

重组枯草芽孢杆菌壳聚糖酶的纯化和性质研究

张舒平¹ 周鹏¹ 苏春元¹ 江正强^{1*} 闫巧娟²

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 中国农业大学 工学院,北京 100083)

摘要 研究嗜热枯草芽孢杆菌壳聚糖酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及其重组酶的纯化和性质。该基因序列全长 723 bp,编码 240 个氨基酸。根据基因同源性分析,该壳聚糖酶与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的壳聚糖酶前体基因的同源性最高,为 98%。粗酶液经 Ni-IDA 亲和层析得到电泳级纯酶,比活力高达 1 051.8 U/mg。经测定,该酶反应最适温度为 45 °C,最适 pH 为 6.0,在 40 °C 和 pH 4.5~8.0 下稳定。该酶为内切壳聚糖酶,能够高效降解壳聚糖,生成一系列的壳寡糖,在壳寡糖的制备生产方面具有广阔的应用前景。

关键词 枯草芽孢杆菌; 壳聚糖酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号 TS 201.3

文章编号 1007-4333(2012)01-0125-07

文献标志码 A

Purification and characterization of a recombinant chitosanase from *Bacillus subtilis*

ZHANG Shu-ping¹, ZHOU Peng¹, SU Chun-yuan¹, JIANG Zheng-qiang^{1*}, YAN Qiao-juan²

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract A chitosanase gene from thermophilic *Bacillus subtilis* WY34 was cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant chitosanase was purified and characterized. The chitosanase gene consisted of 723 bp and encodes a polypeptide of 240 amino acids residues. Homology analysis of gene sequences showed that the enzyme shared 98% identity with the chitosanase gene from *Bacillus subtilis* 168. Crude enzyme was purified to homogeneity by Ni-IDA affinity chromatography. The specific activity of the purified chitosanase was up to 1 051.8 U/mg. The optimal pH and temperature for the purified chitosanase were 6.0 and 45 °C, respectively. The enzyme was stable below 40 °C and from pH 4.5 to 8.0. The chitosanase showed excellent hydrolysis ability towards chitosan and produced a mixture of chitobiose, chitotetraose and some chitooligosaccharides with a longer chain length. These results indicated that the enzyme was an endo-type chitosanase and might be a good candidate for biotechnological application to produce chitooligosaccharides.

Key words *Bacillus subtilis*; chitosanase; purification; enzyme characterization

壳聚糖是甲壳素部分或完全脱乙酰基的衍生物,主要由 D-氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接形成,因其分子质量大以及氨基的存在,导致分子间具有较强的氢键作用,而不溶于水,影响了其应用。壳寡糖(chito-oligosaccharide)是壳聚糖降解生成的低

聚合度水溶性的糖类,具有强化免疫、抑制癌细胞、调节生理机能、促进植物生长等功效,在医药、保健、食品、化工、农业等领域具有广泛的应用前景^[1]。酶法降解壳聚糖具有降解过程容易控制、反应条件温和以及对环境无污染等优点,是生产壳寡糖的首选

收稿日期: 2011-07-09

基金项目: “863”计划课题(2011AA100905); 新世纪优秀人才支持计划课题(NCET-08-0534)

第一作者: 张舒平,硕士研究生, E-mail: zsplucky22@163.com

通讯作者: 江正强,教授,主要从事食品酶工程研究, E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

方法^[2]。壳聚糖酶(Chitosanase, EC 3. 2. 1. 132)为20世纪70年代发现的一种专一降解壳聚糖的水解酶,能催化水解壳聚糖中 β -1,4糖苷键,得到聚合度低至2~7的水溶性壳寡糖。壳聚糖酶主要存在于真菌、细菌和放线菌中,在单子叶和双子叶植物的不同组织中,也发现有壳聚糖酶的活性。由于微生物生长快速,代谢效率高,微生物发酵成为壳聚糖酶工业化生产的主要方式。近些年来,对壳聚糖酶的研究主要集中在产酶菌株的筛选上^[3-4],但野生型产酶菌株筛选工作复杂、多数菌株产酶效率较低,难以满足大规模工业化应用的要求。利用大肠杆菌等表达系统进行基因表达能够提高产酶效率,以满足研究和应用的需要。

自 Denis 等^[5]成功构建了 *Streptomyces lividans* TK-24 壳聚糖酶表达系统之后,已陆续有细菌和真菌的壳聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中获得表达。2000年 Rivas 等^[6]将 *Bacillus subtilis* 168 中的壳聚糖酶基因进行克隆后又在该菌株中实现高效表达,酶的比活力达到 56.9 U/mg。2010年 Lin 等^[7]克隆了枯草芽孢杆菌 NCHU-05 的壳聚糖酶基因,并分别在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中获得重组壳聚糖酶,酶的比活力分别达到 3 655 和 3 780 U/mg,这是目前报道的最高水平。国内关于壳聚糖酶基因克隆和表达的研究起步较晚。2005年梁东春等^[8]利用 GenBank 中发布的序列将烟曲霉壳聚糖酶基因在大肠杆菌中进行表达,获得一定效果,但由于采用的是溶合表达所以纯酶的分离比较困难。2007年马镒等^[9]首次对巨大芽孢杆菌 BS-0409 壳聚糖酶基因进行了克隆与序列分析,但并未进行基因表达的研究。徐瑞等^[10]克隆了一株革兰氏阳性杆菌的壳聚糖酶基因, Liu 等^[11]将其在大肠杆菌中表达得到了重组的壳聚糖酶,将酶活力提高至 140 U/mL,酶的比活力为 280 U/mg。阳丽等^[12]通过电击转化毕赤酵母 GS115,筛选 Mut⁺转化子和多克隆子,利用甲醇诱导,实现烟曲霉壳聚糖酶在毕赤酵母中的表达,但酶活力只能达到 14.59 U/mL。可以看出,在壳聚糖酶基因的克隆和表达方面,国内研究还较少,并且在产酶效率和比活力上还有待提高,存在较大的研究空间。

为进一步提高产酶效率,获得水解能力强的壳聚糖酶,本研究拟将来源于嗜热枯草芽孢杆菌的壳聚糖酶基因进行克隆,并在大肠杆菌中表达,以期获

得高比活力的重组壳聚糖酶,并对其酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III、Ex-taq 酶、T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒、*E. coli* BL21(DE3)感受态购自博迈德生物技术公司;pET-30a(+)本实验室保存。几丁质、羧甲基纤维素购自美国 Sigma,乙二醇壳聚糖、乙二醇几丁质购自日本 Wako;壳聚糖(脱乙酰度大于 85%,国产分析纯);其他试剂若无特殊说明均为分析纯。PCR 自动扩增仪 MyCycler,美国 BIO-RAD;TU-1800PC 紫外可见分光光度计,北京普析通用;蛋白纯化系统,上海青浦沪西仪器厂;硅胶板 60F₂₅₄,德国 E. Merck。

质量浓度为 5 g/L 壳聚糖溶液的制备:取 0.5 g 壳聚糖于 20 mL 蒸馏水中,边搅拌边加入 1 mol/L 的乙酸直至壳聚糖完全溶解。再用 1 mol/L 的乙酸钠溶液调节 pH 至 5.0,并用乙酸-乙酸钠缓冲液定容至 100 mL^[13]。

1.2 菌株及其培养和基因组 DNA 的提取

枯草芽孢杆菌 WY34,为本实验室筛选并保存。培养方法:于 Luria Broth(LB)培养基中,50 °C 振荡培养过夜。基因组 DNA 的提取方法参考张敏等^[14]的方法。

1.3 壳聚糖酶基因的克隆

根据枯草芽孢杆菌壳聚糖酶基因序列和表达载体 pET-30a(+)的多克隆位点设计正向引物 P1:5'-AAGCTTCATATGGGACTGAATAAAGATCAAAGC-3'(下划线处为 *Nde* I 酶切位点);反向引物 P2:5'-AAGCTTCTCGAGTTTGATTACAAAATTACCGTAC-3'(下划线处为 *Hind* III 酶切位点)。以 WY34 基因组 DNA 为模板,PCR 反应程序为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收,用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切。同时将 pET-30a(+)载体酶切,用 T4 DNA 连接酶将已双酶切的 pET-30a(+)和 PCR 产物 16 °C 连接。将连接产物转化到大肠杆菌 BL21(DE3),涂布在 LB 平板上,37 °C 培养过夜。菌落 PCR 筛选多个转化子送往上海生工(北京公司)进行测序。

1.4 重组蛋白的诱导表达

挑取阳性转化子于 10 mL LB(含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 15 h,以 10% 的接种量转接到 100 mL 相同培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。当培养液 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入乳糖诱导,至乳糖终质量浓度为 10 g/L。30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 12 h 后,离心收集细胞。用 5 mL 50 mmol/L pH 7.9 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含 20 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl)悬浮细胞。超声波破碎细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 9 720g 离心 15 min,收集上清液备用。

1.5 酶活力和蛋白质质量浓度的测定及 SDS-PAGE

壳聚糖酶酶活力测定参考段妍等^[15]的方法,并稍加改动。取 0.9 mL 底物(质量浓度 5 g/L 的壳聚糖溶液)于试管中预热 3 min,准确加入 0.1 mL 酶液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后,加入 1.0 mL DNS 终止反应,沸水煮 10 min 显色。冷却后,9 720g 离心 5 min,取上清在 540 nm 下测定吸光值。1 个酶活力单位(U)定义为,在上述条件下,1 min 催化生成相当于 1 μmol 氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量。所有测定均经过 3 次平行试验。

蛋白质质量浓度测定参照 Lowry 法^[16],以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法^[17],标准蛋白与样品在同一条件下电泳。

1.6 重组壳聚糖酶的纯化

Ni-IDA agarose (1 cm \times 5 cm) 用平衡缓冲液(20 mmol/L pH 7.9 的 Tris-HCl 缓冲液,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)平衡后,将粗酶液以 1 mL/min 的速度上样。上样后封柱 30 min;然后用平衡缓冲液以相同速度洗去未吸附蛋白及其他杂质,至 OD_{280} 小于 0.05。然后用 50 mmol/L 的咪唑缓冲液以相同的速度洗至基线,再用 200 mmol/L 的咪唑缓冲液以相同的速度洗脱,测定 OD_{280} ,收集目标蛋白,并且用 SDS-PAGE 检测。

1.7 壳聚糖酶分子质量的测定

分别采用 SDS-PAGE 和凝胶过滤 2 种方法测定壳聚糖酶的分子质量。

SDS-PAGE 法:采用 12.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE,计算纯酶样品与标准蛋白在相同条件下的电泳图所得相对迁移率 R_f 与分子质量的对数 $\lg M_r$ 间的关系。以 $\lg M_r$ 为纵坐标, R_f 为横坐标作图,建立回归方程,得到二者的关系。根据样品的相对迁移率计算出分子质量。

凝胶过滤法:将纯酶样品和标准蛋白以相同的条件过 Superdex 75 凝胶柱,计算保留体积和分子质量的对数 $\lg M_r$ 之间的关系。以 $\lg M_r$ 为纵坐标,保留体积为横坐标作图,建立回归方程。根据样品的保留体积计算出其分子质量。凝胶柱条件:流速 0.33 mL/min,20 mmol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH 6.0),标准蛋白质量浓度为 5 mg/mL,上样量 200 μL 。所用标准蛋白分别为牛血清白蛋白(68.0 ku)、卵清蛋白(45.0 ku)、胰凝乳蛋白酶原 A(25.7 ku)和细胞色素 C(12.3 ku)。

1.8 重组壳聚糖酶的性质

1.8.1 重组壳聚糖酶最适反应 pH 和 pH 稳定性

最适 pH 在 2 种 pH 缓冲溶液下测定,即乙酸-乙酸钠(pH 4.5~6.0)和 MES(pH 5.5~7.0)。用以上 2 种缓冲溶液配制质量浓度 5 g/L 的壳聚糖底物,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下测定酶活力。pH 稳定性的测定在 4 种 pH 缓冲溶液中进行,即柠檬酸-柠檬酸三钠(pH 3.0~6.5)、乙酸-乙酸钠(pH 4.0~6.0)、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠(pH 6.0~8.0)和 CHES(pH 8.0~10.0)。用以上缓冲溶液将酶液稀释适当倍数后,40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,冰水浴冷却 30 min 后,再用最适缓冲溶液稀释适当倍数,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下测定残余酶活力,以未处理的酶液为对照。

1.8.2 重组壳聚糖酶最适反应温度和温度稳定性

将酶液以 pH 6.0 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液稀释适当倍数后,在不同温度下测定酶活力。温度稳定性:将酶液分别在 20~70 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min,冰水浴冷却 30 min 后,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下测定残余酶活力,以未保温(稀释相同倍数后,4 $^{\circ}\text{C}$ 存放)的酶活力作为 100%。

1.8.3 金属离子和化合物对重组壳聚糖酶酶活力的影响

将溶于 100 mmol/L 乙酸-乙酸钠(pH 6.0)缓冲溶液的 1 mmol/L 各种化学试剂与纯酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 30 min,立即冰水浴冷却 30 min,以只加入相同浓度的相应金属离子的缓冲溶液为空白,按照标准方法测定残余酶活力。以不加任何离子时的酶活力为 100%,计算相对酶活力。

1.8.4 重组壳聚糖酶的底物特异性和水解特性

分别配制质量浓度 5 g/L 的壳聚糖溶液、羧化壳聚糖、乙二醇壳聚糖、胶体几丁质、乙二醇几丁质和羧甲基纤维素作为反应底物,按照标准方法测定酶活力,考察壳聚糖酶的底物特异性。

以质量浓度 5 g/L 的壳聚糖溶液 (pH 6.0) 作为水解底物, 考察重组壳聚糖酶的水解特性。1 mL 底物中加入 5 U 的重组壳聚糖酶, 置于 40 °C 下反应, 在不同的时间间隔分别取样 (0.5、1、2、4 和 8 h), 薄层层析法 (TLC) 分析水解产物。展层剂为 V (异丙醇):V(水):V(氨水)=70:30:1, 展层 2 次, 然后用 99% 乙醇配制的 0.1% 的水合茚三酮溶液喷洒, 吹干后, 150 °C 加热 15 min 显色。

2 结果与讨论

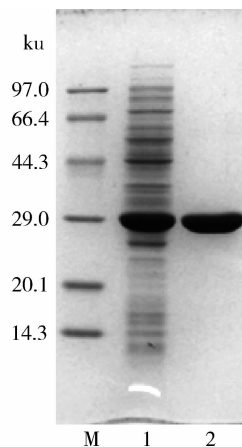
2.1 壳聚糖酶基因的克隆及表达

利用引物 P1 和 P2 从枯草芽孢杆菌 WY34 基因组中扩增到与壳聚糖酶基因大小一致大约 750 bp 的序列, 经测序基因片段长度为 723 bp, 编码氨基酸 240 个氨基酸, 预测分子质量为 27 ku。

在 NCBI 数据库中进行基因同源性分析, 该壳聚糖酶基因与 *Bacillus subtilis* 168 的壳聚糖酶前体基因的同源性最高, 为 98%, 共有 12 处不同。氨基酸同源性分析发现, 该壳聚糖酶与已经公布的 *Bacillus subtilis* 168 (ZP_03592470) 壳聚糖酶十分相近, 与枯草芽孢杆菌 (ACX55932)、枯草芽孢杆菌 BSn5 (ADV93459) 的壳聚糖酶基因分别有 2 个和 3 个氨基酸的不同。这说明壳聚糖酶在不同枯草芽孢杆菌菌株中相对比较保守。但是 WY34 壳聚糖酶与已知的其他芽孢杆菌属的同源性相对较低, 与 *Bacillus amyloliquefaciens* (BAB19276)、*Bacillus* sp. DAU101 (ABC66094)、*Bacillus atrophaeus* 1942 (ADP32304)、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 (YP_003921992)、*Bacillus amyloliquefaciens* (ABG76783)、*Bacillus* sp. KFB-CO4 (AAF24188) 的同源性分别为 91%、91%、91%、90%、89%、77%。

2.2 重组壳聚糖酶的纯化

粗酶液经一步 Ni-IDA 亲和层析, 得到电泳纯的壳聚糖酶 (图 1)。纯化过程中目标蛋白的回收率及纯化倍数见表 1, 酶活力回收率为 50.6%, 酶的比活力由 164.3 U/mg 提高到了 1 051.8 U/mg, 纯化倍数为 6.4。SDS-PAGE 法测定的重组壳聚糖酶分子质量为 32.0 ku, 凝胶过滤法测得壳聚糖酶的分子质量为 31.0 ku。该壳聚糖酶在 2 种方法下测得的分子量结果相近, 说明该酶蛋白为单亚基蛋白。



M, 标准蛋白; 1, 粗酶液; 2, 纯酶。

图 1 重组壳聚糖酶纯化过程图

Fig. 1 SDS-PAGE of the recombinant chitinase purification

表 1 重组壳聚糖酶的纯化表

Table 1 Summary of the recombinant chitinase purification

纯化步骤	总酶活 力/U	总蛋白/ mg	比活力/ (U/mg)	回收 率/%	纯化 倍数
粗酶液	93 130	566.8	164.3	100	1
Ni-IDA 亲和层析	47 124	44.8	1 051.8	50.6	6.4

该重组壳聚糖酶表现出了较高的比活力, 仅次于利用大肠杆菌中表达系统获得的枯草芽孢杆菌壳聚糖酶 (3 655 U/mg)^[7] 和烟曲霉菌壳聚糖酶 (3 200 U/mg)^[8], 高于重组革兰氏阳性杆菌壳聚糖酶 (280 U/mg)^[10] 和重组腐皮镰孢菌壳聚糖酶 (2.5 U/mg)^[18], 远高于与该壳聚糖酶氨基酸同源性最高的 *Bacillus subtilis* 168 壳聚糖酶 (56.9 U/mg)^[6]。因此, 本研究中的壳聚糖酶在壳聚糖水解方面具有一定的优势。

2.3 重组壳聚糖酶的酶学性质

2.3.1 重组壳聚糖酶的最适 pH 和 pH 稳定性

重组壳聚糖酶的最适反应 pH 为 6.0 (乙酸-乙酸钠缓冲溶液), pH 5.5~6.5 时, 该酶均有较高的酶活力; 当 pH > 6.5 时, 酶活力迅速降低 (图 2(a))。当在 pH 4.5~8.0 保温 30 min 后酶活力能保存在 80% 以上 (图 2(b))。目前, 有关枯草芽孢杆菌产壳聚糖酶的报道, 最适反应 pH 为 4.5~6.5, 少数为弱碱性 (7.5~8.0)^[19]。该重组壳聚糖酶的

最适 pH 为 6.0, 与 *Bacillus cereus* D-11 的壳聚糖酶相同^[20]。与 *Microbacterium* sp. OU01^[21] 等壳聚

糖酶相比(pH 5.2~7.8), 该酶在较宽的 pH 范围内稳定(pH 4.5~8.0)。

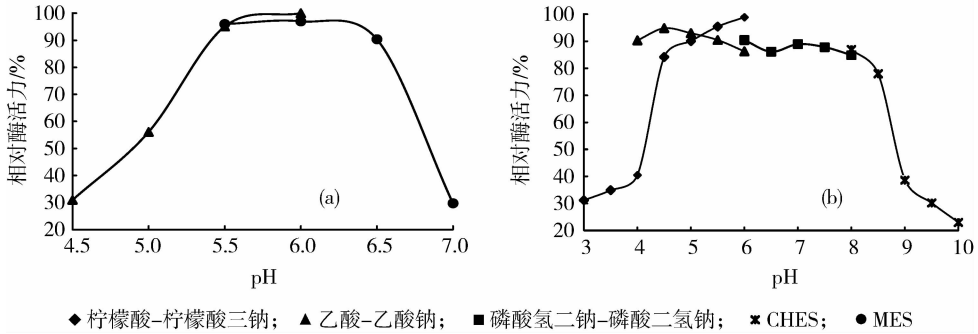


图 2 重组壳聚糖酶的最适 pH(a) 和 pH 稳定性(b)
Fig. 2 Optimal pH (a) and pH stability (b) of the recombinant chitosanase

2.3.2 重组壳聚糖酶的最适温度和温度稳定性

温度对酶活力的影响见图 3。该酶最适反应温度为 45 °C(图 3(a)), 在 40 °C 下保温 30 min 时, 残余酶活力仍保留 80% 以上(图 3(b))。枯草芽孢杆

菌产壳聚糖酶的最适反应温度一般为 40~60 °C^[19]。该酶的最适反应温度与来自枯草芽孢杆菌 IMR-NK1 的壳聚糖酶相同^[19], 高于枯草芽孢杆菌 TKU007 的壳聚糖酶(37 °C)^[22]。

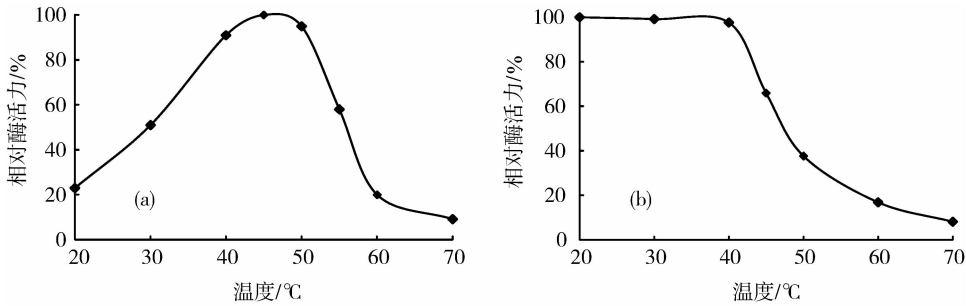


图 3 重组壳聚糖酶的最适温度(a) 和温度稳定性(b)
Fig. 3 Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of the recombinant chitosanase

2.3.3 金属离子和化合物对重组壳聚糖酶酶活力的影响

各种金属离子和化合物对该壳聚糖酶酶活力的影响如表 2 所示。SDS 和 EDTA 对酶活力稍有促进作用, 而 Hg²⁺、Cu²⁺、Ag⁺ 强烈抑制壳聚糖酶的酶活力, Fe³⁺、Ni²⁺ 对酶活力均有不同程度的抑制, 其他离子对酶活力则没有显著影响。来自枯草芽孢杆菌 IMR-NK1 和 TKU007 的壳聚糖酶也有类似的性质^[19, 22]。从以往报道看, 不同微生物壳聚糖酶的酶活力都会不同程度地受到重金属离子的影响。

2.3.4 重组壳聚糖酶的底物特异性和水解特性

该壳聚糖酶对壳聚糖的水解能力很强, 对乙二醇壳聚糖和羧化壳聚糖也有水解作用, 但能力较弱(表 3)。而对胶体几丁质、乙二醇几丁质和羧甲基纤维素则没有水解能力, 说明该壳聚糖酶有较强的底物专一性。大多数微生物壳聚糖酶都专一水解壳聚糖, 但某些壳聚糖酶对羧甲基纤维素和胶体几丁质也具有一定的水解能力^[19]。该重组壳聚糖酶专一水解壳聚糖, 并且表现出很高的水解能力(1 051.18 U/mg), 这为其工业化应用提供了可能。

表2 金属离子和化合物对重组壳聚糖酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions and reagents on the activity of recombinant chitosanase

金属离子和化合物	比活力/(U/mg)	相对酶活力/%	金属离子和化合物	比活力/(U/mg)	相对酶活力/%	金属离子和化合物	比活力/(U/mg)	相对酶活力/%
Control	1 051.8	100	Zn ²⁺	1 024.5	97.4	Li ⁺	1 038.1	98.7
Fe ³⁺	587.9	55.9	Cu ²⁺	110.4	10.5	K ⁺	1 013.9	96.4
Sr ²⁺	1 105.4	105.1	Mg ²⁺	1 032.9	98.2	Na ⁺	1 039.2	98.8
Ca ²⁺	1 002.4	95.3	Mn ²⁺	995.0	94.6	EDTA	1 102.3	104.8
Hg ²⁺	100.9	9.6	Fe ²⁺	924.5	87.9	SDS	1 215.8	115.6
Ni ²⁺	560.6	53.3	Ag ⁺	120.9	11.5			

表3 重组壳聚糖酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of the recombinant chitosanase

底物种类	比活力/(U/mg)	相对酶活力/%
壳聚糖	1 051.18	100
乙二醇壳聚糖	18.1	1.78
羧化壳聚糖	13.8	1.36
胶体几丁质	0	0
乙二醇几丁质	0	0
羧甲基纤维素	0	0

该重组壳聚糖酶水解壳聚糖主要产物为壳二糖、壳三糖和壳四糖及少量的壳五糖(图4)。在反应初期即有壳寡糖的产生,随着水解时间的延长,寡糖量逐渐增加,同时并没有检测到单糖的生成。此

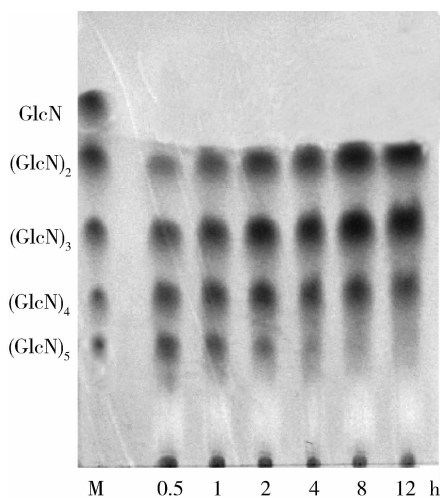


图4 壳聚糖水解产物 TLC 分析

Fig. 4 TLC analysis of chitosan hydrolysates

水解特性说明该酶能够以内切的方式高效水解壳聚糖,为内切壳聚糖酶。该酶对壳聚糖高效的水解能力及其内切水解特性,使其在壳寡糖的制备中有较大的优势。

3 结论

本研究克隆了嗜热枯草芽孢杆菌的壳聚糖酶基因,并成功在大肠杆菌中表达,获得了高比活力的重组壳聚糖酶。通过对其酶学性质的考察发现,该酶的最适反应 pH 为 6.0,在 40 °C 下保持稳定。纯酶的比活力达到 1 051.18 U/mg,在弱酸性条件下能够高效降解壳聚糖,在壳寡糖的制备上具备较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 屠洁,张荣华. 壳聚糖酶的研究进展与应用现状[J]. 江苏农业科学,2009(3):403-406
- [2] 韩永萍,林强. 壳聚糖降解制备低聚壳聚糖和壳寡糖的研究进展[J]. 食品科技,2006,31(7):35-38
- [3] 涂绍勇,杨爱华,吴柏春,等. 产壳聚糖酶菌株的筛选及其发酵产酶条件的研究[J]. 化学与生物工程,2009,26(9):52-55
- [4] 吴楠,祖国仁,孙浩,等. 响应面优化壳聚糖酶产生菌培养基组分研究[J]. 中国酿造,2010(12):94-97
- [5] Denis F, Brzezinski R A. An improved aminoglycoside resistance gene cassette for use in gram-negative bacteria and streptomyces [J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 81: 261-264
- [6] Rivas L A, Parro V, Mercedes M P, et al. The *Bacillus subtilis* 168 csn gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme[J]. Microbiology, 2000, 146: 2929-2936
- [7] Lin J S, Chen C, Hu H Y. Homologous and heterologous expression of chitosanase gene from *Bacillus subtilis* NCHU-05[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150s: 354

- [8] 梁东春,左爱军,郭刚,等. 烟曲霉菌壳聚糖酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报,2005,45(4):539-543
- [9] 马镛,赵秀香,吴元华. 壳聚糖酶基因的克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报,2008,16(4):727-728
- [10] 徐瑞,郭占云,戚正武. 壳聚糖酶的纯化、基因克隆、及其酶学特性的鉴定[J]. 药物生物技术,2008,15(2):94-99
- [11] Liu Y L, Jiang S, Ke Z M, et al. Recombinant expression of a chitosanase and its application in chitosan oligosaccharide production[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 815-819
- [12] 阳丽,杨萍,王曼莹. 烟曲霉壳聚糖酶在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国酿造,2010,(10):133-135
- [13] Choi Y J, Kim E J, Piao Z, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 4522-4531
- [14] 张敏,江正强,唐萃,等. 海栖热胞菌耐高温 β -半乳糖苷酶基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报,2008,35(4):1-5
- [15] 段妍,韩宝芹,董文,等. 产壳聚糖酶菌株发酵条件优化及壳聚糖酶的分离纯化研究[J]. 海洋科学,2009,33(1):1-7
- [16] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275
- [17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [18] 刘怀伟,鲍晓明. 腐皮镰孢菌壳聚糖酶的酶学性质研究及其在酿酒酵母工业菌株中的表达[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1607-1612
- [19] Chiang C L, Chang C T, Sung H Y. Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32: 260-267
- [20] Gao X A, Ju W T, Jung W J, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11 [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72: 513-520
- [21] Sun Y Y, Liu W S, Han B Q, et al. Purification and characterization of two types of chitosanase from a *Microbacterium* sp. [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28: 1393-1399
- [22] Wang S L, Yeh P Y. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain *Bacillus subtilis* TKU007 [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 132-138

责任编辑：刘迎春