

萎缩芽孢杆菌酸碱耐受性壳聚糖酶的表达及酶学性质分析

杜文娟, 阿瓦古丽·图尔荪, 董志琴, 马惠娟, 马正海*

新疆大学 生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

杜文娟, 阿瓦古丽·图尔荪, 董志琴, 马惠娟, 马正海. 萎缩芽孢杆菌酸碱耐受性壳聚糖酶的表达及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 352-362.

DU Wenjuan, TURSUN Awagul, DONG Zhiqin, MA Huijuan, MA Zhenghai. Expression and enzymatic characterization of a chitosanase with tolerance to a wide range of pH from *Bacillus atrophaeus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 352-362.

摘要: 为筛选鉴定具有良好稳定性的壳聚糖酶, 从源于贫瘠盐碱土壤的高产蛋白酶萎缩芽孢杆菌中克隆壳聚糖酶基因并在大肠杆菌中表达, 利用镍柱纯化等方法获得萎缩芽孢杆菌壳聚糖酶 (*Bacillus atrophaeus* chitosanase, BA-CSN), 并对 BA-CSN 的最适温度、最适 pH、底物特异性、动力学参数等性质进行表征。结果表明, BA-CSN 的分子量为 31.13 kDa, 最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 为 5.5, 在温度低于 45 °C、pH 4-9 时具有良好的稳定性, 且在 pH 为 3.0 和 10.0 时处理 4 h 以内也具有较好的稳定性; K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 对 BA-CSN 具有激活作用, 其中 Mn^{2+} 的激活作用最为显著, 而 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对 BA-CSN 有抑制作用; BA-CSN 水解胶体壳聚糖的相对酶活最高, 对胶体几丁质也有较好的酶解能力; 在最适催化条件下, BA-CSN 对胶体壳聚糖催化反应的米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} 分别为 9.94 mg/mL、26.624 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。本研究证明 BA-CSN 对酸碱有较强的耐受性, 具有广阔的工业应用前景。

关键词: 萎缩芽孢杆菌; 壳聚糖酶; 表达纯化; 酶学性质; 酸碱耐受性

Expression and enzymatic characterization of a chitosanase with tolerance to a wide range of pH from *Bacillus atrophaeus*

DU Wenjuan, Tursun Awagul, DONG Zhiqin, MA Huijuan, MA Zhenghai*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Urumqi 830017, Xinjiang, China

Abstract: To screen and identify a chitosanase with high stability, we cloned the chitosanase

资助项目: 国家自然科学基金(41761096)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41761096).

*Corresponding author. E-mail: mzhxju@xju.edu.cn

Received: 2024-03-01; Accepted: 2024-05-31; Published online: 2024-06-04

gene from *Bacillus atrophaeus* with a high protease yield from the barren saline-alkali soil and expressed this gene in *Escherichia coli*. The expressed chitosanase of *B. atrophaeus* (BA-CSN) was purified by nickel-affinity column chromatography. The properties including optimal temperature, optimal pH, substrate specificity, and kinetic parameters of BA-CSN were characterized. The results showed that BA-CSN had the molecular weight of 31.13 kDa, the optimal temperature of 55 °C, the optimal pH 5.5, and good stability at temperatures below 45 °C and pH 4.0–9.0. BA-CSN also had good stability within 4 h of pH 3.0 and 10.0, be activated by K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Co^{2+} , (especially by Mn^{2+}), and be inhibited by Fe^{3+} , Cu^{2+} , and Ag^+ . BA-CSN showcased the highest relative activity in the hydrolysis of colloidal chitosan, and it had good hydrolysis ability for colloidal chitin. Under the optimal catalytic conditions, BA-CSN demonstrated the Michaelis constant K_m and maximum reaction rate V_{max} of 9.94 mg/mL and 26.624 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, respectively, for colloidal chitosan. In short, BA-CSN has strong tolerance to acids and alkali, possessing broad industrial application prospects.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*; chitosanase; expression and purification; enzymatic properties; pH tolerance

壳聚糖具有独特的结构和功能,是由乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键组成的线性聚合物,广泛存在于节肢类动物、真菌及藻类中^[1]。壳聚糖具有生物降解性、生物相容性、无毒性等特性以及抑菌、抗癌、降脂、增强免疫等多种生理功能,在食品、农业、医疗等领域广泛应用^[2]。壳聚糖高分子质量的特性使其在自然状态下非常稳定。因其分子间具有很强的氢键作用而导致其水溶性差,因此未降解的壳聚糖难以被直接利用,而经降解的壳寡糖具有良好的水溶性,易被机体吸收^[3]。

目前,壳寡糖的制备方法有化学法、物理法、酶解法^[4],其中酶降解法反应条件温和、对环境友好、产物相对分子量容易控制,在壳寡糖工业化制备中发挥重要作用^[5]。壳聚糖酶(chitosanase, CSN)是一种用于降解壳聚糖糖苷的水解酶^[6],广泛分布于细菌、真菌中^[7],近年来对 CSN 的研究集中在芽孢杆菌(*Bacillus*)^[8]、土地杆菌(*Pedobacter*)^[9]和链霉菌(*Streptomyces*)^[10]中。目前,商业用途和用于工业化生产的 CSN 较少,主要原因之一是多数酶温度和 pH 适应

能力较弱。具有良好酶活和稳定性的 CSN 可从多种生境的微生物中筛选,亦可通过基因改造获得,如郭静等^[11]通过突变 C 端提高了 CSN 的热稳定性及催化活性。在工业应用中反应液的 pH 会随着反应的进行而变化,造成不利影响,所以工业中会用一些化学方法解决 pH 变化带来的负面作用,但化学方法会对酶和底物造成影响,降低反应效率,如 Kulish 等^[12]利用乙酸降低壳聚糖黏度导致壳聚糖结构发生了变化,因此目前亟须寻找具有温度和酸碱耐受性的 CSN。

前期本课题组从我国新疆乌鲁木齐市河马泉新区贫瘠盐碱土壤中分离得到一株高产蛋白酶的萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)^[13],其所产酶具有耐高温、耐盐碱等性质,本文通过 PCR 扩增获得该萎缩芽孢杆菌壳聚糖酶(*Bacillus atrophaeus* chitosanase, BA-CSN)基因,将其克隆入原核表达质粒 pET-28a(+),以大肠杆菌为表达宿主对其进行诱导表达得到 BA-CSN,并对其酶学性质研究,以期拓展 CSN 资源及其产业化应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

产酶萎 缩芽孢杆菌由实验室前期从新疆维 吾尔自治区乌鲁木 齐市河马泉新区贫瘠盐碱土 壤中分离获得^[13]；大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)和质粒 pET-28a(+)均 为实验室保存。

1.2 主要试剂

壳聚糖、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司；DNA marker、 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 高保真 酶、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司；咪唑购自上海山浦化工有限公司； Ni-NTA 镍柱购自南京金斯瑞生物科技有限公 司；其他化学试剂均为国产分析纯。

1%胶体壳聚糖：1 g 壳聚糖溶于 25 mL 的 1%的乙酸溶液中，加入适量的碱液，校正 pH 值在 5.5–5.8 之间，补去离子水到 100 mL。

1.3 壳聚糖酶基因克隆与表达载体构建

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取萎 缩芽孢杆菌基因组 DNA，根据 NCBI 数据库中萎 缩芽孢杆菌 CSN 基因序列设计引物 BA-CSN-F (5'-CGGGATCCCGCACCTTGATGATGAACGA TACGG-3'，下划线为 *Bam*H I)和 BA-CSN-R (5'-CCGCTCGAGCTCATCGCTTCTTACTTGAT TACG-3'，下划线为 *Xho* I)，以萎 缩芽孢杆菌基 因组 DNA 为模板扩增 CSN 基因。以 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别酶切 PCR 扩增的 BA-CSN 和 pET-28a(+)，用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回 收纯化 BA-CSN 基因片段和线性化的 pET-28a(+)，再将两者用 T4 DNA 连接酶进行连 接，连接产物转入大肠杆菌感受态细胞，提取 重组质粒并送生工生物工程(上海)股份有限公 司测序鉴定，鉴定正确的重组质粒命名为

pET-28a-BA-CSN。

1.4 壳聚糖酶的诱导表达

通过热激转化将 pET-28a-BA-CSN 转入大 肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，鉴定正确的转化菌 株于 37 °C 过夜培养，再转接至新培养基中 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.5–0.6，加入诱导剂 IPTG，28 °C 诱导 4 h。诱导前和诱导后样品分别进行 SDS- PAGE，具体步骤如下：样品与 2 \times 蛋白上样缓冲 液 1:1 混匀后，沸水浴 10 min，待冷却至室温后 取 10 μ L 混合液和 5 μ L 蛋白 marker 进行电泳， 条件为：电压 90 V，30 min；电压 120 V，1.5 h。

1.5 壳聚糖酶纯化

诱导表达后收集菌液，8 000 r/min、4 °C 离 心 20 min 收集菌体，用 PBS 溶液洗涤 2 次，同 等条件下离心，菌体在冰浴条件下脉冲式超声 波破碎(100 W，工作 3 s，暂停 3 s) 30 min。之 后 8 000 r/min、4 °C 离心 20 min，以上清为粗 酶液进行镍柱纯化，具体步骤如下：用 5 倍柱 体积的咪唑溶液平衡镍柱，粗酶液用 0.45 μ m 滤膜过滤后上样，水平摇床中轻微振荡处理 3 h， 收集穿流液，以不同浓度咪唑溶液洗脱，经 SDS-PAGE 检测确定最佳洗脱浓度，洗脱液经 梯度透析后进行定量。

1.6 壳聚糖酶活和蛋白浓度测定

以 3,5-二硝基水杨酸比色法(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS 法)^[14]测定重组酶活性，通过测定 490 nm 处吸光度计算酶活。反应体系：0.9 mL 1%胶体壳聚糖，0.1 mL 酶液(视情况可进行稀 释)，1 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液，37 °C 反应 15 min。 以煮沸 10 min 灭活的酶作为对照。酶活定义为： 在上述反应条件下每 min 产生 1 μ mol 还原糖所 需酶量。蛋白浓度测定采用 BAC 蛋白浓度测定 试剂盒。

1.7 壳聚糖酶最适温度和温度稳定性

选择 30–75 °C (间隔 5 °C)作为反应温度，

取等量相同浓度酶液测定 BA-CSN 在不同温度条件下的酶活,以最高酶活为 100%,根据不同温度下的相对酶活确定 BA-CSN 的最适温度。取等量相同浓度酶液分别在上述温度下孵育 30 min、1 h、2 h、4 h,加入底物和缓冲液,在 55 °C 条件下反应 15 min,测定残余酶活,分析 BA-CSN 温度稳定性。

1.8 壳聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性

配制不同 pH 的 0.2 mol/L 的缓冲液,包括乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 2.0–5.5)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)和 Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0–11.0)。

取等量相同浓度酶液测定 BA-CSN 在上述 pH 2.0–8.0 条件下的酶活,以最高酶活为 100%,根据不同 pH 值的相对酶活确定 BA-CSN 最适 pH。取等量相同浓度酶液分别在上述 pH 条件下分别孵育 30 min、1 h、2 h、4 h、6 h,加入底物和缓冲液,在 55 °C 条件下反应 15 min,测定残余酶活,分析 BA-CSN pH 稳定性。

1.9 金属离子对壳聚糖酶酶活的影响

分别选取 K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Ag^+ 配制成 20 mmol/L 溶液,将不同金属离子溶液加入到等量酶液中,至金属离子终浓度分别为 1、5、10 mmol/L,4 °C 孵育 30 min,加入底物和乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.5),在 55 °C 条件下反应 15 min 后测定 BA-CSN 酶活。以不加任何金属离子的溶液为对照组。

1.10 酶的底物特异性

分别以 1% 的胶体壳聚糖、羧甲基壳聚糖、粉末壳聚糖、胶体几丁质、羧甲基纤维素钠和可溶性淀粉为底物,在 pH 5.5、温度为 55 °C 条件下测 BA-CSN 酶活,分析该酶底物特异性。

1.11 壳聚糖酶的动力学参数测定

在 pH 5.5、55 °C 条件下,分别在终浓度为 2、4、6、8、10、12、14 mg/mL 的 900 μ L 胶体壳聚糖溶液中加入 100 μ L 稀释的 BA-CSN 酶

液,反应 10 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,求出壳聚糖酶的 V_{max} 和 K_m 值。

1.12 TLC 薄层层析水解产物分析

取 1% 的胶体壳聚糖 9 mL,加入 1 mL 壳聚糖酶液,在最适反应条件下水解 2 h 后,沸水浴 10 min,待自然冷却至室温,8 000 r/min 离心 10 min,取上清用毛细管点样于硅胶板,同时以 D-氨基葡萄糖盐酸盐溶液作为对照,吹干后置于层析缸内充分展开,展开剂为异丙醇:25% 氨水:水=15:7.5:1。取出硅胶板,待充分干燥后,均匀喷洒显色剂(0.5% 的茚三酮乙醇溶液),吹干后置于 110 °C 烘箱显色,观察形成的斑点。

1.13 数据处理

实验中每个处理重复 3 次,数据用 SPSS Statistics 2.0 进行统计分析,利用 Prism 和 Excel 进行数据分析和图表绘制。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖酶基因序列分析与原核表达质粒构建

克隆的 BA-CSN 基因共编码 252 个氨基酸,与已公布 CSN 序列的一致性较高(图 1A),与一株萎缩芽孢杆菌 CSN (GenBank 登录号:ATO28833.1)相比,同源性的 99.60%,206 位丝氨酸(S)替换为丙氨酸(A);与另一株萎缩芽孢杆菌 CSN (NCBI reference sequence: WP_106271432.1)相比,同源性的 98.81%,除 206 位发生上述氨基酸替换外,193 位谷氨酸(E)替换为赖氨酸(K);而与枯草芽孢杆菌 CSN (PDB: 7C6C)相比有多处差异,同源性的 88.43%,且枯草芽孢杆菌 CSN 氨基端缺失 10 个氨基酸。经 ScanProsite 功能域查找显示第 22–62 位为壳聚糖酶 46 和 80 家族活性位点,该酶相对分子量

28.16 kDa, 理论等电点为 5.84。采用同源建模预测壳聚糖酶的结构, 选取同源性较高的壳聚糖酶 CsnMY002 (PDB: 7C6C)为模板, 利用 SWISS-MODEL 对壳聚糖酶进行建模, 并在 PyMOL 软件上进行可视化分析, 以同样的方法对

WP_106271432.1)建模, 结果见图 1B, BA-CSN 壳聚糖酶的三维构象可分为上下两个半球, 上下两个半球通过 1 个 α 螺旋连接, 其中 206 位氨基酸残基位于底物结合口袋的入口附近。原核表达质粒 pET-28a-BA-CSN 经酶切产生约 750 bp 的 DNA 片段(图 1C), 与预期相符。

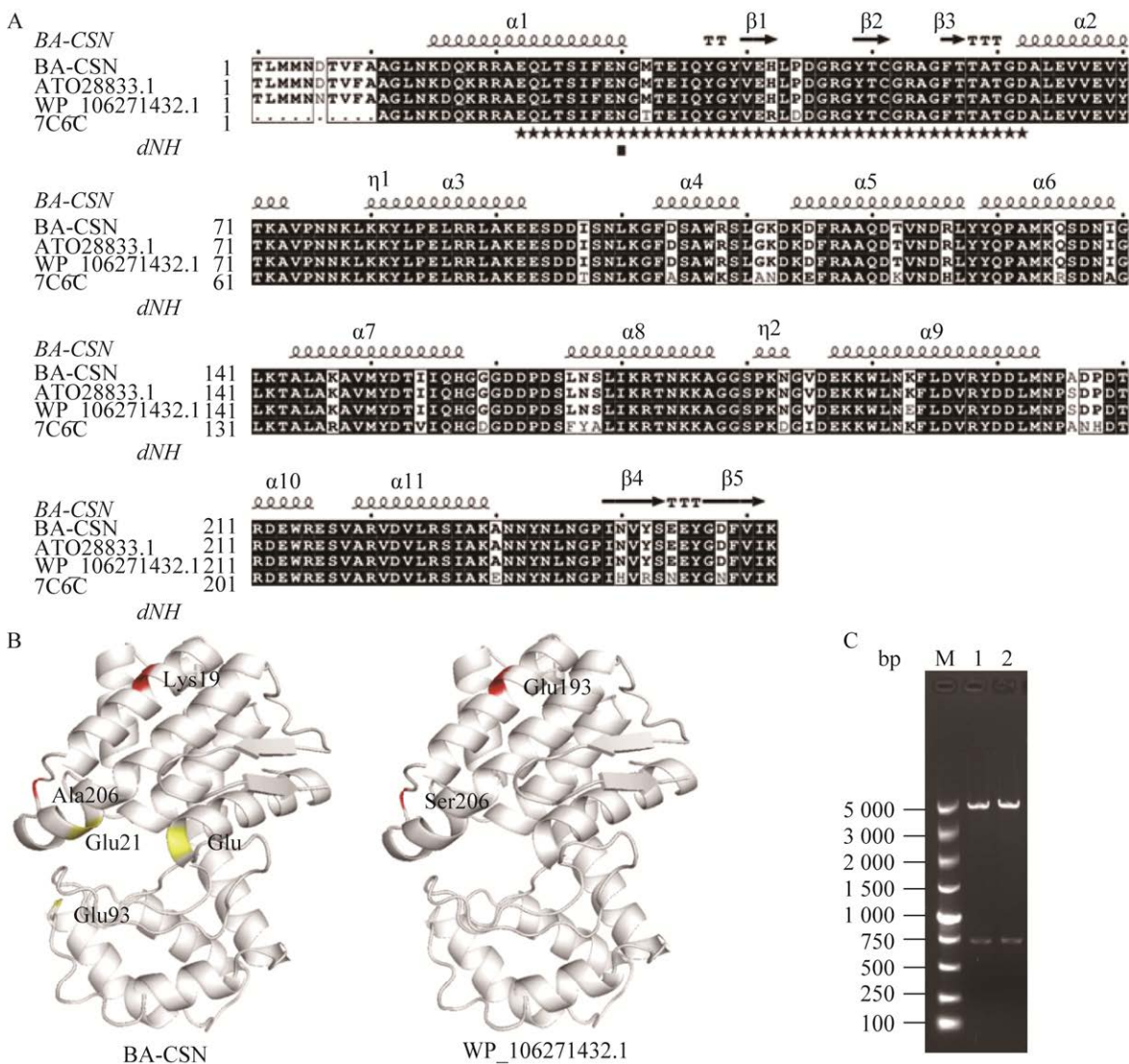


图 1 壳聚糖酶基因序列分析与原核表达质粒构建

Figure 1 Sequence analysis of chitinase gene and constructing its prokaryotic expression plasmid. A: Chitinase secondary structure (above) and amino acid sequence alignment (under). “★” represents the active site, “■” represents the Mn^{2+} binding site, “•” is used for counting amino acids, and there are 10 amino acids between two “•”. B: Chitinase homology modeling and tertiary structure prediction. On the left is BA-CSN, the three glutamate residues near the substrate binding pocket are marked in yellow; on the right is the reference CSN; the mutant amino acid residues are red. C: Restriction endonuclease analysis of pET-28a-BA-CSN. M: DNA marker; Lane 1–2: *Bam*H I and *Xho* I digestion products.

2.2 壳聚糖酶诱导表达及纯化

在 55 °C、pH 5.5 条件下诱导表达得到分子量约 31.13 kDa 的蛋白(图 2), 与融合蛋白的理论分子量相符。200 mmol/L、250 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑均能达到理想的洗脱效果, 根据 BCA 蛋白浓度测定方法得到的线性回归方程 $y=0.001x+0.2036$, 纯化的蛋白质浓度为 0.964 mg/mL。将蛋白浓度稀释到 0.1 mg/mL, 用 DNS 法测得比酶活为 57.77 U/mg。

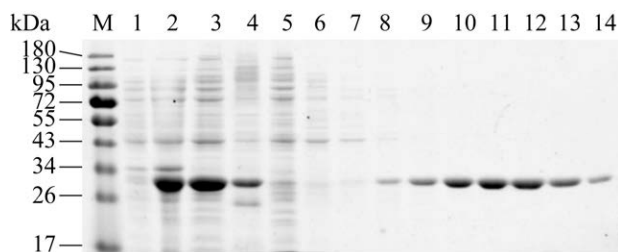


图 2 壳聚糖酶诱导表达与纯化

Figure 2 Inducible expression and purification of chitosanase. M: Protein ladder. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: Ultrasonic lysis supernatant; Lane 4: Ultrasonic lysis of the pellet; Lane 5: Flow-through fluid collected prior to elution; Lane 6–14: Different concentrations of imidazole solution are eluted (20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 and 500 mmol/L).

2.3 壳聚糖酶最适反应温度与温度稳定性

由图 3A 可知, 反应温度从 30 °C 升至 75 °C 时 BA-CSN 酶活呈先增后减趋势, 75 °C 时酶活性完全丧失, 55 °C 为最适反应温度。温度稳定性见图 3B, BA-CSN 在 30–45 °C 具有极强的稳定性, 50 °C、240 min 后仍保持 60% 以上的残余酶活, 55 °C 及以上温度时酶活急剧下降, 75 °C 时, 60 min 内酶活性已丧失。

2.4 壳聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性

由图 4A 可知, BA-CSN 最适反应 pH 为 5.5; pH 为 4.0 和 5.0 时残余酶活均在 80% 以上, pH 为 3.0 和 6.0 时残余酶活均在 40% 以上, 其余 pH 值条件下残余酶活均低于 40%。pH 稳定性见图 4B, pH 值在 4.0–6.0 之间时, 处理 6 h 时残余酶活均保持在 70% 以上, 说明该酶在中性和弱酸性条件下酶活性均较强。pH 值在 3.0–10.0 之间时, 处理 1 h 残余酶活均保留在 70% 以上, 处理 2 h 均保留在 60% 以上; pH 值在 4.0–9.0 之间时, 处理 6 h 残余酶活均保留在 60% 以上, 且 pH 为 10.0 处理 6 h 时残余酶活保持在 40% 以上; 以上结果说明该酶在弱酸性和弱碱性条件下均具有较好的稳定性。

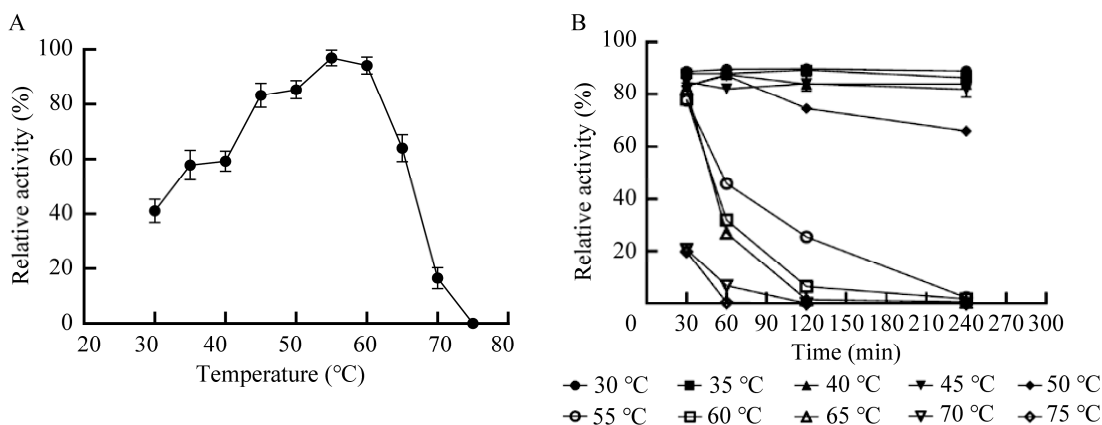


图 3 壳聚糖酶的最适温度(A)及温度稳定性(B)

Figure 3 Optimum reaction temperature (A) and temperature stability (B) of chitosanase.

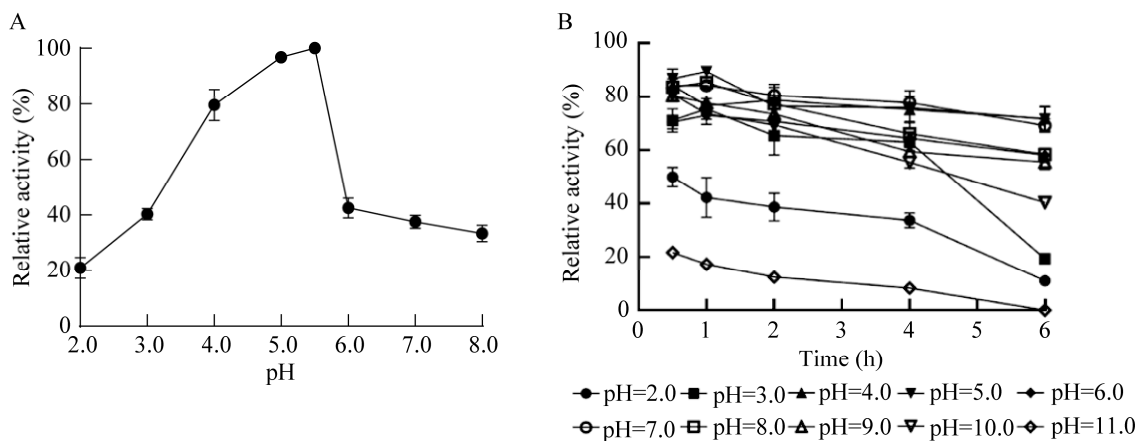


图4 壳聚糖酶的最适 pH(A)及 pH 稳定性(B)

Figure 4 Optimal reaction pH (A) and pH stability (B) of chitosanase.

2.5 金属离子对壳聚糖酶的影响

不同浓度金属离子对 BA-CSN 活性影响如图 5 所示, K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 对该酶均有一定程度激活作用, 其中 Mn^{2+} 激活效果最明显, 5 mmol/L 和 10 mmol/L Mn^{2+} 可分别将酶活性提高至 135% 与 145%, 均极显著高于对照组, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 次之,

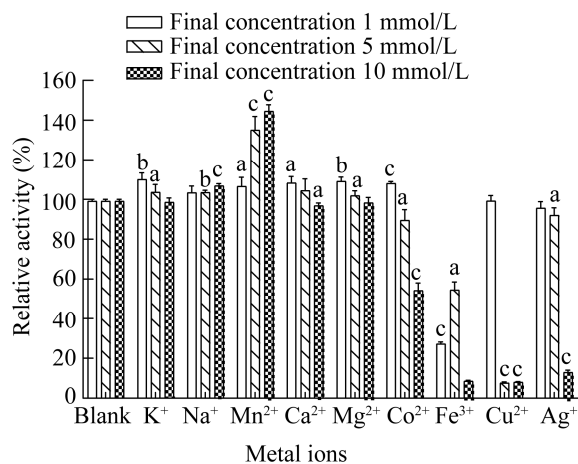


图5 金属离子对壳聚糖酶活性的影响

Figure 5 The influence of metal ions on chitosanase activity. a, b, and c were the significant differences in relative enzyme activity between BA-CSN and blank at the same metal ion concentration. a: $0.01 < P < 0.05$; b: $0.001 < P < 0.01$; c: $P < 0.001$.

其中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 随着浓度升高抑制了酶活, 加入 10 mmol/L Co^{2+} 时酶活极显著低于对照组; Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对该酶有明显抑制作用, 且随浓度升高抑制作用增强, 10 mmol/L 时残余酶活均极显著低于对照组。

2.6 壳聚糖酶底物特异性

BA-CSN 底物特异分析结果如图 6 所示, 该酶对 1% 的胶体壳聚糖、羧甲基壳聚糖、羧甲

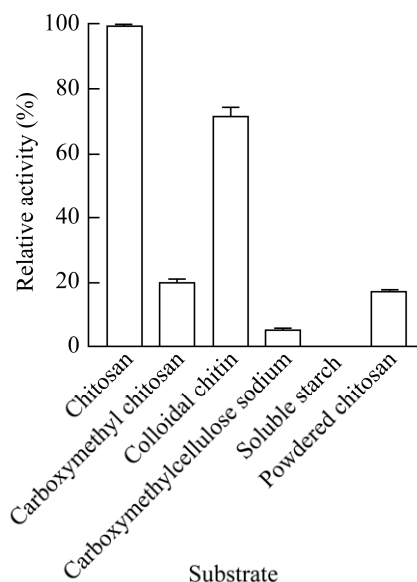


图6 壳聚糖酶的底物特异性

Figure 6 Substrate specificity of chitosanase.

基纤维素钠和粉末壳聚糖均有一定酶解能力,其酶解胶体壳聚糖的活性最高(相对酶活设定为 100%),对胶体几丁质的相对酶活亦达到 70%以上,但该酶对可溶性淀粉无降解能力。

2.7 壳聚糖酶的动力学常数测定

根据 BA-CSN 催化胶体壳聚糖水解反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线(图 7),得到直线回归方程为 $y=0.3735x+0.03756$,根据该方程计算出该酶米氏常数 $K_m=9.94\text{ mg/mL}$,最大反应速率 $V_{\max}=26.624\text{ }\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。

2.8 薄层层析分析酶解产物

BA-CSN 降解胶体壳聚糖的产物分析如图 8 所示,酶解产物与 D-氨基葡萄糖标准品处在

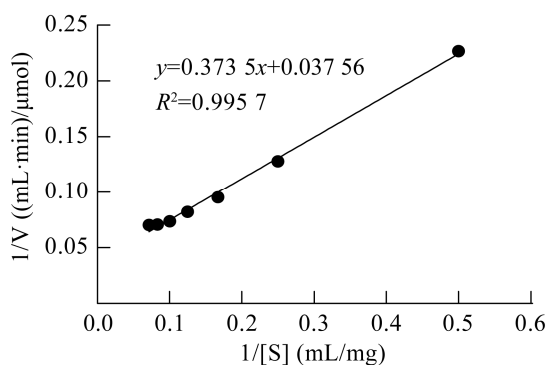


图 7 壳聚糖酶催化动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图

Figure 7 Lineweaver-Burk double reciprocal diagram of chitosanase catalytic kinetics.



图 8 BA-CSN 降解产物的薄层层析分析

Figure 8 Thin-layer chromatography analysis of BA-CSN degradation products. Lane 1: Glucosamine standard; Lane 2: Enzymatic hydrolysate.

相近位置,且只有 1 个显色点,说明 BA-CSN 降解胶体壳聚糖的最终产物为氨基葡萄糖。

3 讨论与结论

壳聚糖的食品工业制备依赖于从各类环境中的微生物中筛选获得的酶活高、稳定性强的 CSN。本研究自贫瘠盐碱土壤高产蛋白酶萎缩芽孢杆菌中获得 CNS 基因,将其在大肠杆菌中表达纯化并研究其酶活性,以期获得稳定性强、适用于工业生产的 CSN。结果显示该酶的最适反应温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,在 $30\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定性极强(图 3),最适反应温度和温度稳定性与已报道的芽孢杆菌等菌株 CNS 的特性相似^[3-4,15-17],温度稳定性高的 CNS 可降低壳聚糖酶工业生产成本、促进壳聚糖生物转化,是壳聚糖工业应用的关键之一。CSN 最适反应 pH 通常在 $4.0\text{--}8.0$ 之间,如链霉菌(*Streptomyces lydicus*) S1^[18]、水杆菌(*Aquabacterium* sp.)^[19]源 CSN 最适反应 pH 分别为 6.0 和 5.0 ,但也有 CSN 最适 pH 达到 9.5 ^[20]。据报道一些 CSN 在酸性条件下较稳定,如蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[21]和草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) M2^[22]源 CSN 在 pH 为 $4.5\text{--}7.5$ 之间较稳定,然而二者在碱性环境中酶活大幅度降低。近期有研究表明苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)源 CSN 酸碱适应范围较广,pH 在 $5.0\text{--}10.5$ 之间均保留较高的酶活^[23]。本研究中 BA-CSN 最适反应 pH 为 5.5 ,在中性和弱酸性条件下酶活性均较强,在酸性和碱性条件下均具有较好的稳定性,即使在 pH 为 3.0 和 10.0 的强酸强碱处理 1 h 仍保留 70% 以上残余酶活(图 3),该特性较已报道的 CSN 有明显优势,在壳聚糖工业生产中具有潜在应用前景。

本研究发现多种金属离子可增加 BA-CSN 酶活,其中尤以 Mn^{2+} 最为显著, 5 mmol/L 和 10 mmol/L Mn^{2+} 均极显著提高了酶活;亦有几

种金属离子可抑制酶活, 其中 10 mmol/L Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 处理后的残余酶活均极显著低于对照组(图 5), 以上结果提示该酶在实际应用中可通过调整反应液离子组成及其浓度提高酶活。金属离子可通过多种方式影响 CSN 酶活, 如通过与 CSN 蛋白质结构互作影响酶活, Tottey 等^[24]研究发现 Mn^{2+} 通过与 3 个组氨酸和 1 个谷氨酸所形成的结构域紧密结合促进酶活, 且 Cu^{2+} 与该结构域结合力降低并抑制酶活, 根据序列分析发现 BA-CSN 中亦有类似结构域, Mn^{2+} 与第 30 位天冬酰胺紧密结合, 其可能是 Mn^{2+} 促进 BA-CSN 酶活和 Cu^{2+} 等抑制酶活的主要机制。另外, CSN 亦可通过改变 CSN 中的电荷分布以及酶和底物结合力而影响酶活, Ag^+ 和 Fe^{3+} 改变 CSN 酶活即是通过这种方式^[25], 本研究中这两种离子同样抑制了 BA-CSN 酶活。

根据氨基酸序列分析, BA-CSN 与已报道的萎缩芽孢杆菌 CSN (NCBI reference sequence: WP_106271432.1)相比发生了 206 位 S→A 的替换和 193 位 E→K 的替换, 虽未明显改变 BA-CSN 的蛋白质结构(图 1B), 但 206 位在底物结合口袋附近, 193 位由酸性氨基酸替换为碱性氨基酸, 这 2 个位点的替换可能影响 BA-CSN 酸碱耐受性和对金属离子的响应等酶学特性, 但仍有待进一步研究证实。

目前, 芽孢杆菌来源的壳聚糖酶多为内切型, 如 Jiang 等^[26]报道的枯草芽孢杆菌来源的壳聚糖酶、Wang 等^[27]报道的副芽孢杆菌来源的壳聚糖酶与梁颖等^[28]报道的蜡样芽孢杆菌来源的壳聚糖酶都属于内切型壳聚糖酶, 水解产物未出现单糖, 而本研究的 BA-CSN 水解产物为氨基葡萄糖, 与大多数芽孢杆菌来源的壳聚糖酶水解底物的方式不同, 壳聚糖酶水解底物的方式和水解产物的聚合度对研究壳聚糖酶的功能至关重要^[29], 该特性的形成机制尚待进一步研究。

步研究。

总之, 本研究从贫瘠盐碱土壤的萎缩芽孢杆菌中获得 BA-CSN, 并在大肠杆菌中表达纯化, 结果表明该酶具有较强的酸碱耐受性, 且多种金属离子可显著影响其酶活, 具有应用于工业制备的潜力。

REFERENCES

- [1] 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 BS, CUI DD, SHEN H. 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 (in Chinese).
- [2] 许炎芬, 贾子民, 段先莉, 龙同, 李文静, 赵锦芳. 产壳聚糖酶微生物菌株选育研究进展[J]. 中南农业科技, 2022, 43(3): 144-148.
XY YF, JIA ZM, DUAN XL, LONG T, LI WJ, ZHAO JF. Research progress on the breeding of chitosanase-producing microbial strains[J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2022, 43(3): 144-148 (in Chinese).
- [3] 严寅琿, 鲁晶娣, 黄锦翔, 丰丕雪, 凌瑶, 易弋. 中村芽孢杆菌壳聚糖酶在大肠杆菌中重组表达及酶学性质[J]. 中国食品学报, 2022, 22(9): 74-81.
YAN YH, LU JD, HUANG JX, FENG PX, LING Y, YI Y. Recombinant expression and enzymatic characterization of *Bacillus nakamurai* chitosanase in *Escherichia coli*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(9): 74-81 (in Chinese).
- [4] 李甜, 丁志雯, 刘耀东, 朱容均, 张唯, 黄志发, 房耀维, 刘妹. 产壳聚糖酶海洋 *Paenibacillus chitinolyticus* CLT08 的鉴定及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 132-138.
LI T, DING ZW, LIU YD, ZHU RJ, ZHANG W, HUANG ZF, FANG YW, LIU S. Identification and enzymatic properties of chitosanase producing marine *Paenibacillus chitinolyticus* strain CLT08[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 132-138 (in Chinese).
- [5] 谢杰, 李玉斌, 刘京伟, 苟艳, 王刚刚. 壳聚糖酶结构与功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 912-929.
XIE J, LI YB, LIU JW, GOU Y, WANG GG. Advances in the structure and function of chitosanase[J]. Chinese

- Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 912-929 (in Chinese).
- [6] 段杉. 无花果沙雷氏菌壳聚糖酶的生化性质及产酶条件的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
DUAN S. Characterization and fermentation of chitosanase from *Serratia ficaria* CH0203[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2003 (in Chinese)
- [7] PANG YX, YANG JJ, CHEN XY, JIA Y, LI T, JIN JH, LIU H, JIANG LS, HAO YL, ZHANG HX, XIE YH. An antifungal chitosanase from *Bacillus subtilis* SH21[J]. Molecules, 2021, 26(7): 1863.
- [8] PECHSRICHUANG P, LORENTZEN SB, AAM BB, TUVENG TR, HAMRE AG, EIJSINK VGH, YAMABHAI M. Bioconversion of chitosan into chito-oligosaccharides (CHOS) using family 46 chitosanase from *Bacillus subtilis* (BsCsn46A)[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 186: 420-428.
- [9] SONG YS, SEO DJ, JUNG WJ. Characterization and antifungal activity of chitosanase produced by *Pedobacter* sp. PR-M6[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 129: 277-283.
- [10] MASSON JY, DENIS F, BRZEZINSKI R. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases[J]. Gene, 1994, 140(1): 103-107.
- [11] 郭静, 高文君, 朱小梅, 赵晗, 张欣, 王怡, 王芯樑, 赵希岳, 蔡志强. C-端设计定点突变提高 *Streptomyces avermitilis* 壳聚糖酶稳定性及催化活性[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2022, 34(5): 82-92.
GUO J, GAO WJ, ZHU XM, ZHAO H, ZHANG X, WANG Y, WANG XR, ZHAO XY, CAI ZQ. C-terminal design site-directed mutation improves the stability of *Streptomyces avermitilis* chitosanase[J]. Journal of Changzhou University (Natural Science Edition), 2022, 34(5): 82-92 (in Chinese).
- [12] KULISH EI, CHERNOVA VV, VOLODINA VP, KOLESOV SV. Peculiarities of viscometric studies of enzymatic hydrolysis of chitosan[J]. Inorganic Materials: Applied Research, 2014, 5(2): 164-167.
- [13] 阿瓦古丽·图尔荪, 张新强, 贲丰泽, 朱彦斌, 张磊, 杜文娟, 马正海. 乌鲁木齐市河马泉新区土壤微生物多样性及其影响因素分析[J]. 中国环境科学, 2023, 43(S1): 277-287.
TURSUN AWGL, ZHANG XQ, YUN FZ, ZHU YB, ZHANG L, DU WJ, MA ZH. Analysis of soil microbial diversity and its influencing factors in Hemaquan New District of Urumqi City[J]. China Environmental Science, 2023, 43(S1): 277-287 (in Chinese).
- [14] 孙玉英. 壳聚糖酶的性质及基因的克隆和表达研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
SUN YY. Study on the characterization, molecular cloning, and expression of a chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007 (in Chinese).
- [15] 单秋实. 壳聚糖酶高产菌株的筛选及酶学性质的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
SHAN QS. Screening of chitosanase-producing strain and study on its enzymatic properties[D]. Changchun: Jilin University, 2015 (in Chinese).
- [16] HIRANO K, ARAYAVEERASID S, SEKI K, ADAMS DJ, MITSUTOMI M. Characterization of a chitosanase from *Aspergillus fumigatus* ATCC 13073[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(8): 1523-1528.
- [17] ZHOU ZP, WANG X. Improve thermostability of *Bacillus* sp. TS chitosanase through structure-based alignment[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 15846.
- [18] CHEN H, LIN BL, ZHANG R, GONG ZL, WEN M, SU WM, ZHOU JS, ZHAO LZ, WANG JR. Controllable preparation of chitosan oligosaccharides via a recombinant chitosanase from marine *Streptomyces lydicus* S1 and its potential application on preservation of pre-packaged tofu[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1007201.
- [19] XIA CY, LI D, QI MY, WANG YX, ZHANG Y, YANG YH, HU ZJ, DU X, ZHAO YQ, YU K, HUANG Y, LI ZK, YE XF, CUI ZL. Preparation of chitoooligosaccharides with a low degree of polymerization and anti-microbial properties using the novel chitosanase AqCsn1[J]. Protein Expression and Purification, 2023, 203: 106199.
- [20] ZHANG XY, DAI AL, KUROIWA K, KODAIRA R, NOGAWA M, SHIMOSAKA M, OKAZAKI M. Cloning and characterization of a chitosanase gene from the koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(4): 977-981.
- [21] ZHANG RX, WU ZW, ZHANG SJ, WEI HM, HUA CW, LI L, YANG TY. Gene cloning and molecular characterization of a thermostable chitosanase from *Bacillus cereus* TY24[J]. BMC Biotechnology, 2022, 22(1): 30.
- [22] CAO SN, GAO P, XIA WS, LIU SQ, WANG B. A novel chitosanase from *Penicillium oxalicum* M2 for chitoooligosaccharide production: purification, identification and characterization[J]. Molecular Biotechnology, 2022, 64(9): 947-957.
- [23] AKTUGANOV GE, SAFINA VR, GALIMZIANOVA NF, GILVANOVA EA, KUZMINA LY, MELENTIEV AI, BAYMIEV AH, LOPATIN SA. Constitutive chitosanase from *Bacillus thuringiensis* B-387 and its potential for preparation of antimicrobial chitoooligomers[J]. World Journal of Microbiology and

- Biotechnology, 2022, 38(10): 167.
- [24] TOTTEY S, WALDRON KJ, FIRBANK SJ, REALE B, BESSANT C, SATO K, CHEEK TR, GRAY J, BANFIELD MJ, DENNISON C, ROBINSON NJ. Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding[J]. Nature, 2008, 455: 1138-1142.
- [25] 段静. 解淀粉芽孢杆菌 HZ-1510 壳聚糖酶基因的克隆、重组表达及其活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- DUAN J. Gene cloning, expression and activity analysis of chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-1510[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [26] JIANG ZQ, MA S, GUAN LY, YAN QJ, YANG SQ. Biochemical characterization of a novel bifunctional chitosanase from *Paenibacillus barengoltzii* for chitooligosaccharide production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(5): 83.
- [27] WANG YH, MO HJ, HU ZH, LIU BJ, ZHANG ZQ, FANG YW, HOU XY, LIU S, YANG G. Production, characterization and application of a novel chitosanase from marine bacterium *Bacillus paramycoides* BP-N07[J]. Foods, 2023, 12(18): 3350.
- [28] 梁颖, 刘睿, 宋超东, 谢俊杰, 殷豆豆, 许霞, 杨登峰, 张红岩, 申乃坤. 高产壳聚糖酶菌株筛选鉴定、条件优化及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2024: 1-15.
- LIANG Y, LIU R, SONG CD, XIE JJ, YIN DD, XU X, YANG DF, ZAHNG HY, SHEN NK. Screening and identification of high chitosanase producing strains, optimization of conditions and analysis of enzymatic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024: 1-15 (in Chinese).
- [29] SU HP, SUN JN, GUO CR, JIA ZR, MAO XZ. New insights into bifunctional chitosanases with hydrolysis activity toward chito- and cello-substrates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(20): 6168-6176.