

# 海洋菌株 *Mitsuaria* sp. SH-50 产嗜热性壳聚糖酶 CsnSH50 的酶学性质表征及其应用

卢波斯, 崔丹丹, 沈宏\*

(华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 实验室从中国海南滨海虾蟹养殖区泥土样品中筛选到一株高产壳聚糖酶的海洋菌株 *Mitsuaria* sp. SH-50, 优化后该菌株产酶时间仅为 12 h, 产酶活性可达 26.6 U/mL。该研究对其胞外壳聚糖酶进行分离纯化和酶学性质表征并进行壳寡糖制备的小试放大试验, 以期进一步明确该菌株在壳寡糖生产上的实际意义。结果表明: 壳聚糖酶 CsnSH50 分子量约为 41 ku, 纯化后 CsnSH50 比酶活力为 7 462.50 U/mg, 最适反应 pH 值为 4.5, 温度为 75 °C, 在 pH 值 2.5~8.5 及温度低于 50 °C 条件下稳定性较好。最适条件下, 稀释后 CsnSH50 的最大反应速率  $V_{\max}$ =29.41 U/mL, 米氏常数  $K_m$ =1.71 mg/mL, 1 mmol/L 的  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mn^{2+}$  对 CsnSH50 的酶活力有明显正激活效应, 10 mmol/L 的  $Mn^{2+}$  对其正激活效应可达 412%。TLC 和 ESI-MS 结果表明: CsnSH50 水解壳聚糖的最终产物主要为壳二糖、三糖、四糖。小试放大试验结果显示: 制备 5% (m/V) 壳寡糖溶液时, 壳聚糖溶液的初始 pH 值 3.5, 温度 75 °C, 水解 120 min 时壳寡糖产率达到 92.1%, 产物平均聚合度为 10.2。综上, CsnSH50 具有酶活性高、热稳定性好、耐酸等特性, 同时是一种鲜有报道的嗜热性壳聚糖酶, 具有良好的工业应用潜力。

**关键词:** 壳聚糖酶; *Mitsuaria* sp. SH-50; 分离纯化; 内切酶

文章编号: 1673-9078(2023)01-50-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0298

## Enzymatic Characterization and Application of Thermophilic Chitosanase CsnSH50 from Marine Strain *Mitsuaria* sp. SH-50

LU Bosi, CUI Dandan, SHEN Hong\*

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** This study screened a marine strain of *Mitsuaria* sp. SH-50 with high chitosanase activity levels from soil samples of the coastal shrimp and crab culture area in Hainan province, China. After optimization, the enzyme production cycle of strain SH-50 was only 12 h, with the enzyme activity reaching 26.6 U/mL. To further clarify the practical significance of SH-50 in the production of chitosan oligosaccharide, its chitosanase was isolated and purified for the characterization of enzymatic properties and a small-scale test of chitosan oligosaccharide preparation. The results show that CsnSH50 has a molecular weight of approximately 41 ku, an enzymatic activity level of 7 462.50 U/mg, an optimum reaction pH of 4.5, an optimum reaction temperature of 75 °C, and was stable at pHs 2.5~8.5 and temperatures < 50 °C. Under optimal conditions, the  $V_{\max}$  and  $K_m$  of diluted CsnSH50 were 29.41 U/mL and 1.71 mg/mL, respectively, and 1 mmol/L  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Mn^{2+}$  significantly activated CsnSH-50 enzyme activity. The positive activation effect of  $Mn^{2+}$  at 10 mmol/L was up to 412%. TLC and ESI-MS demonstrated that the final products of chitosan hydrolysis by CsnSH50 were mainly chitobiose, chitotriose, and chitotetraose. When preparing 5% chitosan oligosaccharide solution in small-scale experiments, the initial pH was 3.5, the temperature was 75 °C, and the chitosan oligosaccharide

引文格式:

卢波斯, 崔丹丹, 沈宏. 海洋菌株 *Mitsuaria* sp. SH-50 产嗜热性壳聚糖酶 CsnSH50 的酶学性质表征及其应用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1):50-58

LU Bosi, CUI Dandan, SHEN Hong. Enzymatic Characterization and Application of Thermophilic Chitosanase CsnSH50 from Marine Strain *Mitsuaria* sp. SH-50 [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 50-58

收稿日期: 2022-03-17

基金项目: 广州市科技计划项目 (202206010064); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0200405)

作者简介: 卢波斯 (1994-), 男, 研究生, 研究方向: 微生物发酵, E-mail: 18022409540@163.com

通讯作者: 沈宏 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物营养, E-mail: hshen@scau.edu.cn

yield rate reached 92.1% after 120 min of hydrolysis with an average degree of polymerization of 10.2. In conclusion, CsnSH50 has high enzyme activity levels, good thermal stability, and acid resistance. CsnSH50 is also a rarely reported thermophilic chitosanase and has the potential for industrial application.

**Key words:** chitosanase; *Mitsuaria* sp. SH-50; separation and purification; endo-type chitosanase

甲壳素是世界上第二大天然可再生资源,广泛存在于节肢类动物如贝壳、虾、蟹和昆虫壳、真菌及藻类细胞壁中<sup>[1]</sup>。壳聚糖是甲壳素脱去部分乙酰基后的产物,是由少量N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖之间通过 $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的大分子多糖<sup>[2]</sup>。壳聚糖因其具有抑菌、抗病毒、抗癌等良好的生物活性及其优良的生物相容性,已经被广泛应用在医药和食品等领域<sup>[3]</sup>,壳聚糖同时也被认为是继软磷脂和螺旋藻之后的第三代保健品<sup>[4]</sup>。然而,壳聚糖因C2位连接有氨基基团导致其只能溶解于部分酸溶液中,如醋酸、盐酸、乳酸和柠檬酸等<sup>[5]</sup>,且其分子量较大不易被生物所吸收,极大的限制了其应用范围<sup>[6]</sup>。

壳寡糖(Chitosan Oligosaccharide, COS)是壳聚糖的水解产物,一般聚合度为2~10<sup>[7]</sup>,也是目前自然界中唯一带正电荷的低聚糖<sup>[8]</sup>,与壳聚糖相比,壳寡糖具有更好的水溶性及生物活性。谷新晰等<sup>[9]</sup>发现在泡菜发酵时添加适宜浓度的壳寡糖有利于泡菜中总酸和氨基酸提高,同时,对泡菜中的菌群结构和多样性均具有显著改变。王晓杰等<sup>[10]</sup>发现壳寡糖-糖基化的玉米醇溶蛋白具有更好的抗氧化性能,还可以显著促进小鼠体内酒精代谢<sup>[11]</sup>。庄林等<sup>[12]</sup>发现添加壳寡糖的复合固体饮料能显著降低小鼠高尿酸血症。壳寡糖在动物饲料领域也具有应用价值,何孟莲等<sup>[13]</sup>发现在泌乳中期奶牛的饲料中添加200 mg/kg的壳寡糖可以显著降低奶牛血清中一氧化氮浓度。壳寡糖同样具有良好的抗氧化和抑菌活性,因其水溶液具有成膜性<sup>[14]</sup>,将其喷洒在水果或者食品上形成透明的保鲜薄膜可以有效延长食品贮藏期,赵倩等<sup>[15]</sup>发现低浓度的壳寡糖与乳酸菌共发酵的产物表现出对大肠杆菌和沙门氏菌显著的抑制效果。因壳寡糖在食品领域的应用潜力巨大,美国食品药品监督管理局和我国已经相继批准壳寡糖安全无毒,可以作为食品添加剂使用。

壳聚糖酶(EC.3.2.1.132)可以专一高效的催化水解壳聚糖的 $\beta$ -1,4-糖苷键<sup>[16]</sup>,其主要来源于真菌和部分细菌,在某些病毒及植物中也能检测到壳聚糖酶活性<sup>[17]</sup>。化学法、物理法、生物酶解法均能制备壳寡糖,但酶法制备壳寡糖具有反应效率高、条件可控、无环境污染等优势<sup>[18]</sup>。此外,壳聚糖酶还可以直接应用于病原真菌的生物防治<sup>[19-21]</sup>,是一种多功能酶制剂,但目前市面上的壳聚糖酶存在价格昂贵、酶活性不稳定、

酸性条件下半衰期短<sup>[22]</sup>等问题。本实验室从海洋高盐极端环境中筛选到一株高产壳聚糖酶菌株 *Mitsuaria* sp. SH-50,该菌株产酶速度远高于其他壳聚糖酶产生菌,且酶活性相对较高,因此本文对其壳聚糖酶进行分离纯化和酶学性质表征,旨在为壳聚糖酶的相关研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*Mitsuaria* sp. SH-50 菌株,本实验室前期分离得到,保存于华南农业大学根层调控实验室-80 °C冰箱;胶体壳聚糖(脱乙酰度 $\geq$ 85%),青岛博智汇力生物科技有限公司;酵母提取物,赛默飞世尔科技公司;氨基葡萄糖盐酸盐(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;蛋白 Marker,生工生物工程股份有限公司;DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-75, REBIO 有限公司;透析袋 70 mm (MD77) [Mw: 14 000],广州市丛源仪器有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

活化培养基(g/L):胶体壳聚糖 5.0,硫酸镁 1.0,磷酸二氢钾 0.5,磷酸氢二钾 0.5,酵母提取物 0.5,氯化钠 5.0, pH 值 6.5。

发酵培养基(g/L):胶体壳聚糖 10.0,硫酸镁 1.0,磷酸二氢钾 1.0,磷酸氢二钾 1.0,酵母提取物 0.5,氯化钠 5.0, pH 值 6.5。

### 1.2 仪器与设备

UV-2450 紫外分光光度计,日本 Shimadzu 有限公司;Basic 200 凝胶电泳仪,广州四亿科学仪器有限公司;BJ-1CD 超净工作台,上海博迅实业公司;AKTA FPLC,美国 GE Healthcare Life Science 公司;NDJ-1 型粘度计,上海精米科学仪器有限公司;HC-3618R 高速离心机,中科中佳科学仪器有限公司;TH-300 梯度混合仪,上海青浦沪西有限公司;HWS-5A 恒温水浴锅,上海百典仪器设备有限公司;Biotech-5JGH 发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司。

### 1.3 粗酶液的制备

取-80 °C保藏的SH-50菌液1 mL接种于含活化培养基 50/150 mL 的三角瓶中,30 °C,200 r/min 条件下

培养 24 h。向发酵培养基中添加 0.5 mL 的上述活化菌液, 100/250 mL 三角瓶发酵 12 h, 在 10 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min。上清液即为粗酶液。

#### 1.4 壳聚糖酶活力的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定粗酶液的酶活<sup>[23]</sup>。取 900  $\mu$ L 1% (*m/m*) 胶体壳聚糖溶液和 1 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.2 mol/L, pH 值 5.0) 于 25 mL 比色管中, 混匀后加入 100  $\mu$ L 酶液, 在 75 °C 下恒温反应 10 min 后迅速加入 1.5 mL DNS 溶液, 冷却至室温后沸水浴 5 min, 加蒸馏水定容至 25 mL; 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清液在 540 nm 处比色测定酶活。

壳聚糖酶活定义<sup>[24]</sup>: 最适条件下, 1 mL 酶液在 1 min 内反应产生 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位 (U/mL)。

#### 1.5 CsnSH50 的分离纯化

##### 1.5.1 硫酸铵分级沉淀

在磁力搅拌条件下, 向粗酶液中缓慢添加硫酸铵晶体, 待其完全溶解, 使硫酸铵饱和浓度分别在 0~30%、30%~50%、50%~70%、70%~90% 时, 8 000 r/min, 4 °C 条件下离心 10 min, 收集沉淀。将收集到的沉淀置于 pH 值 7.0、20 mmol/L 的磷酸缓冲溶液中完全溶解, 使用透析袋在 4 °C 透析 36 h, 并测定酶活。

##### 1.5.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析

将硫酸铵沉淀分离出来的壳聚糖酶通过阴离子交换柱层析进一步纯化, 选用 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱 (2.6 cm $\times$ 20 cm), 用 20 mmol/L 的 pH 值 7.5 Tris-HCl 缓冲液充分平衡, 过夜, 取 8 mL 经硫酸铵纯化后的 CsnSH50 酶液入柱, 使用同样的 pH 值 7.5 Tris-HCl 缓冲液洗脱至曲线平缓, 再用 0~1.0 mol/L 氯化钠的缓冲溶液进行洗脱, 流速为 1 mL/min, 每管收集 5 mL, 收集每个洗脱峰, 在 280 nm 处用紫外分光光度计检测波长并测定酶活, 绘制洗脱曲线。

##### 1.5.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析

准确称取 20 g Sephadex G-75, 加 400 mL 双蒸水 100 °C 煮沸 3 h, 冷却至室温后抽真空 20 min 排除气泡, 沉降后以倾斜法除去上层颗粒, 装柱 (1.6 cm $\times$ 60 cm) 后用 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 值 7.5) 平衡过夜。上样 1.0~1.5 mL, 流速 0.8 mL/min, 每管收集 2 mL。根据每管的壳聚糖酶活力和蛋白质曲线, 选择纯度高的收集液于 -20 °C 储存。

##### 1.5.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

通过 SDS-PAGE 对收集的酶液纯度进行分析, 采

用 *m*=4% 的浓缩胶和 *m*=12% 的分离胶测定其分子量<sup>[25]</sup>。

#### 1.6 壳聚糖酶学性质研究

##### 1.6.1 壳聚糖酶的最适反应温度

取纯化后的壳聚糖酶液用 20 mmol/L, 用 pH 值 7.0 的磷酸缓冲溶液稀释一定倍数后, 在 (20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 °C) 条件下测定壳聚糖酶活性, 以最高活力为 100% 计算相对酶活性, 确定壳聚糖酶的最适反应温度。

##### 1.6.2 壳聚糖酶的最适反应 pH

取纯化后的壳聚糖酶液用 20 mmol/L, 用 pH 值 7.0 的磷酸缓冲溶液稀释一定倍数后, 取少量酶液与不同 pH 值 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的胶体壳聚糖反应, 以测定酶活力, 以最高活力为 100% 计算相对酶活性, 确定壳聚糖酶的最适反应 pH。

##### 1.6.3 壳聚糖酶的温度及 pH 稳定性

取纯化后的壳聚糖酶液用 20 mmol/L, 用 pH 值 7.0 的磷酸缓冲溶液稀释一定倍数后, 将其置于不同温度 (30、40、50、60 °C) 恒温水浴锅中保温一定时间后, 测定剩余酶活性。取少量纯化的壳聚糖酶液, 用不同 pH 值 (2.5、4.5、6.5、8.5、10.0) 的缓冲溶液稀释一定倍数酶液, 冰水浴一定时间, 测定剩余酶活性。

##### 1.6.4 CsnSH50 的动力学参数测定

用 pH 值 5.0, 20 mmol/L 的磷酸缓冲溶液溶解胶体壳聚糖, 配制成终浓度为 1、2、4、6、8、10 mg/mL 的壳聚糖溶液, 取上述壳聚糖溶液 900  $\mu$ L, 75 °C 恒温水浴, 加入 100  $\mu$ L 稀释 200 倍的 CsnSH50 酶液, 反应 2 min 后加入 1.5 mL DNS 终止反应。测定不同底物浓度的反应速度。用 Lineweaver-Burk 制图法绘制双倒数曲线, 求出 CsnSH50 的  $V_{max}$  和  $K_m$  值。

##### 1.6.5 金属离子对 CsnSH50 酶活性的影响

分别向壳聚糖酶液中添加不同终浓度 (1、5、10 mmol/L) 的金属盐 ZnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、KCl、NaCl、BaCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、AgNO<sub>3</sub>, 冰水浴条件下搅拌至金属盐完全溶解, 静置 30 min 后, 在 pH 值 4.5, 75 °C 条件下, 测定酶活力, 以不添加金属盐的反应体系为对照, 计算相对酶活性。

#### 1.7 CsnSH50 水解壳聚糖产物的薄层层析

##### (TLC) 分析

采用硅胶薄层层析 (TLC) 分析 CsnSH50 水解壳聚糖的产物组成。将 1% (*m/m*) 的胶体壳聚糖底物缓慢升温至 75 °C 恒温搅拌, 后加入少量壳聚糖酶

CsnSH50, 分别于 30、60、90、180 min 时取样, 沸水浴 5 min 后, 8 000 r/min 离心 10 min。用毛细管取样滴于硅胶板上, 吹干后置于展开剂 (异丙醇:氨水=2:1, V/V) 中缓慢展开。待展开剂铺满硅胶板后, 取出吹干, 均匀喷洒 1% (m/m) 的茚三酮溶液, 于 110 °C 放置 5 min 显色。

## 1.8 CsnSH50 水解壳聚糖产物质谱(ESI-MS)

### 分析

采用电喷雾串联质谱 (ESI-MS) 进一步分析 CsnSH50 水解壳聚糖的产物分布, 将 1% (m/m) 胶体壳聚糖水解后的产物进行测定, 条件设置为: 正离子模式, 分子量范围为 50~2 000 (m/z), 电压 3.5 kV, 温度 180 °C。

## 1.9 CsnSH50 制备壳寡糖

### 1.9.1 小试放大试验制备壳寡糖

向 5 L 发酵罐中添加胶体壳聚糖粉末 200 g, 补水至 4 L, 边搅拌边加入冰醋酸调节初始 pH 值 (3.0、3.5、4.0、4.5), 逐步升温至 75 °C 待底物完全溶胀, 添加 CsnSH50 酶液, 反应 120 min, CsnSH50 的添加量为 12.5 U/g, 持续反应 90 min 后每 10 min 取少量反应液滴加 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 观察是否有白色悬浮物, 无沉淀即为反应终点。

### 1.9.2 壳寡糖含量及平均聚合度的测定

配置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液, 540 nm 下测定吸光度值, 绘制标准曲线, 采用 DNS 法测定降解产物中壳寡糖的浓度并计算产率。取 1 mL 壳寡糖溶液于具塞试管中, 置于冰水浴中, 缓慢加入 4 mL 浓硫酸, 摇匀, 在 90 °C 反应 2 h, 冷却后定容至 100 mL, 用 10 mol/L 的 NaOH 溶液中和至中性, 定容至 25 mL, 取 2 mL 壳寡糖溶液加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中加热 5 min, 冷却后定容至 25 mL, 540 nm 下测定吸光度值。结果计算:

$$W = \frac{m \times f \times 0.994}{M} \times 100\%$$

式中:

W——壳寡糖含量的质量百分数, %;

m——由标准曲线查得的盐酸氨基葡萄糖的质量, mg;

f——测定过程中样品溶液稀释倍数;

M——每毫升壳寡糖溶液中壳寡糖样品的质量, mg;

0.994——单糖折成多糖的系数。

平均聚合度采用乙酰丙酮分光光度法<sup>[26]</sup>。

## 1.10 数据处理及统计学分析

所有试验均在自然条件下重复 3 次, 采用 SPSS 19.0 进行数据分析, 采用 Duncan's 检验计算差异显著性,  $p < 0.05$  为显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CsnSH50 的分离纯化

#### 2.1.1 硫酸铵分级沉淀

微生物在生长过程中会分泌大量胞外蛋白, 硫酸铵分级沉淀可以去除粗酶液中的一些杂蛋白<sup>[27]</sup>, 实现目标蛋白的初步纯化。硫酸铵分级沉淀提取 CsnSH50 的结果见表 1, 当硫酸铵饱和浓度低于 30% 时, 沉淀中有少量蛋白析出, 但几乎检测不到壳聚糖酶活性。在 30%~50% 硫酸铵浓度范围内, 沉淀中有少量壳聚糖酶析出, 在硫酸铵饱和浓度 50%~70% 之间, 存在大量壳聚糖酶析出, 且杂蛋白相对较少。经透析后测定, 比酶活力为 2 833.40 U/mg。因此, 选用硫酸铵饱和浓度在 50%~70% 范围沉淀粗酶液, 此条件下的目标蛋白纯化倍数为 2.27 倍。

表 1 不同硫酸铵饱和浓度对 CsnSH50 盐析影响

Table 1 Influence of different saturation concentrations of ammonium sulfate on salting out of CsnSH50

项目	酶活/ (U/mL)	蛋白/ (μg/mL)	比酶活力/ (U/mg)	纯化倍数
粗酶液	26.61	21.30	1 246.50	1.00
0~30%	-	10.40	-	-
30%~50%	7.62	128.20	59.40	0.05
50%~70%	164.20	57.90	2 833.40	2.27
70%~90%	0.50	8.60	58.10	0.05

#### 2.1.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱

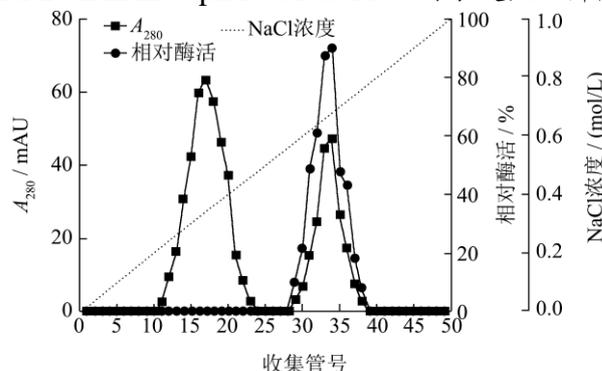


图 1 CsnSH50 的离子交换层析

Fig.1 Ion exchange column chromatography of CsnSH50

用硫酸铵沉淀透析初步提纯粗酶液中的目标蛋白后, 采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析

进一步进行分离,洗脱曲线如图 1 所示。在 NaCl 浓度为 0.37 mol/L 和 0.68 mol/L 时有两个峰被洗脱,第一个洗脱峰的壳聚糖酶活性可忽略不计,第二个洗脱峰表现出明显的壳聚糖酶活性,对应的 29~38 号管壳聚糖酶活性较高。因此,将活性组分进行 Sephadex G-75 凝胶过滤层析。

### 2.1.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析

将离子交换柱层析的壳聚糖酶样品收集后,使用 Sephadex G-75 凝胶过滤层析进一步纯化,结果如图 2 所示。样品分离后得到两个较为明显的洗脱峰,第一个洗脱峰检测不到明显的壳聚糖酶活性,第二个洗脱峰具有较高的壳聚糖酶活性,将收集纯化的壳聚糖酶命名为 CsnSH50。

已有报道的高产壳聚糖酶菌株有 *Renibacterium* sp.QD1, *Bacillus* sp. KCTC0377BP, 比酶活力分别为 1 575 U/mg<sup>[28]</sup>和 1 700 U/mg<sup>[29]</sup>。重组壳聚糖酶中,Guo 等<sup>[30]</sup>通过大肠杆菌超表达壳聚糖酶基因得到了酶活

为 336.20 U/mg 的重组酶;王杉杉<sup>[31]</sup>通过基因克隆得到产酶活性为 1 500 U/mL 的工程菌。表 2 为 CsnSH50 提纯工艺概要,与粗酶液相比,通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-Fast Flow、Sephadex G-75 层析纯化后的 CsnSH50 比酶活力为 7 462.50 U/mg,回收率为 6.62%,纯化倍数为 5.99。

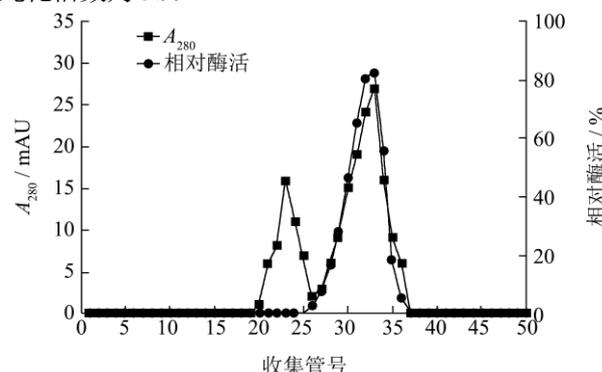


图 2 CsnSH50 的凝胶过滤层析

Fig.2 Gel filtration chromatography of CsnSH50

表 2 CsnSH50 纯化结果

Table 2 Purification results of CsnSH50

纯化项目	总酶活性/U	总蛋白/mg	比酶活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	26 622.00	21.30	1 246.50	100.00	1.00
硫酸铵沉淀	16 421.00	5.79	2 833.40	61.68	2.27
DEAE-Fast Flow	4 685.36	1.00	4 699.50	17.60	3.77
Sephadex G-75	1 762.15	0.24	7 462.50	6.62	5.99

## 2.2 SDS-PAGE

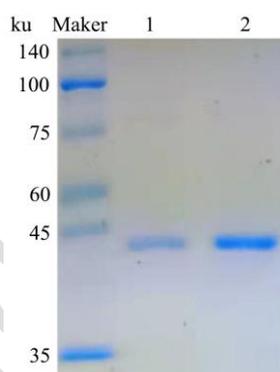


图 3 CsnSH50 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of CsnSH50

注:泳道 M 为 Marker (35-140 ku);泳道 1 为硫酸铵沉淀 CsnSH50;泳道 2 为 DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-75 纯化 CsnSH50。

大多数细菌产的壳聚糖酶分子量范围在 20~75 ku,只有少数高分子量壳聚糖酶,来自 *Penicillium* sp. ZD-Z1 的壳聚糖酶的分子量为 115 ku<sup>[32]</sup>。将经过硫酸铵分级沉淀,DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析收集到的壳聚糖酶溶液,进行 SDS-PAGE 电泳分析,分析结果如图 3

所示。经过硫酸铵分级沉淀后的凝胶电泳条带明显得到了初步纯化,但目标蛋白颜色较淡,有少许杂蛋白条带,经过离子交换层析和凝胶过滤层析收集到的酶液显示为明亮单一蛋白条带,与 Marker 中相对应蛋白分子量进行比较,CsnSH50 的分子量在 41 ku 左右。

## 2.3 温度对 CsnSH50 的影响及温度稳定性

温度是酶活性最重要的指标之一,大多数报道的壳聚糖酶是不耐热的,热稳定较好的壳聚糖酶较少,高温条件下,反应进程加快,壳聚糖溶液的粘度下降,杂菌污染率低,产品纯度更高<sup>[33]</sup>。已有报道中,反应温度相对较高的有 *Streptomyces roseolus* DH<sup>[34]</sup>和 *Penicillium* sp. D-1<sup>[35]</sup>来源的壳聚糖酶,最适反应温度分别为 50 °C 和 48 °C。由图 4a 可知,CsnSH50 的酶活性在一定范围内随着温度升高逐渐升高,酶活性在 75 °C 时达到峰值,之后随温度继续升高,酶活性迅速下降,这可能与温度过高酶蛋白变性有关。由图 4b 可知,CsnSH50 在 50 °C 以下具有较好的温度稳定性,50 °C 时 CsnSH50 的酶活性开始随着时间逐步下降。CsnSH50 最适温度为 75 °C,证明其是一种嗜热性壳聚糖酶,且 CsnSH50 具备良好的热稳定性,更易储存。

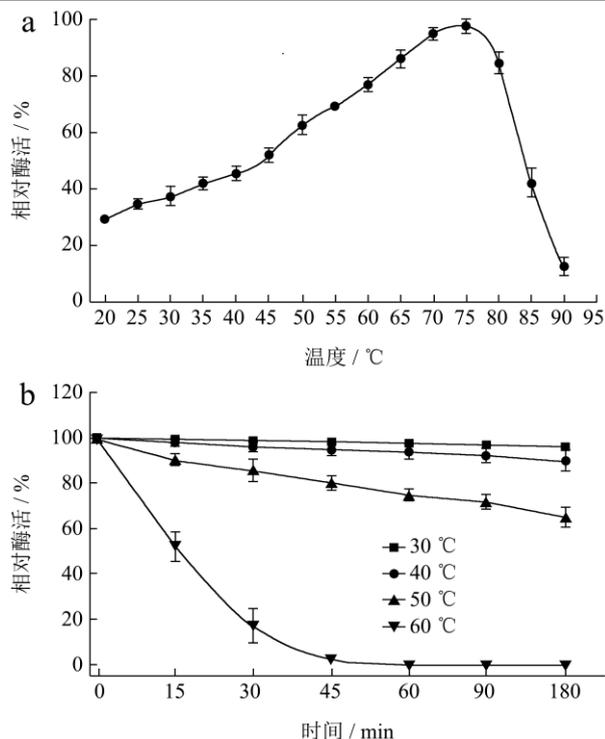


图4 CsnSH50 的最适温度 (a) 及温度稳定性 (b)

Fig.4 Optimum temperature (a) and temperature stability (b) of CsnSH50

## 2.4 pH 值对 CsnSH50 的影响及 pH 值稳定性

pH 值不仅影响蛋白的溶解性,还会影响酶活性中心必需基团的解离状态,过酸或过碱均会改变酶的空间结构从而改变酶蛋白的构象<sup>[36]</sup>。壳聚糖酶在水解壳聚糖时的解离 pH 值在 3.5 左右,但大多数壳聚糖酶在酸性条件下半衰期较短。由图 5a 可知,CsnSH50 在 pH 值 3.0~7.0 范围内具有较好的酶活性,pH 值 >7.0 时,随 pH 值升高,CsnSH50 的酶活性逐渐下降,这可能是因为 pH 值较高时壳聚糖的溶解性下降导致的。由图 5b 可知,CsnSH50 在 pH 值 2.5~8.5 之间较稳定,120 min 后相对酶活性依然在 80% 以上。这些结果表明,CsnSH50 能较长时间适应宽范围的 pH 值变动,且活性不受太大影响,具有很好的工业化应用能力。

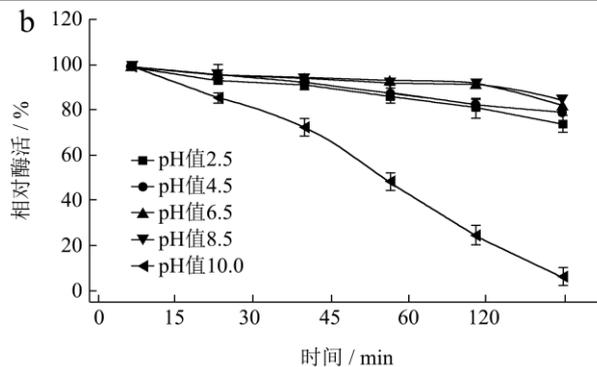
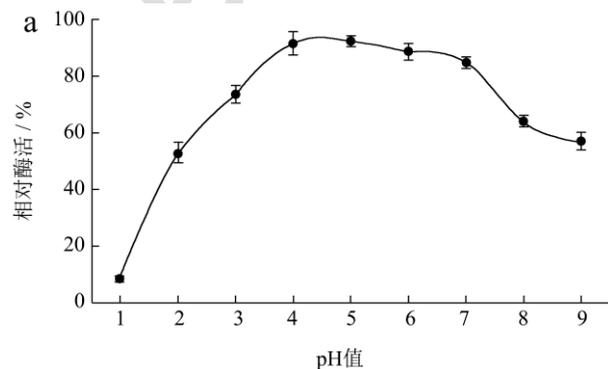


图5 CsnSH50 的最适 pH (a) 及 pH 稳定性 (b)

Fig.5 Optimum pH (a) and pH stability (b) of CsnSH50

## 2.5 CsnSH50 的动力学参数

将纯化后的 CsnSH50 稀释 200 倍,在 75 °C 和 pH 值 4.5 条件下,以 1、2、4、6、8、10 mg/mL 的胶体壳聚糖(脱乙酰度 ≥85)作为反应底物,分别测定 CsnSH50 的酶活性,以底物浓度的倒数和反应速率的倒数为 X、Y 轴绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。线性回归方程为  $y=0.058x+0.034$  ( $R^2=0.9992$ ),该曲线拟合较好,经过计算得到 CsnSH50 的  $V_{max}=29.41$  U/mL,  $K_m=1.71$  mg/mL。不同酶的  $K_m$  存在一定差异,同时  $K_m$  值越小表明酶与底物的亲和度越高。

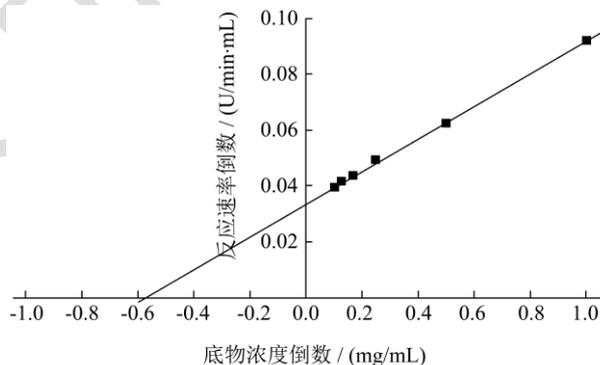


图6 CsnSH50 的酶反应动力学参数

Fig.6 Kinetic parameters of CsnSH50

## 2.6 不同金属离子对 CsnSH50 的影响

不同的金属离子可能会影响酶蛋白的中心构象,从而影响酶活性。已有报道中,大多数壳聚糖酶受到  $Cu^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  的抑制,受到  $Mn^{2+}$  的正向激活作用<sup>[37]</sup>。本文分别比较了 1、5、10 mmol/L 的不同金属离子对 CsnSH50 酶活性的影响,结果如图 7 所示。 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $K^+$ 、 $Mn^{2+}$  表现出较强的正向激活作用, $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Ag^+$  对 CsnSH50 酶活性影响不大, $Al^{3+}$ 、 $Co^{2+}$  则表现出抑制作用。1 mmol/L 的  $K^+$  表现出正向激活作用,但随着  $K^+$  浓度的逐渐升高,反而会逐渐抑制酶活性。值得注意的是,尚未见到 10 mmol/L 的  $Mn^{2+}$

对壳聚糖酶正向激活作用达到412%的相关文献报道。这些结果表明, CsnSH50 的酶活性容易受到金属离子的影响, 且其效果与金属离子的浓度密不可分, 同时也说明 CsnSH50 极有可能是一种新型壳聚糖酶。

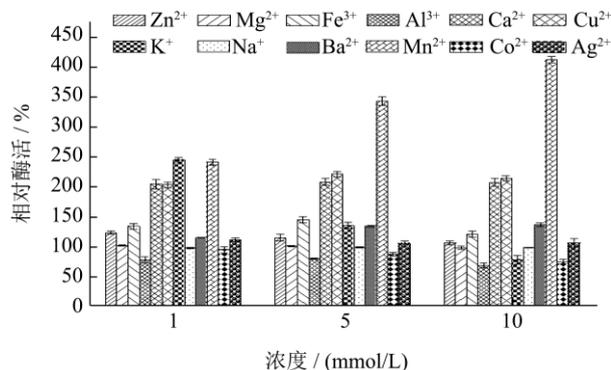


图7 不同金属离子对 CsnSH50 活性的影响

Fig.7 Effects of different metal ions on the activity of CsnSH50

### 2.7 CsnSH50 水解壳聚糖的产物分析

利用薄层层析色谱法 (TLC) 和电喷雾串联质谱 (ESI-MS) 分析 CsnSH50 水解壳聚糖产物中的寡糖分布, 结果如图 8 所示。由图 8a 可知, 降解 30 min 时, 产物中主要是二糖、三糖、四糖和五糖, 随着降解时间延长, 五糖逐渐增加, 随后被降解成二糖和三糖; 当降解时间为 180 min 时, 主要产物是二糖、三糖、四糖, 无单糖产生。电喷雾质谱 (ESI-MS) 结果

显示, 361 m/z、521 m/z、682 m/z 处分别代表不饱和二糖、三糖、四糖 (图 8b), 这与薄层层析结果一致。由此可以看出, CsnSH50 通过内切的方式作用于底物, 是一种内切酶。

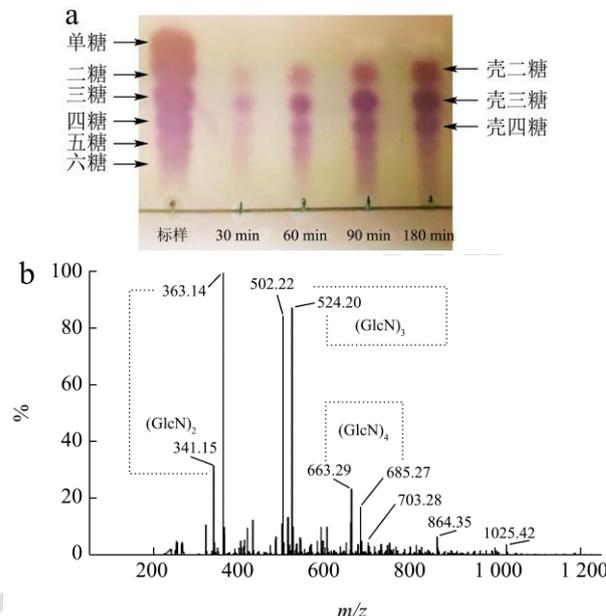


图8 CsnSH50 水解胶体壳聚糖的产物分析

Fig.8 Product analysis of CsnSH50 hydrolyzed colloidal chitosan

### 2.8 CsnSH50 制备壳寡糖

表3 不同初始 pH 值对壳寡糖产物的影响

Table 3 Effects of different initial pH on chitosan oligosaccharide products

处理	初始 pH 值	最终 pH 值	反应时间/min	壳寡糖产率/%	灰分率/%	平均聚合度
1	3.0	5.0	120	88.6±1.34 <sup>b</sup>	3.21±0.24 <sup>a</sup>	13.50±0.52 <sup>a</sup>
2	3.5	5.5	120	92.1±0.88 <sup>a</sup>	2.84±0.33 <sup>a</sup>	10.20±0.54 <sup>c</sup>
3	4.0	5.8	120	90.2±0.92 <sup>b</sup>	2.01±0.21 <sup>b</sup>	11.10±0.41 <sup>c</sup>
4	4.5	6.2	120	90.1±1.01 <sup>b</sup>	2.16±0.17 <sup>b</sup>	12.20±0.44 <sup>b</sup>

注: 同列肩标上的不同字母表示组间具有统计学差异 ( $p < 0.05$ )。

当壳聚糖质量分数超过 5% 时, 其粘度往往超过 800 mPa s, 因此利用壳聚糖酶工业化制备壳寡糖时应不高于该值。壳聚糖在水解时会导致体系的 pH 值逐渐升高, 不利于反应, 且反应时间过长也会导致壳聚糖酶逐渐失活。因此根据 CsnSH50 的最适反应 pH 值范围调节反应底物的初始 pH 值, 选用 120 min 作为反应时间。小试放大试验结果如表 3 所示, 处理 2 的反应初始 pH 值为 3.5, 反应 120 min, 产物最终 pH 值为 5.5, 壳寡糖产率达到 92.1%, 较其他处理具有显著性差异, 产物中的灰分率较处理 1 无显著差异, 但产物的平均聚合度为 10.20, 达到显著性差异。因此, 利用 CsnSH50 规模化制备壳寡糖时应调节初始 pH 值为 3.5 左右。

### 3 结论

本研究结果表明, *Mitsuaria* sp. SH-50 所产的壳聚糖酶粗酶液, 经 50% ~ 70% 硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析, 纯化后的 CsnSH50 比酶活力为 7 462.50 U/mg, 纯化倍数达到 5.99, 回收率 6.62%。壳聚糖酶 CsnSH50 的分子量约为 41 ku, 最适反应温度为 75 °C, 最适 pH 值为 4.5, 在 pH 值 2.5~8.5 及 50 °C 下稳定性较好。最适条件下, 稀释 200 倍后的 CsnSH50 的  $V_{max}$ =29.41 U/mL, 米氏常数  $K_m$ =1.71 mg/mL。Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>均表现出对 CsnSH50 的较强正向激活作用, 10 mmol/L 的 Mn<sup>2+</sup>对 CsnSH50 酶活性的

增强作用达到 412%。CsnSH50 水解壳聚糖产物中无单糖产生,表明 CsnSH50 是一种内切型壳聚糖酶。制备 4 L 含 5%壳寡糖溶液时,用冰醋酸调节初始 pH 值为 3.5, CsnSH50 添加量为 12.5 U/g,水解 120 min,寡糖产率可达 90%以上,产物平均聚合度为 10.2。

## 参考文献

- [1] Croisier F, Jéôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering [J]. *European Polymer Journal*, 2013, 49(4): 780-792
- [2] Tahtat D, Boutrig H H, Khodja A N, et al. The synergistic effect of gamma irradiation and alkaline soaking at low temperature on the pre-deacetylation of  $\alpha$ -chitin: Optimization by design of experiment [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 215: 39-46
- [3] 裴诺,施文正,汪之和.壳聚糖与生物保鲜剂复合使用在水产品保鲜中的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 448-454
- [4] 夏文水.壳聚糖的生理活性及其在保健食品中的应用[J]. *中国食品学报*, 2003, 1: 77-81
- [5] Ascimento J I G, Stamford T C M, Melo N, et al. Chitosan-citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1127-1135
- [6] Yang G, Sun H, Cao R, et al. Characterization of a novel glycoside hydrolase family 46 chitosanase, Csn-BAC, from *Bacillus* sp. MD-5 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 518-523
- [7] Benchamas G, Huang G, L Huang S Y, et al. Preparation and biological activities of chitosan oligosaccharides [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 107: 38-44
- [8] Naveed M, Phil L, Sohail M, et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827-843
- [9] 谷新晰,王晨笑,于宏伟,等.壳寡糖对泡菜品质、微生物多样及演替规律的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 125-132
- [10] 王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等.壳寡糖酶法糖基化修饰对玉米醇溶蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(8): 13-20
- [11] 王晓杰,曲悦,刘晓兰,等.酶法糖基化修饰对玉米醇溶蛋白促酒精代谢活性的影响[J]. *食品科技*, 2019, 44(6): 289-294
- [12] 庄林,操俊,李月婵,等.壳寡糖复合固体饮料对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用研究[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1-8[2022-10-28]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030551
- [13] 何孟莲,赵满达,孙得发,等.壳寡糖对泌乳中期奶牛生产性能、免疫及抗氧化功能的影响[J]. *中国饲料*, 2021, 24: 33-36
- [14] 徐宏蕾,王亚珍,谢晶,等.壳寡糖对壳聚糖—明胶复合膜的牛肉保鲜性能影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(10): 1048-1053
- [15] 赵倩,谢全喜,徐海燕,等.壳寡糖抑菌性能的研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(3): 44-47
- [16] Pechsrchuang 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
- [17] SUN Huihui, CAO Rong, LI Laihao, et al. Cloning, purification and characterization of a novel GH46 family chitosanase, Csn-CAP, from *Staphylococcus capitis* [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 75: 146-151
- [18] 朱恒,王超,张一驰,等.酶法制备壳寡糖工艺优化及抗氧化能力分析[J]. *安徽农学通报*, 2020, 26(6): 28-31
- [19] Han Y, Gao P, Yu W, et al. N-Terminal seven-amino-acid extension simultaneously improves the pH stability, optimal temperature, thermostability and catalytic efficiency of chitosanase CsnA [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 40(1): 75-82
- [20] Fukamizo T, Ohkawa T, Sonoda K, et al. Chitinous components of the cell wall of *Fusarium oxysporum* [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56(10): 1632-1636
- [21] Schoffemeer E, Klis F, Sietsma J, et al. The cell wall of *Fusarium oxysporum* [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 27(2-3): 275-285
- [22] Zevedo M I G, Oliveira S T, Silva C F B, et al. Secretory production in *Escherichia coli* of a GH46 chitosanase from *Chromobacterium violaceum*, suitable to generate antifungal chito-oligosaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 1482-1495
- [23] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 31(3): 426-428
- [24] ZHU Yanbing, WU Liyun, CHEN Yanhong, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. *Microbiological Research*, 2016, 182: 49-58
- [25] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [26] 刘琳,张杰,李鹏,等.分光光度法测定壳寡糖平均聚合度的

- 研究[J].食品科技,2010,35(9):318-321
- [27] Enzer S, Schild Hansjörg. Purification of large cytosolic proteases for *in vitro* assays: 20S and 26S proteasomes [J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J.), 2019, 1988: 1-14
- [28] 马靖峰,郭晓凤,刘欢,等.海洋细菌 *Renibacterium* sp. QD1 产壳聚糖酶发酵培养基的统计优化[J].食品工业科技, 2014,35(21):146-149
- [29] Choi Y J, Kim E J, Piao Z, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4522-4531
- [30] Guo N, Sun J, Wang W, et al. Cloning, expression and characterization of a novel chitosanase from streptomyces *Albolongus* ATCC 27414 [J]. *Food Chemistry*, 2019, 286: 696-702
- [31] 王杉杉.壳聚糖酶的制备及应用[D].大连:大连理工大学, 2016
- [32] 方文建,隋斯光,郑连英.青霉菌产壳聚糖酶制备低分子量壳聚糖的研究[J].中国医药工业杂志, 2006,2:85-88
- [33] CHEN Xiaomei, ZHAI Chao, KANG Lixin. High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(4): 689-694
- [34] Xiayun Jiang, Daochun Chen, Liehuan Chen, et al. Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin [J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 355: 40-44
- [35] Zhu Xufen, Tan Haiqin, Zhu Chu, et al. Cloning and overexpression of a new chitosanase gene from *Penicillium* sp. D-1 [J]. *AMB Express*, 2012, 2(1): 13
- [36] 季更生,陈爱春.微生物壳聚糖酶的研究进展[J].食品科学, 2010,31(3):297-301
- [37] 韩玉娟,王华,路新枝.壳聚糖酶的研究进展[J].中国海洋药物, 2018,37(2):88-96