

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17129

枯草芽孢杆菌壳聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质

杨光^{1,2}, 盛军¹, 陈亚东³, 沙珍霞³

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 青岛大学 生命科学学院, 山东 青岛 266071

摘要: 构建了枯草芽孢杆菌 CH2 菌株(*Bacillus subtilis* CH2)壳聚糖酶基因的真核表达载体 pPIC9K-CH2-Cns, 在毕赤酵母 GS115(*Pichia pastoris*)中进行重组表达, 获得了有生物学活性的重组壳聚糖酶, 对重组壳聚糖酶的酶学特性及酶解产物进行了分析。结果显示, 重组壳聚糖酶的分子量为 29 kD, 粗酶的比酶活达到 133.60 U/mg, 纯化后重组蛋白的比酶活为 338.08 U/mg; 该酶的最适作用温度为 50℃, 最适 pH 为 4.5, 酶动力学常数 $V_{\max}=24.39$ ($\mu\text{mol}/\text{mg})\cdot\text{min}^{-1}$, $K_m=5.48$ mg/mL; Fe^{2+} 、 K^{+} 等对其酶活力有一定的激活作用, 其中 Mn^{2+} 能使酶活力提升 2.4 倍, Ag^{+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、EDTA、EGTA 和 SDS 等存在时则对其酶活力有强烈抑制作用。利用重组壳聚糖酶酶解壳聚糖, 酶解产物主要为聚合度 2~10 的壳寡糖, 且分布均匀。以上结果表明, 枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶基因在毕赤酵母 GS115 中成功表达, 获得了一种内切型的高酶活力重组壳聚糖酶, 该重组酶具有反应条件温和、酶解产物均一等特点, 可被应用于海洋甲壳质加工应用中。

关键词: 壳聚糖酶; 枯草芽孢杆菌 CH2 菌株; 壳寡糖; 毕赤酵母; 酶学性质

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1288-10

自 20 世纪 70 年代发现壳聚糖酶(chitosanase, Csn)以来^[1], 壳聚糖酶已逐步成为海洋活性壳寡糖制备的首选^[2-5]。目前, 对细菌、真菌、植物等壳聚糖酶的研究更多还是集中在对产壳聚糖酶微生物筛选和产酶条件优化上^[6-7]。壳聚糖酶虽是目前生产制备壳寡糖的理想酶制剂, 但是野生型产酶菌株来源有限, 对目标菌株的筛选工作量大、时间长, 而且野生菌不能稳定合成壳聚糖酶, 难以实现产业化生产。自然界中已发现的野生型壳聚糖酶微生物的产酶量小、酶活力低、纯酶不易分离^[8-11]。随着基因工程手段的成熟, 壳聚糖酶基因的分析、克隆、重组表达和改造以及蛋白质结构已成为重点研究领域^[12]。近 10 年来, 构建产壳聚糖酶基因工程菌的研究获得一定的研究成果, 但是研究表明, 原核表达的重组壳聚糖酶多以包

涵体形式表达, 重组壳聚糖酶生物酶活力低, 而且原核表达的背景蛋白过多, 重组壳聚糖酶分离纯化复杂, 这些缺点导致原核表达的壳聚糖酶无法实现大规模的工业化生产^[13-16]。

毕赤酵母表达系统是近几十年来迅速发展起来的新型外源蛋白表达系统, 可实现外源蛋白的高效分泌表达, 并对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰, 确保表达出的蛋白具有生物活性^[17]。毕赤酵母是公认的安全菌, 重组蛋白不存在潜在危害^[18]。为此, 本研究以枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶基因为插入片段, 构建分泌型表达载体 pPIC9K-CH2-Cns, 以实现该基因在毕赤酵母 GS115 中重组表达及重组壳聚糖酶的分离纯化, 并对重组壳聚糖酶的酶学性质进行研究, 旨在为该酶在壳寡糖生产中的应用奠定理论基础。

收稿日期: 2017-01-20; 修订日期: 2017-06-15.

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2014A03XK01, 2014C04XK01); 青岛大学引进人才科研启动费资助项目.

作者简介: 杨光(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物生物活性物质和鱼类免疫基因功能的研究. E-mail: 1291527562@qq.com

通信作者: 沙珍霞, 女, 研究员, 主要从事水产生物技术研究. E-mail: shazhenxia@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

毕赤酵母 GS115 和表达载体 pPIC9K 为本实验室所保存; TOP10 感受态细胞购自北京全式金公司。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖酶基因合成和重组质粒 pPIC9K-CH2-Csn 的构建 根据 GenBank 所发布的枯草芽孢杆菌 CH2 菌株的壳聚糖酶基因序列(accession no.: GU001716)提交到上海生工生物有限公司进

行基因合成并测序验证。根据该基因序列设计实验所需的不同引物(表 1)。以枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶基因为模板, 采用酶切引物 5' ECsn、3' ECsn 进行 PCR 扩增(表 1)。回收纯化 PCR 产物作为插入基因片段, 构建重组载体 pPIC9K-CH2-Csn, 并导入 TOP10 感受态细胞中孵育 1 h 后, 均匀涂布在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终质量浓度的氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜, 次日挑取阳性单克隆, 分别送至金唯智生物科技有限公司和上海生工生物有限公司进行测序; 选取测序正确后的菌株提取质粒备用。

表 1 枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶基因真核表达所用引物
Tab. 1 The primers used for eukaryotic expression of Chitosanase gene from *Bacillus subtilis* CH2

引物名称 primer	引物物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	用途 application
5' ECsn	CCGGAATT <u>CG</u> CGGGACTGAATAAAGATCAAAAAC (划线出为 <i>EcoR</i> I 的酶切位点)	真核表达
3' ECsn	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTTGATTACAAAATTACCGTACTCG (划线处为 <i>Not</i> I 的酶切位点)	eukaryotic expression
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	高拷贝转化子筛选
3' AOX1	GCAATGGCATTCTGACATCC	screening of multiple inserts

1.2.2 毕赤酵母 GS115 的转化 将-80℃保存的 GS115 菌株接种到液体 YPD 培养基(上海, 生工生物技术有限公司)中进行活化, 用山梨醇(上海生工生物技术有限公司)制备成感受态细胞备用; 重组质粒用 *Sal* I(大连, TaKaRa)酶切线性化, 胶回收目的片段; 鲑鱼精 DNA(大连, TaKaRa)煮沸 5 min 迅速置于冰上备用; 将上述制备的液体分别加入到预冷 0.2 cm 的电转杯(美国, Bio-Rad)中, 混匀后置于冰上 10 min, 然后在电转仪(美国, Bio-Rad)中进行电击(电击条件: 1500 V, 5 ms), 立即取 1 mol/L 山梨醇 500 μ L 加入到电转杯中, 吸取 200 μ L 涂布在 MD 平板上 30℃培养 3~5 d, 直至长出清晰的菌落。

1.2.3 重组酵母 GS115 阳性高拷贝转化子的筛选和鉴定

当 MD 平板上出现明显的单菌落时, 用灭菌牙签将菌落接种到 G418-YPD 平板上 30℃ 培养 2~3 d, G418(上海生工生物技术有限公司)浓度梯度筛选高拷贝转化子(G418 质量浓度分别为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL)。挑取能在 5 mg/mL G418-YPD 平板上长出来的单菌落, 扩大培养后, 用酵母基因组提取试剂盒(北

京天根生化科技有限公司)提取每个单菌落的基因组 DNA, 以酵母基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 5' AOX1 和 3' AOX1(表 1)进行 PCR 扩增, 鉴定 Mut⁺ (methanol utilization plus)或 Muts(methanol utilization slow)表型。

1.2.4 壳聚糖酶基因在重组酵母 GS115 中的诱导表达和鉴定

选取表型为 Mut⁺的单克隆接种于 25 mL BMGY 液体培养基的 250 mL 摇瓶中(上海生工生物技术有限公司)中, 30℃ 培养 20 h 至 OD₆₀₀ = 2~6, 离心收集菌体, 重悬菌体转移到 BMMY 液体培养基(上海生工生物技术有限公司)中, 28℃、280 r/min 的摇床上诱导 96 h, 每 24 h 向培养基中添加 100% 甲醇至终质量分数为 0.5%~1.0%, 发酵液离心后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.5 重组壳聚糖酶的纯化 将筛选并鉴定过的菌株 pPIC9K-CH2-Csn-GS115-3 转移到 100 mL BMMY 液体培养基中进行诱导, 发酵液在 4℃、6000 r/min 下离心 10 min, 收集上清, 上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜(美国, Millipore)过滤后进行蛋白纯化; 利用 AKTA-purifier 蛋白纯化系统(英国, GE Healthcare), 安装 5 mL 体积的镍柱后用超

纯水洗 15 个柱体积, 流速为 3 mL/min 进行预平衡, 然后用 pH 8.0 缓冲液 A 平衡(20 mmol/L tris-HCl, 10 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)镍柱 HisTrap FF crude(英国, GE Healthcare); 然后处理过的发酵液以 2 mL/次上柱, 先用缓冲液 B(20 mmol/L tris-HCl, 65 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)洗脱杂蛋白, 再用缓冲液 C(20 mmol/L tris-HCl, 300 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)洗脱目的蛋白; 洗脱液采用 SDS-PAGE 蛋白电泳进行检测。

1.2.6 重组壳聚糖酶酶活力的测定 用 DNS 法(参照 Shimosaka)等^[19]进行壳聚糖酶酶活力的测定。DNS 法简述如下: 取 100 μ L 粗酶液(可适当稀释)加入 900 μ L 壳聚糖溶液, 再加入 Ph 5.6 的 1000 μ L 的乙酸钠(上海生工生物技术有限公司)缓冲液混匀, 50℃保温 15 min, 1500 μ L DNS(上海生工生物技术有限公司)终止反应, 显色反应煮沸 5 min, 冷却后定容至 35 mL, 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 520 nm 条件下测定上清液的吸光值(OD 值)。根据氨基葡萄糖盐酸盐绘制的标准曲线计算反应液中的还原糖含量(灭活酶液为对照)。1 酶活力单位 U 定义为 1 min 释放 1 μ mol 还原糖所需壳聚糖酶的量。

1.2.7 重组壳聚糖酶的酶学性质

1) 重组壳聚糖酶的最适反应温度和温度稳定性

将纯化后质量浓度为 1.42 mg/mL 的重组壳聚糖酶酶液和壳聚糖混合后分别于 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃和 75℃条件下测定酶活力, 以确定重组壳聚糖酶最适反应温度; 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃和 75℃水浴 60 min 后, 测定剩余酶活力, 每组平行实验 3 次, 以最适温度下的酶活力为参照, 确定重组壳聚糖酶的温度稳定性。

2) 重组壳聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

将纯化后浓度为 1.42 mg/mL 的重组壳聚糖酶酶液和壳聚糖在 pH 2.5~8.0(0.5 为 1 个梯度)的缓冲液体系下混合后, 根据最适温度条件下测定的酶活力确定重组壳聚糖酶酶促反应最适 pH; 在 pH 为 4、5、6、7 缓冲液体系下 4℃孵育 60 min 测

定剩余酶活力, 每组平行实验 3 次, 以最适 pH 下的酶活力为参照, 确定重组壳聚糖酶 pH 稳定性。

3) 重组壳聚糖酶动力学常数 $V_{\max}$ 、 K_m 的测定

取 0.9 mL 底物浓度分别为 2.5 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL 壳聚糖溶液, 加入 0.1 mL 纯化后浓度为 1.42 mg/mL 的重组壳聚糖酶液, 在最适条件下反应 10 min, 用 DNS 法测定反应速度, 每组平行实验 3 次, 应用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算出酶动力学常数 $V_{\max}$ 和 K_m 。

4) 化合物对重组壳聚糖酶活力的影响

将纯化后的浓度为 1.42 mg/mL 的重组壳聚糖酶液与化合物 PMSF、IAc、EDTA、EGTA 和 SDS(上海生工生物技术有限公司)混合成化合物终浓度分别为 1 mmol/L 与 10 mmol/L 溶液, 4℃放置 60 min 后测定酶活力, 每组平行实验 3 次, 以等体积的去离子水的混合酶为对照测定酶活力, 根据剩余酶活力判断化合物对重组壳聚糖酶活力的影响。

5) 金属离子对重组壳聚糖酶活力的影响

将纯化后的浓度为 1.42 mg/mL 的重组壳聚糖酶液分别与 0.1 mol/L 金属离子 FeCl_2 、 KCl 、 MnCl_2 、 NaCl 、 LiCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 HgCl_2 、 CoCl_2 、 CrCl_3 、 FeCl_3 、 CuCl_2 、 AlCl_3 、 ZnCl_2 、 AgNO_3 和 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (上海生工生物技术有限公司)混合成金属离子终浓度为 1 mmol/L 混合液, 将混合液置于 4℃放置 60 min 后测定酶活力, 每组平行 3 次实验。对照组用等量的去离子水代替金属离子, 根据剩余酶活力判断金属离子对重组壳聚糖酶活力的影响。

6) 重组壳聚糖酶酶解产物的组分分析

通过薄层层析法分析酶解产物, 100 mL 10% 的壳聚糖中加入纯化后浓度为 351.58 U/mL 的重组壳聚糖酶液 3 mL, 最适条件下酶解 4 h, 离心后收集上清液。用微量毛细管吸取 1 μ L 酶解产物, 在距层析板下边缘 1 cm 的位置点样。点样斑点的直径以 2~3 mm 为最佳, 点与点之间的距离为 2 cm, 溶剂挥发干后即可用于层析。将点样后的薄层层析板置于展开剂饱和的层析缸中, 点样点勿浸入展开剂中, 待展开液前沿达到层析板上边沿, 从层析缸中取出层析板, 将溶剂挥发干, 再均匀的

喷上显色剂,然后将玻板置于 120℃烘箱中加热至斑点显色清晰为止。

将酶解产物的上清液去除变性析出的蛋白,然后用无水乙醇洗涤,静置 12 h 后离心,重复洗涤 3 次,获得的沉淀冷冻干燥,制得粉末状壳寡糖。应用高分辨质谱 AB SCIEX 5800 MALDI TOF/TOF™系统(中国科学院大连化学物理研究所)对酶解产物组分进行定性分析,Data Explorer 软件处理原始数据并绘制质谱图进行分析,质谱图的横坐标表示离子的质荷比(m/z)值,横坐标表示的数值即为离子的质量,纵坐标表示离子流的强度(测试条件 Laser Intensity: 5000, Min S/N: 100, Mass Tolerance: ± 0.5 m/z , Min Peaks to March: 5, MALDI Matrix: DHB, Total Shots/Spectrum: 1000)。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达和重组壳聚糖酶的纯化

如图 1 所示,重组载体 pPIC9K-CH2-Csn 在毕赤酵母 GS115 菌株中成功表达。SDS-PAGE 蛋白电泳显示,表达出的蛋白大小为 29 kD,与预期蛋白的大小完全一致。利用 AKTA-purifier 蛋白纯

化系统纯化后的壳聚糖酶 SDS-PAGE 蛋白电泳条带单一。

重组壳聚糖酶的酶活力测定结果见表 2,重组壳聚糖酶粗酶液比酶活为 133.60 U/mg,粗酶经 AKTA-purifier 蛋白纯化系统纯化后,比酶活提高到 338.08 U/mg,酶活力回收率为 68.51%,纯化倍数为 2.53。

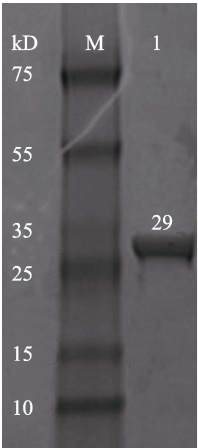


图 1 纯化后的壳聚糖酶 SDS-PAGE 分析
M: 标准分子量蛋白; 1: 重组壳聚糖酶纯化后结果.
Fig. 1 Analysis of the purified recombinant chitosanase by SDS-PAGE
M: proteins with standard molecular masses;
1: the purified recombinant chitosanase.

表 2 重组壳聚糖酶粗酶液的纯化和酶活力测定
Tab. 2 The purification and activity of the crude recombinant chitosanase

纯化 purification	总酶活力/U total activity	总蛋白/mg total protein	比活力/(U·mg ⁻¹) specific activity	纯化倍数 purification	回收率/% yield
粗酶液	32582.37	243.88	133.60	1	100
Ni-IDA-亲和层析	22322.18	66.03	338.08	2.53	68.51

2.2 重组壳聚糖酶的酶学性质

2.2.1 重组壳聚糖酶的最适反应温度和温度稳定性 如图 2 所示,温度对重组壳聚糖酶酶活力影响实验结果表明,该酶的最适反应温度为 50℃,温度低于 30℃、超过 70℃酶活力迅速降低 70%左右(图 2a);重组壳聚糖酶温度稳定性测定结果显示(图 2b),在 45~55℃时该酶最稳定,保持较高的酶活力,相对酶活力保持在 90%左右。

2.2.2 重组壳聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性 pH 对重组壳聚糖酶酶活力影响见图 3,该酶的最适反应 pH 为 4.5,并且 pH 低于 3.0 该酶的酶

活力迅速降低 70%左右,超过 5.5 该酶的酶活力迅速降低 90%左右(图 3a);重组壳聚糖酶 pH 稳定性测定结果显示(图 3b),该酶在 pH 为 4~5 之间最稳定,保持较高的酶活力,相对酶活力保持在 90%左右。

2.2.3 重组壳聚糖酶动力学常数 $V_{\max}$ 、 K_m 的测定

如图 4a 所示,重组壳聚糖酶的浓度保持不变,随着壳聚糖浓度(S)的上升,反应速度(V)也随之迅速增加,且 1/V 和 1/S 接近成正比,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算出重组枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶的动力学常数 $V_{\max}$ =24.39 ($\mu\text{mol/}$

$\text{mg}) \cdot \text{min}^{-1}$, $K_m = 5.48 \text{ mg/mL}$; 如图 4b 所示, 当壳聚糖浓度处于过饱和状态, 反而抑制了酶促反应的速度, 反应速度增加相对比较缓慢。

2.2.4 化合物对重组壳聚糖酶活力的影响 不同

类型化合物对重组壳聚糖酶的影响结果见图 5, 化合物终浓度为 1 mmol/L 时, PMSF 和 IAc 对壳聚糖酶基本没有抑制或者激活作用, EDTA 和 EGTA 表现为部分抑制壳聚糖酶的酶活力, 而

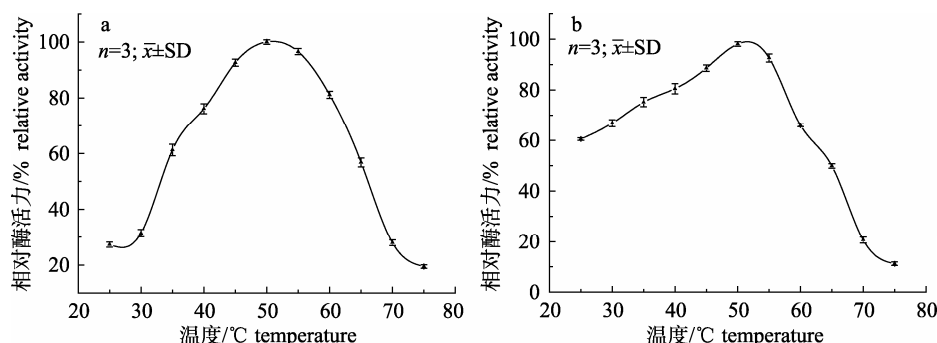


图 2 温度对重组壳聚糖酶活力及稳定性的影响

a. 不同温度对重组壳聚糖酶活力影响; b. 不同温度对重组壳聚糖酶活力稳定性的影响。

Fig. 2 Influence of temperature on the recombinant chitosanase activity

a. optimal temperature of the recombinant chitosanase; b. temperature stability of the recombinant chitosanase.

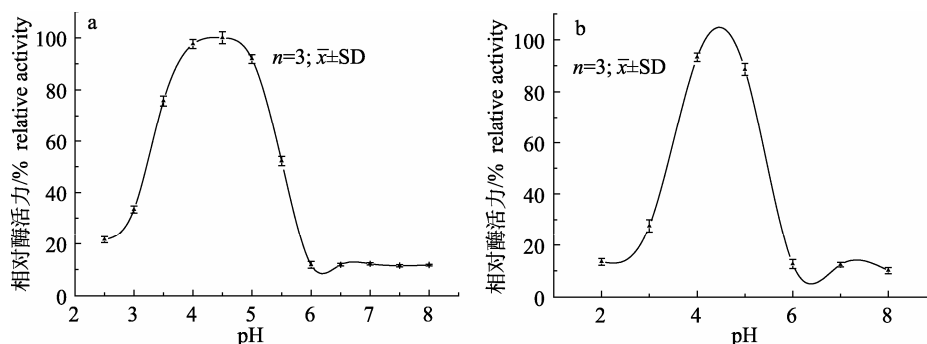


图 3 pH 对壳聚糖酶活力及其稳定性的影响

a. 重组壳聚糖酶最适 pH 测定; b. 重组壳聚糖酶 pH 稳定性测定。

Fig. 3 Influence of pH on the recombinant chitosanase activity

a. optimal pH of the recombinant chitosanase; b. pH stability of the recombinant chitosanase.

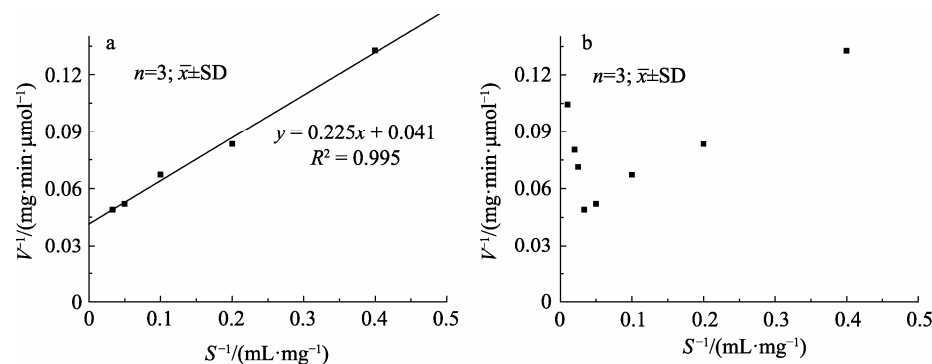


图 4 重组壳聚糖酶酶促反应动力学参数测定

a. 重组壳聚糖酶 $V_{\max}$ 和 K_m 值测定; b. 重组壳聚糖酶浓度保持不变, 反应速度随壳聚糖浓度的变化。

Fig. 4 Kinetic analysis of the recombinant chitosanase

a. estimation of $V_{\max}$ and K_m of the recombinant chitosanase; b. at a constant concentration of chitosanase, the reaction rate change with increasing substrate concentrations.

SDS 完全抑制了壳聚糖酶的酶活力; 化合物终浓度升高到 10 mmol/L 时, EDTA、EGTA 和 SDS 的抑制作用更加剧烈, 表现出完全抑制壳聚糖酶的酶活力, 而 PMSF 和 IAc 仍对壳聚糖酶酶活力没有影响。

2.2.5 金属离子对重组壳聚糖酶酶活力的影响

金属离子对重组壳聚糖酶酶活力的影响见图 6, Fe^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Na^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 对壳聚糖酶酶活力有一定的激活作用, 其中 Mn^{2+} 能使酶活力提升 2.4 倍; 而 Ag^+ 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 离子存在时对壳聚糖酶有强烈抑制作用, 其中重金属离子 Ag^+ 和 Hg^{2+} 可使酶活力降低到 65%; CO^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 和 Zn^{2+} 对壳聚糖酶酶活力没有影响。

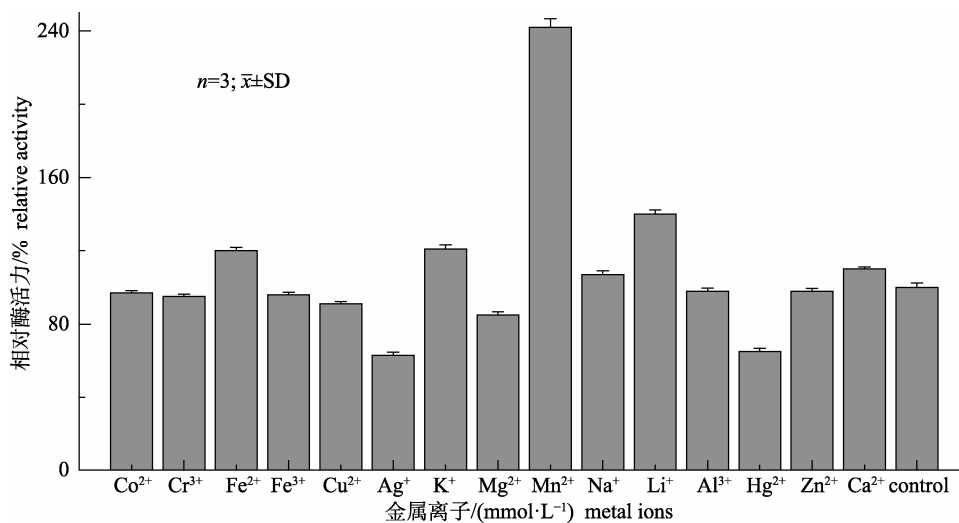


图 6 金属离子对壳聚糖酶活力的影响

Fig. 6 Influence of metal ions on the recombinant chitosanase activity

2.2.6 重组壳聚糖酶酶解产物的组分分析 将重组壳聚糖酶酶解壳聚糖产物进行薄层层析, 如图 7 所示: 重组壳聚糖酶对壳聚糖的酶解产物中没有单糖, 产物以二糖及大分子量的寡糖为主, 证明该重组壳聚糖酶为内切型酶。对重组壳聚糖酶酶解产物的高分辨质谱法的分析结果显示: 壳寡糖的相对分子质量在 399~2103(图 8), 壳寡糖分布较广, 根据分子量推测酶解产物中聚合度 2~10 的壳寡糖均有分布。本研究所获得的重组壳聚糖酶是常规的壳聚糖酶, 对壳聚糖的降解专一。

3 讨论

壳聚糖酶在海洋活性物质壳寡糖的制备中有

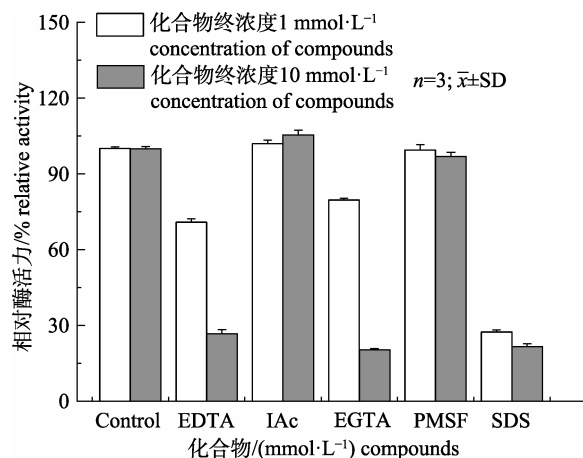


图 5 化合物对壳聚糖酶活力的影响

Fig. 5 Influence of compound on the recombinant chitosanase activity

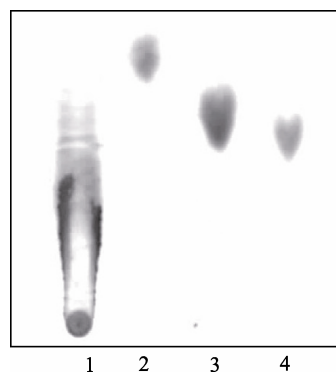


图 7 重组壳聚糖酶酶解壳聚糖产物薄层层析图

1: 酶解产物; 2: 果糖; 3: 蔗糖; 4: 三糖。

Fig. 7 Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of chitosan with concentrated chitosanase

1: the hydrolysis products for 4h; 2: fructose; 3: sucrose; 4: kestose (trisaccharides).

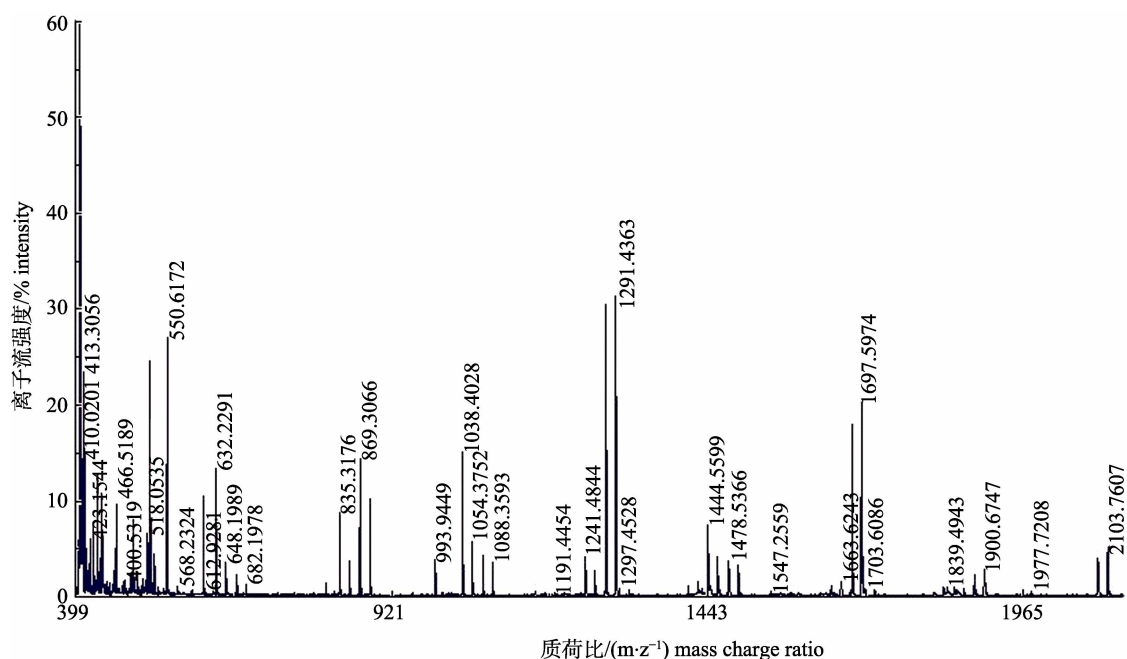


图 8 酶产物质谱(MS)分析

Fig. 8 Mass spectrometry analysis of the enzymatic hydrolysates

良好的应用前景^[3]。国内专家对基因工程重组和改造壳聚糖酶进行了多年的研究,应用了许多载体表达壳聚糖酶,如大肠杆菌^[16]、酿酒酵母^[20]、解脂耶氏酵母^[21]等。这些载体表达的重组壳聚糖酶普遍存在活力低、酶量小、纯酶分离纯化困难等缺点。毕赤酵母表达系统是近几年广泛应用、发展完善、高效表达的新型真核基因表达系统,毕赤酵母表达系统不仅克服上述表达系统的诸多缺点,该系统还具有高效分泌表达生物活性蛋白、目的基因整合到自身基因组上进行表达的遗传学稳定、目的蛋白易于纯化和适合高密度发酵等优点^[17-18]。本研究采用毕赤酵母的这些特征,以提高重组壳聚糖酶的产量和酶活力为目的,首次实现了枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶在毕赤酵母真核表达系统中的高效分泌表达。

本研究的重组枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶是以胞外分泌的形式进行表达,简化了该重组酶的分离纯化过程,更节约了该重组酶工业应用的成本。并且该重组酶是典型的酸性内切型壳聚糖酶,在酸性环境下能高效酶解壳聚糖,生产一系列不同分子量的壳寡糖,制备的壳寡糖性能好,聚合度主要集中在 2~10,该重组酶可被广泛应用于海洋甲壳质加工应用中。在对重组枯草芽孢杆

菌 CH2 菌株壳聚糖酶酶学特性研究时,发现该重组酶比 Oh^[22]报道的天然枯草芽孢杆菌 CH2 菌株壳聚糖酶在酶学特性上有所提升,如:纯化后重组酶比酶活(338.08 U/mg)是原菌株(161 U/mg)的 2.1 倍;在 50℃、pH 4.5 条件下重组壳聚糖酶酶活力最高;而天然壳聚糖酶酶在 60℃、pH 5.5 条件下酶活力最高,差异的出现可能是重组壳聚糖酶在毕赤酵母翻译后修饰导致的,其中最适温度降低 10℃,大大降低了生产的能源成本。刘万顺等^[21]研究的重组微杆菌壳聚糖酶最适催化温度为 45℃,最适 pH 为 5.6,在 40℃和 pH 5.0~7.0 下稳定。2009 年,刘怀伟等^[20]研究的重组腐皮镰孢菌壳聚糖酶最适催化温度为 50℃,最适 pH 为 5.6。裘梁等^[23]研究的重组烟曲霉壳聚糖酶最适催化温度为 60℃,最适 pH 为 6.0。这些研究结果表明,来自不同菌种的重组壳聚糖酶最适催化温度和 pH 差异的出现可能是壳聚糖酶分子构象变化、活性中心必须基团的解离所需的温度和 pH 不同导致的,所以只有在对壳聚糖酶的分子结构进行研究后,才能更好地对壳聚糖酶进行优化改造。EDTA 作为典型的金属蛋白酶抑制剂,其浓度 10 mmol/L 能完全抑制本研究的重组壳聚糖酶酶活力,说明该重组酶的活性中心可能含有金属离子,而 PMSF 对

重组壳聚糖酶活力没有影响,说明该酶的酶活中心没有丝氨酸残基,史凤玉等^[9]在对重组拟青霉属真菌壳聚糖酶酶学性质的研究中有过相似结论。本研究在探究金属离子对重组壳聚糖酶活力影响实验时发现,Ag⁺、Mg²⁺和Hg²⁺金属离子对其酶活力有强烈抑制作用。尹爱国等^[24]研究发现:Na⁺、K⁺、Mg⁺、Cu²⁺、Ag⁺、Mn²⁺等金属离子对他们筛选的壳聚糖酶有一定的抑制作用。王艳君等^[11]对 *Penicillium* sp. KQ-1002 菌株产的壳聚糖酶酶学性质研究发现:金属离子Cu²⁺、Hg²⁺、Ag⁺对酶的酶活力均有强烈的抑制作用。这些研究结论表明了重金属离子对壳聚糖酶的酶活力均有不同程度抑制作用,但是重金属抑制壳聚糖酶的机理研究还未见报道。壳聚糖酶在毕赤酵母中表达成功的实例有过报道,2010年阳丽等^[25]报道烟曲霉壳聚糖酶基因在毕赤酵母表达系统中分泌表达,重组蛋白酶活力为14.59 U/mL,其重组表达的壳聚糖酶产酶量和酶活力相对较低,出现酶活力低的主要原因是壳聚糖酶分子构象不易改变,空间结构阻碍等,其次是温度、pH等环境因素的影响,表达量低的主要原因可能是诱导条件的不足、筛选到菌株的性质差等。因此,壳聚糖酶对壳聚糖的酶解模式和分子结构研究将是未来的研究重点,也为壳聚糖酶最大效率酶解壳聚糖奠定理论基础。

本研究以毕赤酵母GS115为宿主菌,将枯草芽孢杆菌CH2菌株壳聚糖酶基因整合到毕赤酵母基因组中进行重组表达,成功筛选到高产量分泌表达型产壳聚糖酶Mut⁺型工程菌,并对重组壳聚糖酶酶学性质做全面测定,为该酶开发利用提供详实的数据,为壳聚糖酶在工业上制备壳寡糖提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Monaghan R L, Eveleigh D E, Tewari R P, et al. Chitosanase, a novel enzyme[J]. *Nat New Biol*, 1973, 245(142): 78–80.
- [2] Sun Y, Liu W, Han B, et al. Purification and characterization of two types of chitosanase from a *Microbacterium* sp.[J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(17): 1393–1399.
- [3] Eijssink V, Hoell I, Vaajejokstada G. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2010, 27(1): 331–366.
- [4] El Ouakfaoui S, Asselin A. Diversity of chitosanase activity in cucumber[J]. *Plant Sci*, 1992, 85(1): 33–41.
- [5] Chen H P, Xu L L. Studies on chemical and physical characters of chitosanase from non-heading Chinese cabbage leaves [J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(5): 36–39. [陈惠萍, 徐朗莱. 不结球白菜叶片壳聚糖酶的理化特性研究[J]. *海洋科学*, 2006, 30(5): 36–39.]
- [6] Wang Y, Zhou P G, Wang P P, et al. Primary screening of strains producing chitosanase[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2003, 15(5): 259–260. [王艳, 周培根, 王平平, 等. 产壳聚糖酶菌株的初步筛选[J]. *中国微生物学杂志*, 2003, 15(5): 259–260.]
- [7] Ge Z H, Zeng J. Purification and characterization of chitosanase from *Penicillium* sp.[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2002, 33(8): 378–381. [葛正红, 曾嘉. 青霉菌产壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(8): 378–381.]
- [8] Duan Y, Han B Q, Dong W. Study on optimal fermentation conditions of a chitosanase-producing bacterium and purification of the chitosanase[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(1): 1–7. [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.]
- [9] Shi F Y, Cai A J, Tian H, et al. Isolation, characterization and degradation products of a chitosanase from *Paecilomyces* sp. CS-Z[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(4): 721–728. [史凤玉, 蔡爱军, 田辉, 等. 来自拟青霉属真菌的壳聚糖酶的分离纯化, 理化性质及降解产物的分析[J]. *菌物学报*, 2013, 32(4): 721–728.]
- [10] Tu S Y, Yang A H, Wu B C, et al. Screening of a strain producing chitosanase and study on its fermentation conditions [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2009, 26(9): 52–55. [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.]
- [11] Wang Y J, Zhuo S L, Chen S, et al. Screening, identification and enzymatic properties of chitosanase-producing strain[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(12): 1734–1745. [王艳君, 卓少玲, 陈盛, 等. 产壳聚糖酶菌株的筛选, 鉴定及酶学特性分析[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(12): 1734–1745.]
- [12] Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, et al. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17[J]. *J Mol Biol*, 2004, 343(3): 785–795.
- [13] Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M. Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides[J]. *Bioresource Technol*, 2013, 127: 407–414.

- [14] Ike M, Nagamatsu K, Shioya A, et al. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71(3): 294–303.
- [15] Liang D C, Zuo A J, Guo G, et al. Cloning and expression of an *Aspergus fumigatus* Chitosanase gene[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(4): 539–542. [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): 539–542.]
- [16] Zhang S P, Zhou P, Su C Y, et al. Purification and characterization of a recombinant chitosanase from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of China Agriculture University, 2012, 17(1): 125–131. [张舒平, 周鹏, 苏春元, 等. 重组枯草芽孢杆菌壳聚糖酶的纯化和性质研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 125–131.]
- [17] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249–270.
- [18] Liu Y L, Jiang S, Ke Z M, et al. Recombinant expression of a chitosanase and its application in chitosan oligosaccharide production[J]. Carbohydr Res, 2009, 344(6): 815–819.
- [19] Shimosaka M, Fukumori Y, Zhang X Y, et al. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(3): 354–360.
- [20] Liu H W, Bao X M. Characterization of a chitosanase from *Fusarium solani* and its expression in and industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009(12): 1607–1612. [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(12): 1607–1612.]
- [21] Liu W S, Wang J, Yang Y. et al. Expression of chitosanase gene in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Ocean University of China: Natural Science, 2011, 41(12): 58–62. [刘万顺, 王娇, 杨艳, 等. 壳聚糖酶基因在解脂耶氏酵母中的表达及重组酶性质研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41(12): 58–62.]
- [22] Oh C H. Isolation, purification, and enzymatic characterization of extracellular chitosanase from marine bacterium *Bacillus subtilis* CH2[J]. J Microbiol Biotechnol, 2011, 21(10): 1021–1025.
- [23] Qiu L, Yang P, Dong D G, et al. The Study on high density fermentation of recombinant chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant chitosanase[J]. Journal of Jiangxi Normal University: Natural Science, 2013, 37(6): 607–610. [裘梁, 杨萍, 董德刚, 等. 重组烟曲霉壳聚糖酶在毕赤酵母中高密度发酵表达及性质研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(6): 607–610.]
- [24] Yi A G, Qiu Y L. Preliminary study on physical and chemical properties of chitosanase[J]. Journal of Gansu Sciences, 2013(1): 31–34. [尹爱国, 邱勇浪. 壳聚糖酶的理化性质初步研究[J]. 甘肃科学学报, 2013(1): 31–34.]
- [25] Yang L, Yang P, Wang M Y. Secretory expression of chitosanase gene from *Aspergus fumigatus* in *Pichia pastoris*[J]. China Brewing, 2010, 29(10): 133–135. [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, 29(10): 133–135.]

Expression of the chitosanase gene from *Bacillus subtilis* CH2 and characterization of the recombinant enzyme in *Pichia pastoris*

YANG Guang^{1,2}, SHENG Jun¹, CHEN Yadong³, SHA Zhenxia³

1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China

Abstract: Chitosanase is important in carbon and nitrogen recycles that occur extensively in nature, and is useful in the preparation of biofunctional chitooligosaccharides. Chitosanase occurs in a variety of microorganisms, including bacteria and fungi. Transformation by genetic engineering has increased the enzyme activity and enzyme content of recombinant chitosanase. To obtain abundant chitosanases possessing high chitosanolytic activity for large-scale production of chitosan-oligosaccharide, the chitosanase of *Bacillus subtilis* CH2 was best induced by fructose and not induced with chitosan, unlike other chitosanases. This study investigated recombinant expression of chitosanase from *B. subtilis* CH2, which was cloned and expressed in *Pichia pastoris*, and characterized the application of the recombinant enzyme for chitosan hydrolysis. Chitosanase may have important industrial applications in the utilization of the enormous chitosan substrates. Mass spectrometry (MS) and thin-layer chromatography (TLC) were used to analyze the enzymatic products. The molecular weight of the recombinant chitosanase was estimated to be 29 kD using SDS-PAGE. The specific activity of crude enzymes was 133.60 U/mg. The specific activity of the purified chitosanase was up to 338.08 U/mg. The optimal pH and temperature of the purified chitosanase was 50°C and 4.5, respectively. The K_m and V_{max} values with soluble chitosan as a substrate were 5.48 mg/mL and 24.39 ($\mu\text{mol/mg}$) $\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. Fe^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , and especially Mn^{2+} enhanced the enzyme activity of the recombinant chitosanase. Whereas, Ag^+ , Mg^{2+} , Hg^{2+} , EDTA, EGTA, and SDS inhibited the enzyme activity, and the other metal ion tested had no effect on enzyme activity. This characteristic of the recombinant chitosanase was better than the chitosanase of *B. subtilis* CH2. Furthermore, the enzymatic production of chitooligosaccharides from chitosans of various deacetylation degrees ranged mainly from chitobiose to chitopen-tamer, and the enzymic products contained 2–10 degrees of polymerization of chito-oligosaccharide after the recombinant chitosanase hydrolysis, but no monose. These results indicated that the enzyme was an endo-type chitosanase and a typical acidic metalloproteinase, which might be a good candidate for biotechnological application in producing chitooligosaccharides.

Key words: chitosanase; *Bacillus subtilis* CH2; chito-oligosaccharide; *Pichia pastoris*; enzyme properties

Corresponding author: SHA Zhenxia. E-mail: shazhenxia@163.com