁质水解产物中总还原糖质量浓度为 14.26 g/L,占虾壳几丁质的 58.97%,与几丁质回收率相近。

传统酸碱法制备几丁寡糖,酸碱法分步处理 6.5 h 后几丁质回收率为 15%,当引入微波提取和乙醇浸泡分步处理 2 h 后,几丁质回收率能达到 60%[10]。作者采用全酶法处理丰年虾卵壳,处理 5 h 时几丁质得率为 60.17%,与传统方法处于同一水平,处理过程环境污染较少,处理时间更短。

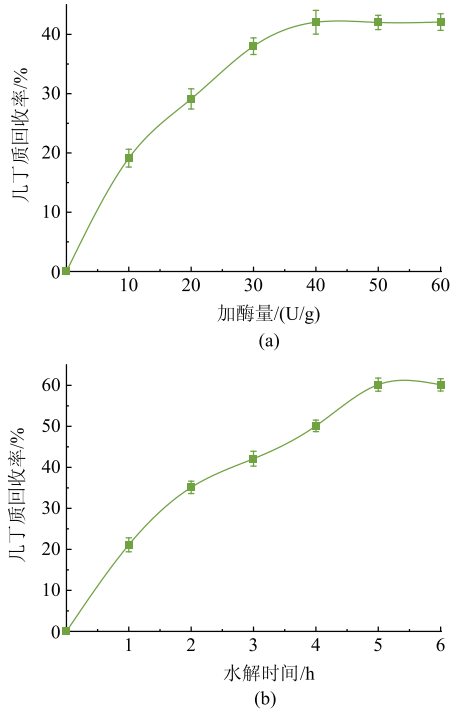


图 8　重组几丁质酶 ChiB565 回收卵壳几丁质的条件优化

Fig. 8　Optimization of recovering conditions for eggshell chitin by recombinant chitinase ChiB565

2.4.3 丰年虾卵壳水解产物的成分测定及抗氧化性分析　丰年虾卵壳水解产物的 HPLC 结果如图 9 所示,共观察到 3 个较为明显的特征峰 1、2、3,分别对应几丁二糖、几丁三糖和几丁四糖,同时还观察到 4 个较小的特征峰 4、5、6、7,其中特征峰 4、5 分别对应几丁五糖和几丁六糖;由于市面上无法买到六糖以上的几丁寡糖标准品,所以无法确定特征峰 6、7 为何种产物。结果表明丰年虾卵壳水解主产物为几丁二糖到几丁四糖,同时伴随少量几丁五糖和几丁六糖。

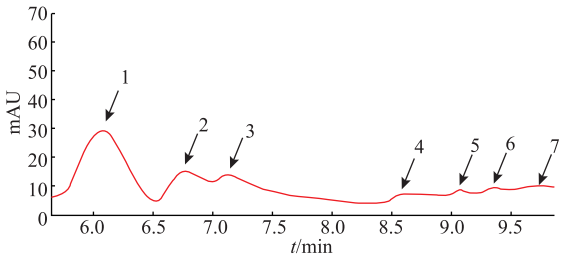


图 9　丰年虾卵壳水解产物的 HPLC 分析

Fig. 9　HPLC analysis of the hydrolysate of *Artemia salina* eggshells

几丁寡糖因具有抗氧化能力,在食品保鲜领域中有巨大的应用价值。丰年虾卵壳几丁质水解的产物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率分别为 59.94%和 53.15%。这是由于水解生成的不同聚合度壳聚糖产物中的羟基和氨基均可与羟自由基发生水合反应,另外其氨基可与羟自由基发生电子置换,进而生成稳定的电子对复合物。同时,张振婷等的研究表明低相对分子质量的壳聚糖对 DPPH 自由基具有较强的清除能力[22],本研究水解产物中存在大量的几丁二糖,这可能是导致其对 DPPH 自由基的清除率略高于 ABTS 自由基的原因。

3 结　语

作者首先在 *P. pastoris* 中重组表达了几丁质酶 ChiB565,研究了其酶学性质并完成了高密度发酵,随后以中性蛋白酶和重组几丁质酶 ChiB565 协同处理丰年虾卵壳,以制备几丁寡糖。结果显示当先用中性蛋白酶以 30 mg/g 的加酶量和 4 h 水解时间处理丰年虾卵壳以脱除蛋白质,再用重组几丁质酶 ChiB565 以 40 U/g 加酶量和 5 h 水解时间来水解几丁质时,水解产物主要为几丁二糖到几丁四糖,伴随少量几丁五糖和几丁六糖;同时水解产物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率分别为 59.94%和 53.15%。结果表明该生物酶法以丰年虾卵壳为底物制备几丁寡糖相较于传统化学法回收率相当,且污染较少,处理时间更短。该研究采用生物酶法以丰年虾卵壳为原料有效制备几丁寡糖,为几丁寡糖的工业化制备提供依据和参考。

参考文献:

[1] 孙文敏,李铮,李久红. 用丰年虫卵壳制备甲壳素和壳聚糖[J]. 渔业现代化,2008,35(2):57-59.
[2] 刘玉磊. 卤虫休眠卵壳形成的分子机制及其抗逆功能的研究[D]. 杭州:浙江大学,2009.
[3] GAJARDO G M,BEARDMORE J A. The brine shrimp artemia:adapted to critical life conditions[J]. **Frontiers in Physiology**,2012,3:185.
[4] 欧阳娟,薛松磊,徐妍,等. 环境因素对丰年虾孵化的影响及孵化条件优化[J]. 中国饲料,2018(18):83-86.
[5] 吕志华,于广利,王远红,等. 卤虫卵壳营养成分分析[J]. 水产科学,2004,23(1):42-44.
[6] 王文全,郑春霞,张瑞超,等. 自卤虫卵壳制备几丁质的工艺初探[J]. 新疆农业大学学报,2003(1):48-50.
[7] RISHAD K S,REBELLO S,NATHAN V K,et al. Optimised production of chitinase from a novel mangrove isolate,*Bacillus pumilus* MCB-7 using response surface methodology[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**,2016,5(2):143-149.
[8] SINGH G,ARYA S K. Antifungal and insecticidal potential of chitinases:a credible choice for the eco-friendly farming[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**,2019,20:101-289.
[9] JALIL S U,MISHRA M,ANSARI M I. Current view on chitinase for plant defence[J]. **Trends in Biosciences**,2015,8(24):6733-6743.
[10] 黄晓燕. 丰年虫卵壳壳聚糖的提取工艺优化与功能性研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2012.
[11] YOSEFALI A,ABBASALI M,AMIN E. Biotechnological approach to produce chitin and chitosan from the shells of *Artemia urmiana* Günther,1899(Branchiopoda,Anostraca) cysts from Urmia Lake,Iran[J]. **Crustaceana**,2007,80(2):171-180.
[12] MAHER A,LAURENCE M,FRÉD ÉRIC D,et al. Access to tetra-N-acetyl-chitopentaose by chemical N-acetylation of

glucosamine pentamer[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,98(1):770-777.
[13] XU Q S,LIU M S,LIU Q S,et al. The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly N-acetylated chitooligosaccharide[J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,174:1138-1143.
[14] 邓俊劲. 新型蛋白酶及几丁质酶的开发及其在虾加工废弃物中的应用[D]. 广州:华南理工大学,2020.
[15] SANDHYA C,ADAPA L K,NAMPOOTHIRI K M,et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2004,44(1):49-58.
[16] WANG C H ,NI Z J ,MA Y L ,et al. Antioxidant and hypolipidemic potential of soluble dietary fiber extracts derived from Bamboo shoots(*Phyllostachys praecox*)[J]. **Current Topics in Nutraceutical Research**,2018,17(2):195-205.
[17] ZHENG L,ZHAO M M,XIAO C Q,et al. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides:importance of controlling reaction pH and time[J]. **Food Chemistry**,2016,192:288-294.
[18] JUÁREZ-HERNÁNDEZ E O,CASADOS-VÁZQUEZ L E,BRIEBA L G,et al. The crystal structure of the chitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis* has a multidomain assembly[J]. **Scientific Reports**,2019,9(12):215-232.
[19] YANG S Q,FU X,YAN Q J,et al. Cloning,expression,purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*[J]. **Food Chemistry**,2016,192:1041-1048.
[20] FU X,YAN Q J,YANG S Q,et al. An acidic,thermostable exochitinase with β-N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to N-acetyl glucosamine[J]. **Biotechnology for Biofuels**,2014,7(1):174.
[21] ZHANG Y T,ZHOU Z G,LIU Y C,et al. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2014,98(4):1651-1662.
[22] 张振婷,钟志梅. 不同分子量壳聚糖抗氧化性能研究[J]. 化工管理,2019(21):17-19.

科　技　信　息

美国加利福尼亚州考虑将 BPA 列入 65 号提案中的致癌物清单

2022 年 2 月 1 日,据化学观察报道,加利福尼亚州环境健康危害评估办公室(Oehha)开始收集信息,以确定是否将双酚 A(BPA)列入 65 号提案下的致癌物清单。

BPA 已被列为 65 号提案中的生殖毒性物质,要求公司对超过没有明显风险阈值的接触提供警告。Oehha 正在征集 BPA 致癌性的相关信息,包括:癌症生物检定;癌症流行病学研究;与癌症机制有关的研究;其他相关研究,包括药代动力学以及对生化和生理过程的影响。

双酚 A 用于制造坚硬透明的聚碳酸酯塑料,以及一些食品和饮料罐内的环氧树脂衬里。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.加州考虑将 BPA 列入 65 号提案中的致癌物清单[EB/OL]. (2022-2-8).http://www.tbtguide.com/xwdt/gwxw/202202/t20220208_1982603.html