耐盐芽孢杆菌 R1 高效壳聚糖酶异源表达及特性分析

王建荣[1,2,3]，王永华[2]，祝木金[1]，王 平[1]，陈 微[1]，余 思[1]，钟 斌[1]

（1. 深圳润康生态环境股份有限公司，广东 深圳 518102；2. 华南理工大学 食品科学与工程学院，广东 广州 510641；3. 深圳诺普信农化股份有限公司，广东 深圳 518102）

摘要： 采用同源克隆获得耐盐芽孢杆菌壳聚糖酶（CsnBh46）基因，并异源表达制备重组耐盐芽孢杆菌壳聚糖酶，通过表征分析获得重组 CsnBh46 酶学特性。CsnBh46 全长 278 个氨基酸，三维结构显示其分为上下两个半球，包含 9 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠。在 7 L 发酵罐中，重组工程菌 bh-5 的最高酶活力和总蛋白质质量浓度分别为 6 375 U/mL 和 4.3 g/L。纯化后的重组 CsnBh46 最适反应 pH 和温度分别为 6.0 和 60 ℃，金属离子 Mn^{2+}、Ca^{2+}和 Mg^{2+}对重组 CsnBh46 具有激活作用。重组 CsnBh46 最适底物为脱乙酰度 95%胶体壳聚糖。重组 CsnBh46 能够高效水解胶体壳聚糖并且根据反应时间可以定向制备不同聚合度壳寡糖。本研究为 CsnBh46 产业化应用提供参考。

关键词： 耐盐芽孢杆菌 R1；壳聚糖酶；毕赤酵母；重组表达；壳寡糖

中图分类号：Q 814　**文章编号：**1673-1689(2023)09-0010-10　**DOI：**10.12441/spyswjs.20211210001

Heterologous Expression and Characterization Analysis of a High-Efficiency Chitosanase from *Bacillus halotolerans* R1

WANG Jianrong[1,2,3], *WANG Yonghua*[2], *ZHU Mujin*[1], *WANG Ping*[1], *CHEN Wei*[1], *YU Si*[1], *ZHONG Bin*[1]

(1. Shenzhen Raink Ecology & Environment Co., Ltd., Shenzhen 518102, China; 2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 3. Shenzhen Noposion International Investment Co., Ltd., Shenzhen 518102, China)

Abstract: The present study employed homologous cloning to obtain the chitosanase (CsnBh46) gene from *Bacillus halotolerans* R1, and prepared recombinant *Bacillus halotolerans* R1 chitosanase through heterologous expression. The recombinant CsnBh46 enzyme was characterized to determine its enzymatic properties. The full-length recombinant CsnBh46 consists of 278 amino acids, and its three-dimensional structure reveals it is divided into upper and lower domains, each containing nine α-helices and two β-sheets. The maximum enzymatic activity of recombinant CsnBh46 expressed in recombinant strain bh-5 was 6 375 U/mL, with a total protein mass concentration of 4.3 g/L. The optimal reaction pH and temperature for purified recombinant CsnBh46 were 6.0 and 60 ℃, respectively. Meanwhile, recombinant CsnBh46 was activated by Mn^{2+}, Ca^{2+} and Mg^{2+}. The favorite substrate for recombinant CsnBh46 was colloidal chitosan with 95% degree of deacetylation.

收稿日期： 2021-12-10　**修回日期：** 2022-02-06

基金项目： 国家“十三五”重点研发计划重点专项项目（2018YFC0311104）；深圳市科技攻关面上项目（20201024145915001）。

作者简介： 王建荣（1985—），男，博士，高级工程师，硕士研究生导师，主要从事酶工程及生物催化研究。

E-mail：biwangjianrong@mail.scut.edu.cn

Furthermore, recombinant CsnBh46 efficiently hydrolyzed colloidal chitosan and allowed for the targeted preparation of chitosan oligosaccharides with different degrees of polymerization based on reaction time. This study provides a reference for the industrial application of CsnBh46.

Keywords: *Bacillus halotolerans* R1, chitosanase, *Pichia pastoris*, heterologous expression, chitosan oligosaccharides

作为一种生物多糖,几丁质来源广泛,据统计,每年自然界产生的几丁质多达数百亿吨[1]。几丁质由于溶解性太差,限制其产业化应用。几丁质脱去乙酰基团形成的壳聚糖可以溶于稀酸,提升其应用价值,但是黏度高、溶水性差等缺点还是限制其进一步推广和应用[1]。壳寡糖作为壳聚糖的降解产物,聚合度一般在 2~20,相比于壳聚糖,壳寡糖具有低黏度、良好的水溶性以及生物可降解性等优势[2]。研究表明,壳寡糖具有抗炎症、抗肿瘤、抑菌、抗氧化等功效,因此可广泛应用于食品、医药、绿色农业种植等领域[3-4]。目前壳寡糖的制备方式可分为化学法、物理法和酶法三大类,相比另外两种方法,化学法速度快、成本低,因此产业化应用以化学法为主[5]。随着对壳寡糖研究的深入,越来越多的研究人员提倡酶法制备壳寡糖,酶法工艺具有绿色环保、反应过程和产物可控、产物结构完好等优势[5]。但是较高的生产成本限制了酶法工艺的推广应用,因此降低酶法工艺成本,寻找高效壳聚糖酶具有重要意义。

壳聚糖酶能够分解壳聚糖形成壳寡糖,壳聚糖酶来源广泛,已报道的壳聚糖酶主要来源于细菌和真菌。根据蛋白质结构特性,壳聚糖酶可细分为多个家族,其中 46 家族壳聚糖酶因具有催化效率高、反应条件温和等优点,在许多领域具有良好的应用价值[6-7]。46 家族壳聚糖酶主要来源于细菌,迄今,已有多种 46 家族壳聚糖酶被分离纯化以及特性表征。来源于芽孢杆菌的壳聚糖酶作为 46 家族重要组成部分,前期的研究主要集中在萎缩芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、莫海威芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌[8-12],而关于耐盐芽孢杆菌壳聚糖酶的研究还未有报道。本研究以前期筛选到的耐盐芽孢杆菌 R1 为研究对象,通过同源克隆获得耐盐芽孢杆菌 R1 壳聚糖酶基因(*csnbh46*),通过毕赤酵母异源表达获得重组耐盐芽孢杆菌壳聚糖酶 CsnBh46,此外对重组 CsnBh46 进行表征分析,为其下一步研究和产业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒以及试剂

耐盐芽孢杆菌 R1(分离自土壤,保存于-60 ℃低温冰箱):作者所在实验室提供;大肠杆菌 Top10 感受态细胞:宝日医生物技术(北京)有限公司产品;表达载体 pPICZαA、毕赤酵母 X33:美国赛默飞世尔科技公司产品。

限制性内切酶 *Sac* I、*Eco*R I、*Not* I:宝日医生物技术(北京)有限公司产品;Ni-IDA 蛋白质纯化试剂盒:上海生工股份有限公司产品;壳聚糖、氨基葡萄糖、几丁质、木聚糖、羧甲基纤维素钠:上海源叶生物科技有限公司产品;不同聚合度壳寡糖(聚合度 2~6):惠州长龙生物技术有限公司产品;Silica gel 60 F254 薄层层析硅胶板:德国默克公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

实验过程中所用的培养基主要包括 LBZ 培养基、YPDZ 培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基和 BSM 培养基,所有培养基的配制均参照前期报道方法[13]。

1.2 仪器与设备

PCR 仪:美国应用生物系统(ABI)公司产品;凝胶成像系统、电转化仪:美国伯乐公司产品;核酸浓度测定仪:北京百泰克生物技术有限公司产品;7 L 发酵罐:镇江东方生物工程设备技术公司产品;紫外分光光度计:日本岛津公司产品;UltiMate3000 高效液相色谱仪:美国赛默飞世尔科技公司产品。

1.3 方法

1.3.1 耐盐芽孢杆菌 R1 壳聚糖酶基因克隆及分析

将前期保藏于-60 ℃冰箱的耐盐芽孢杆菌 R1 取出活化,以单菌落的形式接入 LB 液体培养基进行培养,吸取 50 μL 培养好的菌液,98 ℃热处理 5 min 后作为 PCR 扩增模板。根据耐盐芽孢杆菌 *KKD1* 基因组中假定壳聚糖酶基因序列(基因登录号:CP054584.1,1 312 385~1 313 226)设计一对引物(*csnbh46*-fw:5′-ATGAAAATCAGTTTGGAGAAA-3′

和 *csnbh46*-rev:5′-TTATTTGATTACGAAATCACC-3′)用于 PCR 扩增。以处理好的菌液为扩增模板,通过 PCR 扩增获得目标产物,通过琼脂糖凝胶电泳对目标 PCR 产物进行纯化回收,将纯化回收后的 PCR 产物送至广州艾基生物有限公司进行测序分析,根据测序结果获得壳聚糖酶基因 *csnbh46*。

1.3.2 耐盐芽孢杆菌壳聚糖酶 CsnBh46 序列分析 通过 NCBI 数据库完成壳聚糖酶基因 *csnbh46* 序列比对分析;通过 expasy 平台提供的软件完成壳聚糖酶 CsnBh46 理化性质及基础结构分析;通过在线软件 SignalP-5.0 Server 完成信号肽分析;通过在线软件 SWISS-MODEL 完成壳聚糖酶 CsnBh46 三维建模;通过软件 Autodockviner 完成壳聚糖酶CsnBh46 和底物对接分析;通过软件 PyMOL 分析壳聚糖酶 CsnBh46 三维结构。

1.3.3 重组工程菌构建及筛选 由于在毕赤酵母 X33 中进行重组表达,因此根据毕赤酵母密码子偏好性进行序列优化。优化后的基因序列(命名为 *csnbh46s*,不含信号肽编码序列)由通用生物系统(安徽)有限公司合成。合成过程中在 *csnbh46s* 基因序列两端添加 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切位点,此外去掉 *csnbh46s* 基因序列自身终止密码子,将合成的 *csnbh46s* 基因和载体 pPICZαA 进行连接反应,获得表达载体 pPICZαA-*csnbh46s*。将表达载体 pPICZαA-*csnbh46s* 用限制性内切酶 *Sac* Ⅰ线性化后,转入毕赤酵母 X33 感受态细胞中,将转化后的毕赤酵母 X33 感受态细胞涂布于 YPDZ 固体培养基,30 ℃静置培养。参照前期报道的方法进行筛选实验[13],最终确定 1 个重组工程菌进行高密度发酵培养。

1.3.4 高密度发酵 高密度发酵培养在 7 L 发酵罐中进行,实验过程如下:1)将重组工程菌以单菌落形式接入 YPDE 培养基中过夜培养(200 r/min、30 ℃),作为一级种子液;2)将一级种子液按 1%的接种体积分数接入含有 100 mL YPD 培养基的 500 mL 摇瓶中,200 r/min、30 ℃培养至 $OD_{600\,nm}$ 值达到 6~10;3)将培养好的菌液按照 10%的接种体积分数接入 7 L 发酵罐中进行培养;4)初始阶段补加甘油作为碳源供菌体生长,当菌体质量浓度(以菌体湿质量计)增加至 181 g/L,停止流加甘油,开始补加甲醇进行诱导培养;5)培养过程中每隔 24 h 取样进行酶活力、总蛋白质质量浓度以及细胞质量浓度的测定,测定过程和前期报道方法一致[8]。

1.3.5 重组 CsnBh46 分离纯化及酶动力学参数测定 重组 CsnBh46 纯化参照文献[8]的方法进行。通过超滤管(相对分子质量 1.0×10^4)对高密度发酵上清液进行浓缩。以浓缩好的酶液为对象,利用 Ni-IDA 蛋白质纯化试剂盒获得纯化后重组 CsnBh46。测定重组 CsnBh46 对不同质量浓度胶体壳聚糖(1~10 mg/mL)的反应速度,通过软件 GraphPad Prism 8.0.2 拟合分析获得相关酶动力学参数,如米氏常数 K_m、最大反应速度 v_{max} 等。

1.3.6 重组 CsnBh46 特性测定 重组 CsnBh46 最适反应 pH 测定如下:在 55 ℃、不同 pH 条件下(pH 3.5~6.0 时为 0.05 mol/L 乙酸乙酸钠缓冲液,pH 6.5~7.0 时为 0.05 mol/L 磷酸缓冲液)测定纯化后重组 CsnBh46 酶活力,参照前期报道方法[8]计算相对酶活力;pH 稳定性测定如下:将纯化后重组 CsnBh46 在 25 ℃、不同 pH 条件下(pH 3.0~11.0)处理 4 h 后测定剩余酶活力。重组 CsnBh46 最适反应温度测定如下:在 pH 6.0 条件下,测定纯化后重组 CsnBh46 在不同温度(40~70 ℃)的酶活力,参照前期报道方法[8]计算相对酶活力;将纯化后重组 CsnBh46 在 45~60 ℃条件下水浴处理 30 min 和 60 min 后,测定剩余酶活力。不同金属离子对纯化后重组 CsnBh46 稳定性影响参照前期报道方法[8]。以不同脱乙酰度胶体壳聚糖、几丁质、羧甲基纤维素钠、木聚糖为底物,分别测定纯化后重组 CsnBh46 酶活力,将测得的最高酶活力设置为 100%,计算相对酶活力。

1.3.7 重组 CsnBh46 水解特性分析 以 5 g/dL 不同聚合度壳寡糖(壳二糖至壳六糖)为底物,参照前期报道的方法[8,14]研究重组 CsnBh46 水解特性。

1.3.8 不同聚合度壳寡糖可控性制备 以脱乙酰度 95%胶体壳聚糖为底物,通过重组 CsnBh46 可控性制备不同聚合度壳寡糖。首先,摸索不同重组 CsnBh46 添加量(5~25 U/mL)对不同质量浓度胶体壳聚糖(1~3 g/dL)的水解效果。总反应体系为 10 mL,在 55 ℃、100 r/min 反应 1 h 后取样进行分析。其中水解率和产物组成测定均参照前期报道方法[15-16]。其次,在 55 ℃、100 r/min 条件下,以质量浓度3 g/dL 胶体壳聚糖为底物,重组 CsnBh46 添加量为 10 U/mL,解析反应过程中水解率和产物组成动态变化。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖酶基因 *csnbh46* 序列分析

结合测序结果以及 NCBI 比对分析,发现 *csnbh46* 基因全长 837 bp,编码 278 个氨基酸。通过软件 ProtParam 预测,CsnBh46 分子式为 $C_{1390}H_{2172}N_{382}O_{426}S_8$,蛋白质相对分子质量为 31 300。NCBIblastp 比对结果显示 CsnBh46 与枯草芽孢杆菌壳聚糖酶(WP_133486751.1)相似性为 93.1%,与萎缩芽孢杆菌壳聚糖酶(WP_088117259.1)相似性为 91.2%。NCBIblastp 比对结果表明 CsnBh46 属于糖苷水解酶 46 家族。将 CsnBh46 与已经获得晶体的壳聚糖酶(包括链霉菌 174 壳聚糖酶 Csn174,P33665.1;链霉菌 SirexAA-E 壳聚糖酶 Csn5457,AEN13266.1;环状芽孢杆菌壳聚糖酶 CsnBac,P33673.2;枯草芽孢杆菌壳聚糖酶 CsnMY002,WP_148982050.1)进行比对分析,实验结果如图 1 所示。虽然不同微生物来源的壳聚糖酶氨基酸序列差异性大,但是酶催化活性位点高度保守,根据比对结果以及之前的文献报道[17],推测第 55 位的谷氨酸和第 71 位的天冬氨酸为 CsnBh46 催化活性位点。此外,SignalP-5.0 Server 预测 CsnBh46 前 36 个氨基酸为其潜在信号肽序列。

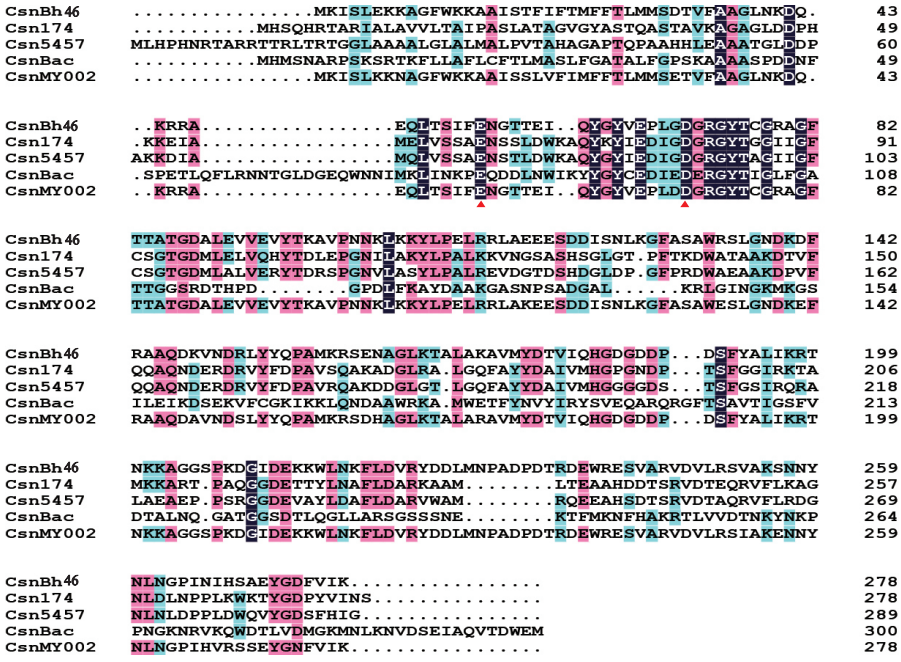


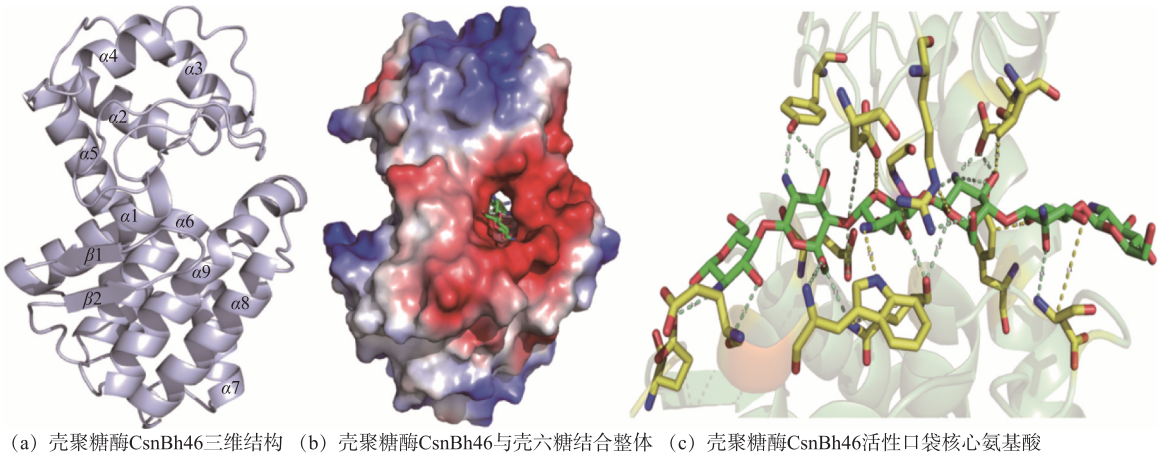
图 1 壳聚糖酶 CsnBh46 与 46 家族壳聚糖酶蛋白质比对分析

Fig. 1 Protein comparative analysis of chitosanase CsnBh46 and glycoside hydrolase family 46

以枯草芽孢杆菌壳聚糖酶 CsnMY002(PDB 登录号为 7C6C)为模板,通过在线软件 SWISS-MODEL 建模,获得 CsnBh46 三维构象(见图 2(a))。和已报道的壳聚糖酶一致[18],CsnBh46 三维结构呈球状,主要由 α 螺旋构成,其中 α2~α4 构成上半球;下半球主要有 α1、α6~α9 和 2 个 β 折叠构成;上下两个半球由长螺旋 α5 连接。CsnBh46 和壳六糖分子对接由 Autodockviner 完成。由图 2(b)可知,CsnBh46 底物结合区域呈孔洞状态,壳六糖被包裹在底物结合区域。由图 2(c)可知,CsnBh46 底物结合区域与壳六糖之间的作用力主要是氢键,其中多个关键氨基酸在水解过程中发挥重要作用。

2.2 重组工程菌构建及筛选

由于在毕赤酵母 X33 中进行重组表达,因此选择毕赤酵母最经典的 α 信号肽替代 CsnBh46 自身信号肽。此外通过分析,发现耐盐芽孢杆菌和毕赤酵母密码子偏好性存在差异,因此需要根据毕赤酵母密码子偏好性进行序列优化。通过密码子优化,将原始基因 *csnbh46* 的 GC 含量由 45.1%提升至 48.2%,更接近毕赤酵母高效表达最适范围(约 50%),密码子适用指数(CAI)由 0.62 提升至 0.78,整个过程对 179 个碱基进行了优化(见图 3)。优化后的基因连接至载体 pPICZαA,获得表达载体 pPICZαA-*csnbh46s*。将表达载体 pPICZαA-*csnbh46s*



（a）壳聚糖酶CsnBh46三维结构 （b）壳聚糖酶CsnBh46与壳六糖结合整体 （c）壳聚糖酶CsnBh46活性口袋核心氨基酸

图 2 壳聚糖酶 CsnBh46 结构分析

Fig. 2 Structure analysis of chitosanase CsnBh46

线性化后转入毕赤酵母 X33 获得多个重组转化子。初步筛选挑取 96 个转化子,通过酶活力测定分析,最终选取 3 个高酶活力重组工程菌（分别命名为 bh-5、bh-65 和 bh-73)进行复筛。复筛采用摇瓶培养,诱导时间均为 120 h,摇瓶复筛结果显示重组工程菌 bh-5 发酵酶活力最高(125 U/mL),其次为 bh-73(105 U/mL)和 bh-65(101 U/mL)。

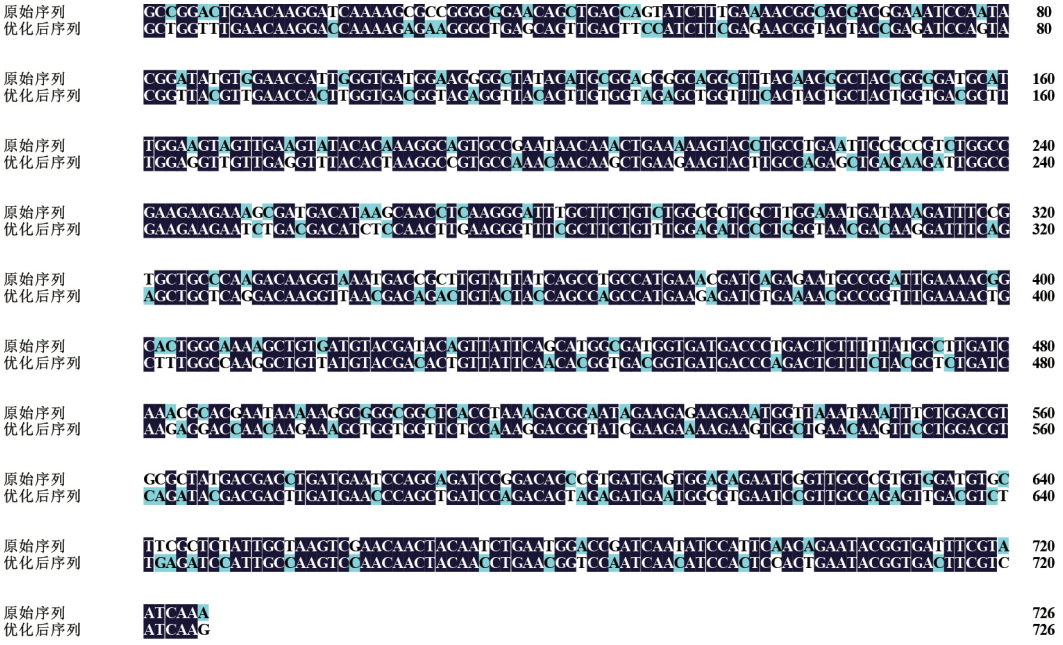
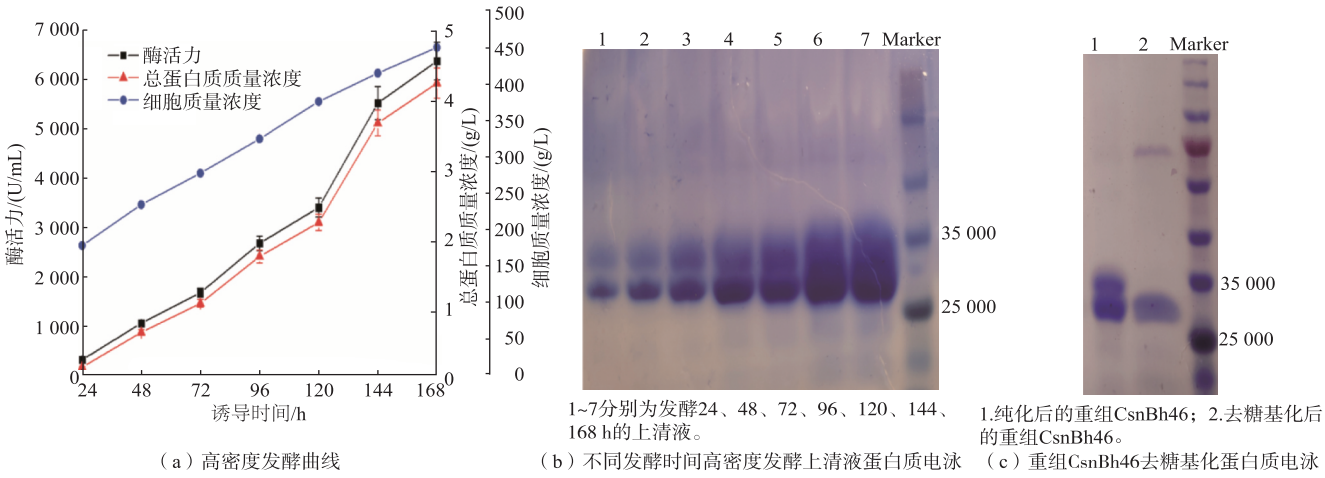


图 3 *csnbh46* 基因密码子优化序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of optimized and native gene of *csnbh46*

2.3 重组工程菌高密度发酵

选取重组工程菌 bh-5 进行高密度发酵，实验在 7 L 发酵罐中进行。由图 4(a)可知,在诱导培养 168 h 后,重组工程菌 bh-5 的酶活力、总蛋白质质量浓度和细胞质量浓度均达到最高，分别为6 375 U/mL、4.3 g/L 和 465 g/L。相比摇瓶培养,重组工程菌 bh-5 在 7 L 发酵罐发酵后的酶活力提升了 50 倍。由图 4(b)可知,发酵上清液中存在两条主要蛋白质条带,相对分子质量分别约为 3.3×10^4 和 2.7×10^4,推测相对分子质量 3.3×10^4 条带是由蛋白质翻译过程中糖基化形成的。由图 4(c)可知,重组CsnBh46去糖基化后只剩下一条相对分子质量约为2.7×10^4的条带,表明重组 CsnBh46 存在糖基化修饰。此外发酵上清液中基本为重组 CsnBh46(见图 4(b))。



（a）高密度发酵曲线

1~7分别为发酵24、48、72、96、120、144、168 h的上清液。

（b）不同发酵时间高密度发酵上清液蛋白质电泳

1.纯化后的重组CsnBh46；2.去糖基化后的重组CsnBh46。

（c）重组CsnBh46去糖基化蛋白质电泳

图 4　重组菌 bh–5 在 7 L 发酵罐发酵曲线及不同样品 SDS–PAGE 蛋白质电泳

Fig. 4　Fermentation curve and SDS–PAGE analysis of different samples of recombinant strain bh–5 cultivated in 7 L bioreactor

2.4　分离纯化、酶动力学参数及底物特异性测定

通过实验获得纯化重组 CsnBh46，纯化后的重组 CsnBh46 酶比活为 2 310 U/mg，重组 CsnBh46 酶反应动力学参数如表 1 所示。重组 CsnBh46 米氏常数 K_m 为 0.75 mg/mL，表明重组 CsnBh46 对壳聚糖具有良好的亲和力。最大反应速度 v_{max} 为 2 513 μmol/(L·min·mg)，表明重组 CsnBh46 能够高效水解壳聚糖。

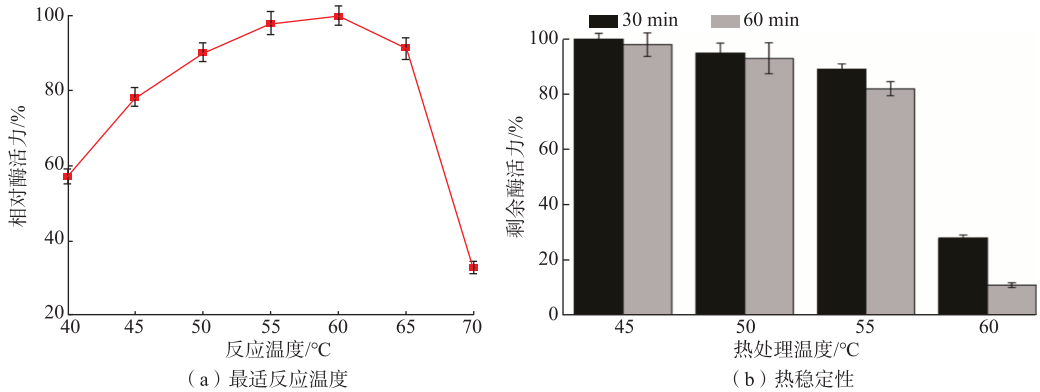
表 1　重组 CsnBh46 酶动力学参数

Table 1　Kinetic parameters of recombinant CsnBh46

样品	K_m/(mg/mL)	v_{max}/(μmol/(L·min·mg))	K_{cat}/min^{-1}	(K_{cat}/K_m)/(mL/(mg·min))
重组 CsnBh46	0.75	2 513	541	721

2.5　温度特性

重组 CsnBh46 温度特性如图 5 所示，由图 5(a)可知，重组 CsnBh46 最适反应温度为 60 ℃，在 50~65 ℃时相对酶活力均大于 80%。由图 5(b)可知，重组 CsnBh46 在 45~55 ℃时具有良好的稳定性，水浴处理 1 h 后，剩余酶活力均大于 80%，当处理温度大于 55 ℃，剩余酶活力急剧下降，重组 CsnBh46 在 60 ℃水浴处理 1 h 后，剩余酶活力仅为 11%。有研究报道菱缩芽孢杆菌壳聚糖酶 Csn–SH[18]、解淀粉芽孢杆菌壳聚糖酶 BaCsn46A[15]和 BaCsn46B[11]，在 55 ℃热处理 30 min 后，剩余酶活力分别为 7%、31%和 60%。相比于上述芽孢杆菌壳聚糖酶，重组 CsnBh46 具有更好的热稳定性。



（a）最适反应温度

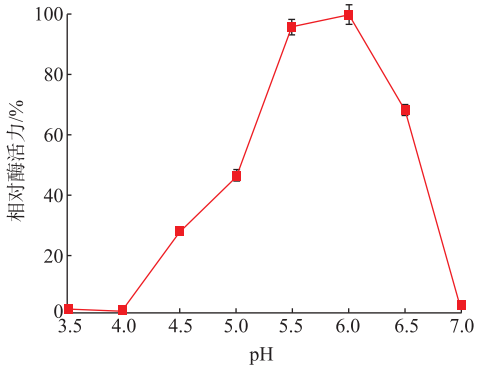
（b）热稳定性

图 5　温度对重组 CsnBh46 的影响

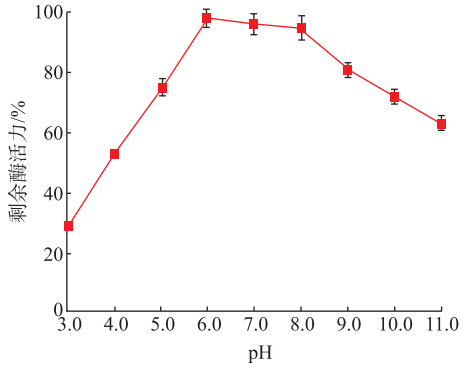
Fig. 5　Effect of temperature on recombinant CsnBh46

2.6 pH 特性

重组 CsnBh46 的 pH 特性如图 6 所示，由图 6(a)可知,重组 CsnBh46 最适反应 pH 为 6.0。由图 6(b)可知,重组 CsnBh46 在 pH 6.0~8.0 时具有良好的稳定性，室温放置 4 h 后，剩余酶活力均大于 80%。重组 CsnBh46 的 pH 特性与已报道的吉氏菌壳聚糖酶相似[19]。



（a）最适反应pH



（b）pH稳定性

图 6 重组 CsnBh46 最适反应 pH 和 pH 稳定性

Fig. 6 Optimal reaction pH and pH stability of recombinant CsnBh46

2.7 金属离子特性

不同金属离子对重组 CsnBh46 稳定性影响如表 2 所示。Mn^{2+}、Mg^{2+}和 Ca^{2+}对重组 CsnBh46 具有激活作用，其中 Mn^{2+}效果最好。在 1 mmol/L 条件下，Mn^{2+}、Mg^{2+}和 Ca^{2+}处理组剩余酶活力分别为145.2%、111.5%和 115.5%;在 5 mmol/L 条件下,Mn^{2+}、Mg^{2+}和 Ca^{2+}处理组剩余酶活力分别为164.8%、118.6%和123.2%。金属离子 Cu^{2+}、Fe^{2+}和Co^{2+}对重组 CsnBh46 具有抑制作用,其中 Fe^{2+}的影响最大。当离子浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 时,Fe^{2+}处理组的剩余酶活力分别仅为 26.6%和 8.5%。

表 2 不同金属离子对重组 CsnBh46 稳定性影响

Table 2 Effects of different metal ions on the stability of recombinant CsnBh46

金属离子	剩余酶活力/%	
	1 mmol/L	5 mmol/L
对照	100.0	100.0
Co^{2+}	76.3±2.5	65.2±3.2
Cu^{2+}	85.6±4.1	45.2±1.2
Fe^{2+}	26.6±1.1	8.5±0.8
Na^{+}	98.6±3.1	96.3±4.2
Ca^{2+}	115.5±3.5	123.2±4.5
K^{+}	99.7±3.6	95.2±2.3
Mn^{2+}	145.2±4.8	164.8±5.1
Mg^{2+}	111.5±2.1	118.6±1.9

2.8 底物特异性

重组 CsnBh46 底物特异性如表 3 所示，重组 CsnBh46 只对胶体壳聚糖具有水解活性，其中对脱乙酰度 95%胶体壳聚糖表现出最高水解活性。重组 CsnBh46 对粉末几丁质、胶体几丁质、羧甲基纤维素钠以及木聚糖均没有活性。

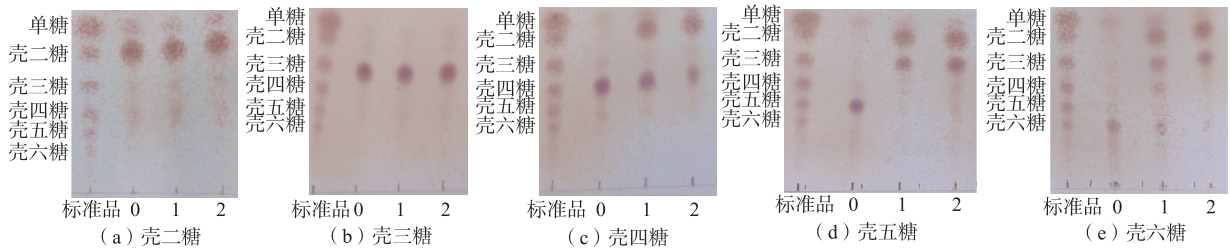
表 3 重组 CsnBh46 底物特异性

Table 3 Substrate specificity of recombinant CsnBh46

底物	相对酶活力/%
脱乙酰度 85%胶体壳聚糖	91.3±2.6
脱乙酰度 90%胶体壳聚糖	95.6±2.3
脱乙酰度 95%胶体壳聚糖	100±3.5
粉末几丁质	—
胶体几丁质	—
木聚糖	—
羧甲基纤维素钠	—

2.9 水解特性

重组 CsnBh46 水解不同聚合度壳寡糖实验结果如图 7 所示,重组 CsnBh46 对壳二糖和壳三糖没有水解活性,反应 2 h 后,壳二糖和壳三糖均没有被分解成更小的糖。重组 CsnBh46 对壳四糖水解活性较弱,反应 2 h 后,少量壳四糖被转化为壳二糖。重组 CsnBh46 对壳五糖和壳六糖具有良好的水解活性，反应 1 h 后，壳五糖全部转化为壳二糖和壳三糖,壳六糖则全部转化为壳二糖、壳三糖和壳四糖。在所有的反应过程中均没有出现单糖，表明重组 CsnBh46 是一种内切壳聚糖酶。此外,在所有的反应



0~2 分别为反应 0~2 h 的上清液。

图 7　重组 CsnBh46 水解不同聚合度壳寡糖产物分析

Fig. 7　Analysis of the hydrolysis products from differently polymerized chitosan oligosaccharides hydrolyzed by recombinant CsnBh46

体系中均没有出现比初始底物聚合度更高的壳寡糖,表明重组 CsnBh46 不具有转糖苷酶活性。

2.10　重组 CsnBh46 水解壳聚糖制备不同聚合度壳寡糖

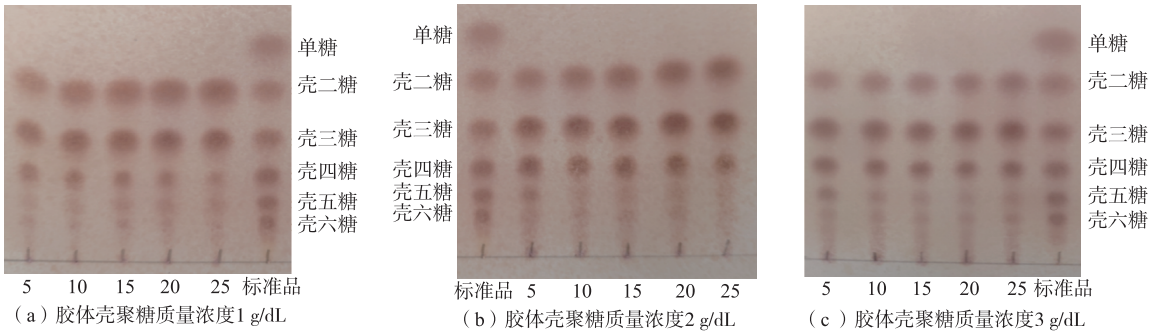
不同酶添加量对不同质量浓度(1~3 g/dL)底物的水解效果如图 8 所示。底物质量浓度为 1 g/dL、酶添加量在 5~20 U/mL 时,反应 1 h 后,水解产物主要由壳二糖和壳三糖构成,含有少量壳四糖;当酶添加量为 25 U/mL 时,水解产物则基本为壳二糖和壳三糖(见图 8(a))。底物质量浓度 2 g/dL 和3 g/dL 的水解结果相似,当酶添加量为 5~10 U/mL 时,水解产物主要为壳二糖、壳三糖、壳四糖和壳五糖,包含少量壳六糖;当酶添加量大于 10 U/mL,水解产物则主要由壳二糖、壳三糖和壳四糖构成(见图 8(b)和图 8(c))。

根据不同酶添加量水解不同质量浓度胶体壳聚糖实验结果,进一步研究 10 U/mL 酶添加量水解 3 g/dL 胶体壳聚糖反应过程中产物组成和水解率,实验结果如图 9 所示。反应 15 min 后,水解产物由壳二糖至壳六糖构成(见图 9(a)),其中壳三糖、壳四糖、壳五糖和壳六糖的质量浓度分别为 6.32、7.12、6.51、5.32 mg/mL(见图 9(b)),水解率达到 92.5%(见图 9(c))。反应 30 min 后,壳五糖和壳六糖的质量浓度逐渐降低,壳二糖、壳三糖和壳四糖的质量浓度以及水解率逐渐增加(见图 9)。反应至 45 min 和 60 min 时,水解产物主要由壳二糖、壳三糖、壳四糖和壳五糖构成。

迄今,已有多种酶用于制备壳寡糖,根据酶的种类可以分为专一性酶(壳聚糖酶)和非专一性酶(包括果胶酶、纤维素酶、脂肪酶等)。由表 4 可知,壳聚糖酶水解效率明显优于非专一性酶,此外重组 CsnBh46 水解效率优于已报道的多种壳聚糖酶。

3　结　语

通过同源克隆获得耐盐芽孢杆菌 R1 壳聚糖酶基因 *csnbh46*,该基因全长为 837 bp,编码 278 个氨基酸,其中前 36 个氨基酸为其潜在信号肽序列,序列比对结果表明壳聚糖酶 CsnBh46 属于糖苷水解酶 46 家族。以毕赤酵母 X33 为宿主,重组表达壳聚糖酶 CsnBh46,在 7 L 发酵罐条件下,重组工程菌



5、10、15、20、25 分别为酶添加量 5、10、15、20、25 U/mL 时发酵液。

图 8　重组 CsnBh46 水解不同质量浓度胶体壳聚糖产物 TLC 分析

Fig. 8　TLC analysis of products from different concentration of colloidal chitosan catalyzed by recombinant CsnBh46

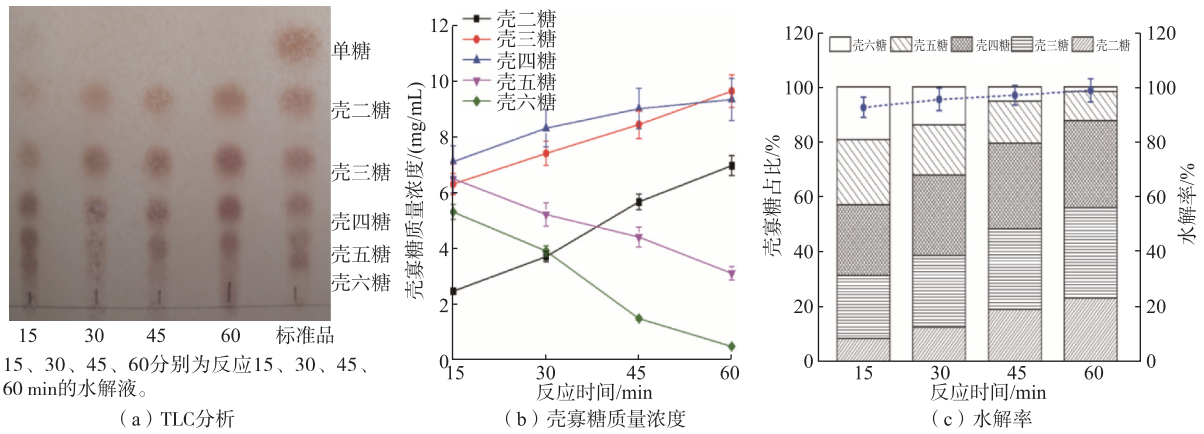


图 9　不同反应时间下重组 CsnBh46 水解 3 g/dL 胶体壳聚糖的水解产物 TLC 分析、壳寡糖质量浓度以及水解率

Fig. 9　TLC analysis of products, mass concentration of chitosan digosaccharides and hydrolysis rate of 3 g/dL colloidal chitosan hydrolyzed under different reaction time by recombinant CsnBh46

表 4　酶法制备壳寡糖

Table 4　Chitosan oligosaccharides prepared by enzymatic methods

酶	酶添加量	壳聚糖质量浓度/(g/dL)	壳聚糖脱乙酰度(DA)/%	反应时间/h	水解率/%	壳寡糖聚合度	参考文献
重组 CsnBh46	10 U/mL	3	95	0.25	92.5	2~6	本研究
巴伦氏类芽孢杆菌壳聚糖酶	5 U/mL	5	85	4	79.3	2~4	[20]
解淀粉芽孢杆菌壳聚糖酶	3 U/mL	3	95	3	86.9	2~6	[15]
萎缩芽孢杆菌壳聚糖酶	20 U/mL	4	85	0.67	80.6	2~6	[18]
商业果胶酶	10 g/dL	1	88	24	17.0	6~11	[21]
商业脂肪酶	0.5 g/dL	0.5	83	6	58.2	1~6	[22]
商业木瓜蛋白酶	0.3 g/dL	1	87	24	11.1	3~7	[23]
商业纤维素酶	0.25 g/dL	0.5	87	24	40.0	2~6	[24]

bh-5 最高酶活力为 6 375 U/mL。此外通过蛋白质纯化以及酶动力学参数测定发现重组 CsnBh46 米氏常数 K_m 为 0.75 mg/mL，最大反应速度 v_{max} 为 2 513 μmol/(L·min·mg)，表明重组 CsnBh46 对壳聚糖具有良好的亲和力和水解活性。重组 CsnBh46 在 45 ~ 55 ℃具有良好的活性和稳定性。重组 CsnBh46 水解特性表明其是一种内切壳聚糖酶。重组 CsnBh46 能够高效水解 3 g/dL 胶体壳聚糖，酶添加量 10 U/mL 条件下，反应 15 min 壳聚糖水解率便达到 92.5%，表明重组 CsnBh46 适用于壳寡糖的酶法制备，为 CsnBh46 下一步产业化应用奠定基础。

参考文献：

[1] KACZMAREK M B,STRUSZCZYK-SWITA K,LI X K,et al. Enzymatic modifications of chitin,chitosan,and chitooligosaccharides[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**,2019,7:1-26.

[2] YUAN X B,ZHENG J P,JIAO S M,et al. A review on the preparation of chitosan oligosaccharides and application to human health,animal husbandry and agricultural production[J]. **Carbohydrate Polymers**,2019,220:60-70.

[3] XUE B,WANG Y H,TIAN J L,et al. Effects of chitooligosaccharide-functionalized graphene oxide on stability,simulated digestion,and antioxidant activity of blueberry anthocyanins[J]. **Food Chemistry**,2022,368:1-10.

[4] HAO W T,LI K C,LI P C. Review:advances in preparation of chitooligosaccharides with heterogeneous sequences and their bioactivity[J]. **Carbohydrate Polymers**,2021,252:1-11.
[5] SINHA S,CHAND S,TRIPATHI P. Recent progress in chitosanase production of monomer-free chitooligosaccharides:bioprocess strategies and future applications[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2016,180(5):883-899.
[6] THADATHIL N,VELAPPAN S P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications:a review [J]. **Food Chemistry**,2014,150:392-399.
[7] VIENS P,LACOMBE-HARVEY M È,BRZEZINSKI R. Chitosanases from family 46 of glycoside hydrolases:from proteins to phenotypes[J]. **Marine Drugs**,2015,13(11):6566-6587.
[8] 王建荣,祝木金,王平,等. 萎缩芽孢杆菌Rk1 壳聚糖酶高效制备及特性表征[J]. 食品与发酵工业,2023,49(3):22-30.
WANG J R, ZHU M J,WANG P, et al. High-level expression and biochemical properties of a chitosanase from *Bacillus atrophaeus* Rk1[J]. **Food and Fermentation Industries**,2023,49(3): 22-30. (in Chinese)
[9] ZHANG R X,WU W Z,ZHANG S J,et al. Gene cloning and molecular characterization of a thermostable chitosanase from *Bacillus cereus* TY24[J]. **BMC Biotechnology**,2022,22:1-12.
[10] WANG J R,LI X M,CHEN H,et al. Heterologous expression and characterization of a high-efficiency chitosanase from *Bacillus mojavensis* SY1 suitable for production of chitosan oligosaccharides[J]. **Frontiers in Microbiology**,2021,12:1-12.
[11] LUO S,QIN Z,CHEN Q M,et al. High level production of a *Bacillus amlyoliquefaciens* chitosanase in *Pichia pastoris* suitable for chitooligosaccharides preparation[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,149:1034-1041.
[12] LI Y B,GOU Y,LIU Z C,et al. Structure-based rational design of chitosanase CsnMY002 for high yields of chitobiose [J]. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,2021,202:11692.
[13] 王建荣,刘丹妮,夏雨,等. 优化密码子及诱导温度提高雪白根霉脂肪酶在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与发酵工业,2017,43(1):18-23.
WANG J R,LIU D N,XIA Y,et al. Enhanced production of *Rhizopus niveus* lipase in *Pichia pastoris* by codon and fermentation optimization[J]. **Food and Fermentation Industries**,2017,43(1):18-23. (in Chinese)
[14] GUO N,SUN J N,WANG W,et al. Cloning,expression and characterization of a novel chitosanase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414[J]. **Food Chemistry**,2019,286:696-702.
[15] QIN Z,LUO S,LI Y,et al. Biochemical properties of a novel chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its use in membrane reactor[J]. **LWT–Food Science and Technology**,2018,97:9-16.
[16] ZHOU J L,LIU X B,YUAN F,et al. Biocatalysis of heterogenously-expressed chitosanase for the preparation of desirable chitosan oligosaccharides applied against phytopathogenic fungi[J]. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**,2020,8(12):4781-4791.
[17] DING M,ZHANG T,SUN C,et al. A Chitosanase mutant from *Streptomyces* sp. N174 prefers to produce functional chitopentasaccharide[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,151:1091-1098.
[18] CUI D D,YANG J,LU B S,et al. Efficient preparation of chitooligosaccharide with a potential chitosanase Csn-SH and its application for fungi disease protection[J]. **Frontiers in Microbiology**,2021,12:1-12.
[19] QIN Z,CHEN Q M,LIN S,et al. Expression and characterization of a novel cold-adapted chitosanase suitable for chitooligosaccharides controllable preparation[J]. **Food Chemistry**,2018,253:139-147.
[20] JIANG Z Q,MA S A,GUAN L Y,et al. Biochemical characterization of a novel bifunctional chitosanase from *Paenibacillus barengoltzii* for chitooligosaccharide production[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2021,37(5):1-13.
[21] CABRERA J C,VAN CUTSEM P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2005,25(2):165-172.
[22] LEE D X,XIA W S,ZHANG J L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase[J]. **Food Chemistry**,2008,111(2):291-295.
[23] LIN H,WANG H Y,XUE C H,et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2002,31(5):588-592.
[24] TEGL G,ÖHLKNECHT C,VIELNASCHER R,et al. Commercial cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* enable a large-scale production of chito-oligosaccharides[J]. **Pure and Applied Chemistry**,2016,88(9):865-872.