

## 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

段静<sup>1</sup>, 刘广鑫<sup>1</sup>, 董晏君<sup>1</sup>, 周洋<sup>1</sup>, 李锦铨<sup>2</sup>, 刘小玲<sup>1</sup>,  
周萌<sup>3</sup>, 梁日深<sup>3</sup>, 赵丽娟<sup>1,3\*</sup>, 林鑫<sup>1,3\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;

3. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225)

**摘要:** 为了研究壳聚糖酶的水解活性, 实验进行了解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶基因编码序列的克隆, 并构建了谷胱甘肽转移酶(GST)-壳聚糖酶融合蛋白表达质粒, 在大肠杆菌中表达后提取、纯化得到重组蛋白, 并通过生物信息学对该蛋白的信号肽、三维结构等进行了分析, 最后以胶态壳聚糖溶液为底物研究了该重组壳聚糖酶的活性。结果显示, 该壳聚糖酶基因的ORF长为837 bp, 编码279个氨基酸, 分子量为31.45 ku。在其氨基末端具有信号肽, 切割点位于36和37位氨基酸之间。氨基酸序列同源性分析表明该壳聚糖酶属于GH46家族糖苷水解酶。酶的水解活性最适温度约为55 °C, 最适pH为5.5。而金属离子Fe<sup>3+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>对其水解活性都起抑制作用, 但是Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>对其活性起增强作用。0.1 mmol/L的Zn<sup>2+</sup>对壳聚糖酶的活性起增强作用, 2.0 mmol/L的Zn<sup>2+</sup>对壳聚糖酶的活性起抑制作用。本实验研究了解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶在不同条件下的水解活性, 为壳聚糖酶的工业应用奠定了理论基础。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 壳聚糖酶; 基因克隆; 蛋白表达; 酶活性

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

甲壳素(chitin)又名几丁质, 是由N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖通过β-1, 4糖苷键连接而成的直链多糖, 存在于真菌的细胞壁、节肢动物的外骨骼和昆虫的肠道黏膜等生物组织器官中<sup>[1]</sup>。据估计, 自然界中甲壳素的年生物合成量约1000亿t, 是仅次于纤维素的自然界多聚物。甲壳素化学性能稳定, 不溶于水、稀酸、碱或其他有机溶剂, 在浓碱条件下, 可以将甲壳素进行部分脱乙酰或完全脱乙酰生成壳聚糖(chitosan)。近年来, 由于壳聚糖及其水解产物壳寡糖(chitosan oligosaccharide)在医学、农业和工业等领域具有较高的应用价值, 受到了越来越多的关注。其中, 壳聚糖对手术部位感染、骨髓炎、口腔黏

膜炎等多种炎症治疗都有很好的效果<sup>[2]</sup>。壳寡糖则能够抑制真菌<sup>[3]</sup>和细菌<sup>[4]</sup>的生长, 还可以用来制备抗肿瘤药物和免疫增强剂<sup>[5]</sup>, 在高等植物中能够诱导产生植物抗毒素<sup>[6]</sup>, 此外, 壳寡糖还可以用作食品添加剂<sup>[7]</sup>。有研究表明, 饲料中添加壳寡糖可以激活团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的呼吸爆发, 增强其免疫力<sup>[8]</sup>。虽然壳聚糖具有重要的生物学功能, 但因其分子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, 使其在很多方面的应用受到阻碍, 因此, 对壳聚糖进行水解产生一定聚合度的壳寡糖更有意义。

壳聚糖酶(chitosanase)是一种能够专一性催

收稿日期: 2016-11-21 修回日期: 2017-03-07

资助项目: 湖北省科技支撑计划(2015BBA228); 武汉市科技局基金(2016020101010089); 广东省海洋与渔业局基金(2015-033)

通信作者: 赵丽娟, E-mail: zhaolijuan4234@163.com; 林鑫, E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

化水解壳聚糖中的糖苷键生成壳寡糖的糖苷水解酶。Henrissat<sup>[9]</sup>依据氨基酸序列将糖苷水解酶大致分为GH5、GH7、GH8、GH46、GH75和GH80六个家族, 目前GH46、GH75和GH80家族的糖苷水解酶类只含有壳聚糖酶, 而GH5、GH7和GH8还包含一些其他酶类, 例如纤维素酶、苔聚糖酶和木聚糖酶<sup>[10]</sup>。壳聚糖酶广泛存在于细菌、真菌、病毒和植物中, 例如芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[11]</sup>、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)<sup>[12]</sup>以及真菌中的曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.)<sup>[13]</sup>等; Gupta等<sup>[14]</sup>还报道了鱼腥藻(*Anabaena fertilissima*) RPAN1可以产生一种抗真菌壳聚糖酶。

酶解法降解壳聚糖生产壳寡糖具有高效、无污染、低成本等优势, 在工业生产中越来越受到重视。但野生菌株的筛选复杂、产酶量及酶活性都较低, 因此利用大肠杆菌、酵母等表达系统构造工程菌进行基因表达可以提高壳聚糖酶产量及活性。壳聚糖酶的活性和稳定性是决定其利用率的关键因素, *Bacillus* sp. CK4<sup>[15]</sup>能产生耐热型壳聚糖酶, 该酶最适反应温度为55℃, 在60~100℃仍具有活性, 氨基酸序列中的Asp-66是该酶的活性位点, Cys-211对维持壳聚糖酶的热稳定性具有关键作用。*Bacillus* sp. MET 1299<sup>[16]</sup>和*Bacillus* sp. CK4<sup>[15]</sup>的壳聚糖酶在大肠杆菌中重组表达后酶的活性都能达到50 U/mL。通过解析4种微生物的壳聚糖酶三维结构<sup>[17-20]</sup>, 壳聚糖酶底物结合机制、催化活性位点等被揭示出来, 加速了壳聚糖酶结构的改造, 为提高酶的稳定性和活性提供了理论支持。

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)是芽孢杆菌属中的重要种类, 其生长代谢过程中能产生多种生物活性物质, Castro等<sup>[21]</sup>发现解淀粉芽孢杆菌MIR-41可以产生淀粉酶和葡萄糖苷酶。基于本实验室长期研究芽孢杆菌、壳聚糖及其水解产物壳寡糖在水产中的应用及其机理<sup>[8, 22-25]</sup>, 本实验拟将来源于解淀粉芽孢杆菌HZ-1510的壳聚糖酶基因进行克隆, 在大肠杆菌中表达, 以期获得酶活性较高的菌株, 并对其活性影响因素进行研究, 为探索壳聚糖酶的最适反应条件、稳定性以及在制备壳寡糖的应用方面提供实验依据, 为其工业生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验菌株由本实验室从养殖水体中分离、

鉴定和保存, 并由本实验室编号为解淀粉芽孢杆菌HZ-1510。

### 1.2 主要试剂

壳聚糖(脱乙酰度>90%)购自青岛宇宙生物科技有限公司。称取1.0 g水溶性壳聚糖, 溶于99.0 g的0.2 mol/L的pH为5.8的乙酸—乙酸钠缓冲液<sup>[26]</sup>中, 搅拌至溶解, 可获得1%(W/W)的壳聚糖溶液。

细菌基因组DNA提取试剂盒和SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 2×PCR Mix Taq; pBlue-T Vector、10×Ligation Buffer、10×PEG Enhancer、T<sub>4</sub> DNA Ligase、琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒和PCR产物纯化回收试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; 大肠杆菌DH5α和BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司; GST亲和层析柱购自生工生物工程(上海)有限公司。

### 1.3 壳聚糖酶基因编码序列的克隆

根据NCBI上已有的壳聚糖酶序列, 用Primer Premier 5.0设计简并引物Chi-F1和Chi-R1(表1)。PCR反应体系: 2×Taq PCR Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 模板cDNA 1 μL, 上下游引物Chi-F1和Chi-R1 (10 μmol/L)各 1 μL。PCR反应程序: 95℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 56℃复性90 s, 72℃延伸2 min, 共计35个循环, 72℃延伸10 min, 16℃保温。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用琼脂糖凝胶回收纯化目的条带, 命名为Chi1, 并连接于pBLUE-T载体中, 测序鉴定序列。

### 1.4 壳聚糖酶基因编码序列及进化分析

将克隆得到的壳聚糖酶编码序列, 使用<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi> ORF Finder程序进行开放阅读框搜索, 应用[http://web.expasy.org/compute\\_pi/ExPASy](http://web.expasy.org/compute_pi/ExPASy)在线工具对其编码的蛋白质进行分子量和等电点的计算。运用SignalP 4.1<sup>[27]</sup>预测蛋白的信号肽, Swiss Model<sup>[28]</sup>软件对蛋白质高级结构进行预测。检索CAZy(Carbohydrate-Active enZymes)数据库<sup>[29]</sup>下载获得芽孢杆菌属的壳聚糖酶氨基酸序列, 用ClustalW软件对其进行氨基酸序列比对, 用MEGA 6.0软件<sup>[30]</sup>的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

表1 实验所用的引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物 primer	序列(5'→3') sequence from 5' to 3'	用途 usage
Chi-F1	ATGAAAATCAGTTTGAATCAAAAAGC	扩增壳聚糖酶编码序列
Chi-R1	TTATTGATTACGAAATGACCGTACTCGTTTGA	扩增壳聚糖酶编码序列
Chi-F2-BamHI	CGCGGATCCAGATGAAAATCAGTTTGAATC	构建重组表达质粒
Chi-R2-Xho I	CCGCTCGAGTTATTGATTACGAAATGACC	构建重组表达质粒

### 1.5 壳聚糖酶的重组表达

**重组质粒的构建** 以Chi1为模板,以引物Chi-F2-BamHI和Chi-R2-Xho I(表1)扩增壳聚糖酶基因片段,PCR扩增反应体系:2×Taq PCR Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 模板Chi1 1 μL, 上下游引物Chi-F2-BamHI和Chi-R2-Xho I (10 μmol/L)各1 μL。PCR扩增反应程序:95 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 56 °C复性90 s, 72 °C延伸2 min, 共计35个循环。最后在72 °C延伸10 min。电泳检测PCR产物后,胶回收PCR产物,并用BamHI和Xho I (TaKaRa)同时酶切PCR产物和表达质粒pGEX-5X-1,以T<sub>4</sub> DNA连接酶连接过夜,转化至DH5α感受态细胞。经含有100 μg/mL氨苄青霉素抗性的LB培养基培养后,挑单克隆经PCR鉴定,测序验证构建的重组表达载体pGEX-5X-1-Chi序列。

**重组质粒的表达** 将测序验证后的阳性重组表达质粒pGEX-5X-1-Chi转化至感受态*E. coli* BL21中,经含有100 μg/mL氨苄青霉素抗性的LB固体培养基培养后,挑单克隆接种于终浓度为100 μg/mL氨苄青霉素抗性的LB液体培养基中,分别在37、28、18 °C下,经终浓度为1.0 mmol/L IPTG诱导表达4 h, SDS-PAGE检测蛋白表达结果。

### 1.6 重组壳聚糖酶的纯化

将诱导表达后的菌液在8000 r/min, 4 °C下,离心15 min,收集沉淀的菌体,用1×PBS洗涤并重悬。经高压破碎后,于11 000 r/min, 4 °C条件下,离心30 min,收集上清液得到粗酶液。粗酶液使用GST Sefinose™ Resin Kit [生工生物工程(上海)有限公司]试剂盒进行纯化。SDS-PAGE检测收集到的重组蛋白,-80 °C保存,备用。

### 1.7 重组壳聚糖酶的活性检测

**重组壳聚糖酶的最适反应温度** 用0.2 mol/L pH 5.8的乙酸—乙酸钠缓冲液配制1%的壳聚糖溶

液作为底物,加入纯化后的重组蛋白和GST蛋白,混合均匀,在不同温度下进行酶解反应15 min,反应结束后,根据DNS法(3,5-二硝基水杨酸法)<sup>[26]</sup>测定还原糖浓度,计算酶的活性(U/mg)。

**重组壳聚糖酶的最适反应pH** 在最适温度研究清楚的情况下,选择最适反应温度55 °C,用0.2 mol/L乙酸—乙酸钠缓冲液配制pH 3.6~5.8的缓冲液、磷酸盐缓冲液配制pH 6.0~8.0的缓冲液、Tris-HCl缓冲液配制pH 9.0~10.0的缓冲液。分别用不同pH的缓冲液配制壳聚糖溶液作为降解底物。加入纯化后的重组蛋白和GST蛋白,在适宜的温度下反应15 min, DNS法测定还原糖浓度,计算酶的活性(U/mg)。

**金属离子对重组壳聚糖酶活性影响** 在最适温度和pH研究清楚的情况下,选择最适反应温度55 °C和最适反应pH 5.5条件,用含有金属离子Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>的溶液加入到反应混合物中,设置不添加任何金属离子为对照组。同时,根据*Bacillus* sp. DAU101壳聚糖酶活性<sup>[31]</sup>研究,实验设定研究中金属离子的终浓度分别为0.1和2.0 mmol/L,测定不同金属离子对酶活性的影响,并作比较。

### 1.8 数据处理

数据采用方差齐性检验(Bartlett检验)和单因素方差分析(One-Way ANOVA),*P*<0.05为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 壳聚糖酶基因编码序列的克隆结果分析

利用引物Chi-F1和Chi-R1克隆得到的壳聚糖酶基因编码序列,电泳检测结果显示,有一条大小为750~1000 bp的特异条带(图1),片段大小与预期相符。

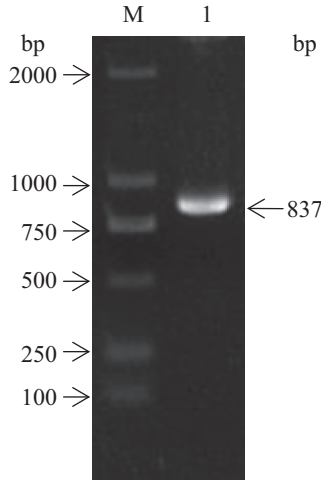


图 1 壳聚糖酶基因编码序列的电泳图

M. DL-2000 DNA Marker; 1. 壳聚糖酶基因编码序列的扩增条带

Fig. 1 Electrophoresis profiles of coding sequence from chitosanase gene

M. DL-2000 DNA Marker; 1. coding sequence of chitosanase gene

### 2.2 壳聚糖酶的生物信息学分析

解淀粉芽孢杆菌HZ-1510的壳聚糖酶基因ORF长837 bp, 编码279个氨基酸, 预测蛋白分子量为31.45 ku, 理论等电点为8.65, SignalP 4.1 Server预测结果如图2所示, 在37位点时, C值最高, 预测信号肽切割位点在36位和37位氨基酸之间。在信号肽区域, S值都处于较高水平, 信号肽切割位点后的S值骤然下降。通过搜集CAZy数据库中芽孢杆菌属的糖苷水解酶进行比对, 实验发现该壳聚糖酶含有GH46糖基水解酶家族保

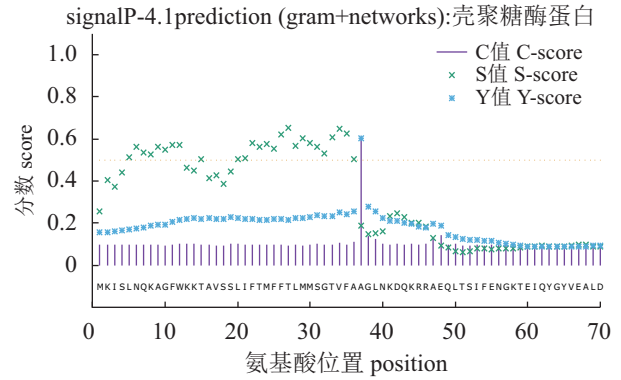


图 2 SignalP-4.1预测的壳聚糖酶信号肽

Fig. 2 The prediction of signal peptide of chitosanase by SignalP-4.1

守功能域, 因此实验确定解淀粉芽孢杆菌HZ-1510的壳聚糖酶属于GH46家族的糖苷水解酶。氨基酸序列分析结果显示, 第55位点的谷氨酸(E)和71位点的天冬氨酸(D)(图3)与*Streptomyces* sp. N174<sup>[32]</sup>壳聚糖酶中高度保守的催化氨基酸Glu-22和Asp-40一致(图4-a), 由于谷氨酸(E)和天冬氨酸(D)都属于极性带负电荷氨基酸, 因此猜测金属阳离子的存在可能会影响壳聚糖酶的活性。除了这2个位点, 实验发现丙氨酸(A)和缬氨酸(V)也可能参与了壳聚糖酶与底物的结合(图3)。

在移除信号肽序列后, 将剩余的氨基酸序列与已有三维结构的壳聚糖酶N174进行序列比对(图4-a)和同源模型构建, 发现*B. amyloliquefaciens* HZ-1510壳聚糖酶与*Streptomyces* N174<sup>[20]</sup>壳聚糖酶具有类似的三维结构(图4-b)。

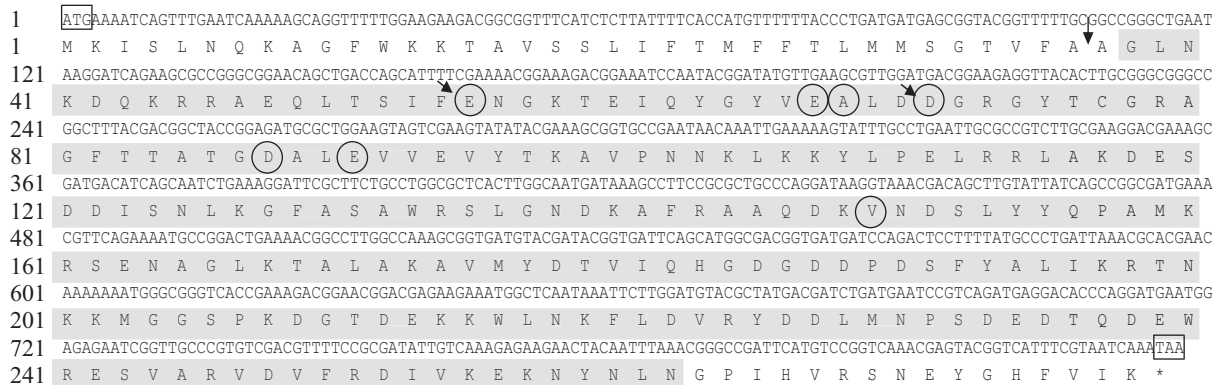


图 3 壳聚糖酶编码序列及氨基酸序列分析

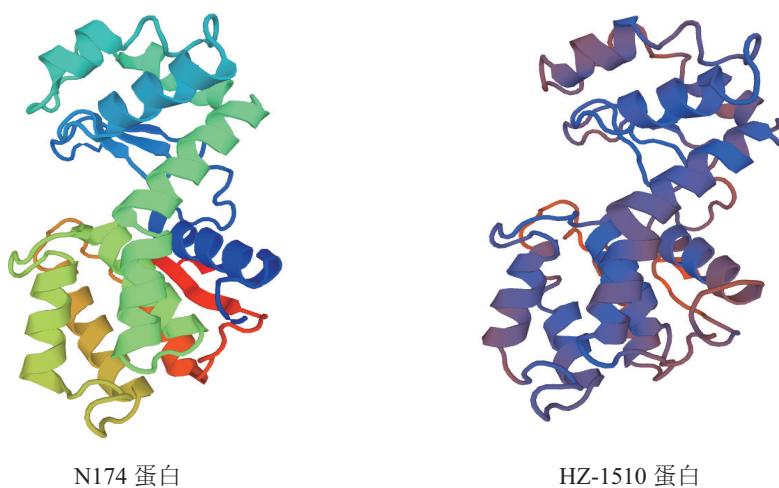
阴影部分显示GH46家族壳聚糖酶保守域; 起始密码子和终止密码子以方框框出; 壳聚糖结合位点以圆圈标示; 催化活性位点氨基酸以斜箭头指出; 信号肽切割位点以垂直箭头指出

Fig. 3 Analysis of coding sequence and deduced amino acid sequences from chitosanase

The conserved domain of GH46 family chitosanase is shown in shaded; initiation and termination codons are presented with frame; chitosan binding sites are presented with circle; catalytic active sites are presented with oblique arrow; the cleavage site of signal peptide is presented with vertical arrow

	↓ Glu22	↓ Asp40	
Target	AGLN-KDQKRRAEQLTSIFENGKTEI—QYGYVEALDDGRGYTCGRAGFTTATGDALEVV		57
1chk.2.A	AGLDDPHKKEIAMELVSSAENSSLDWKAQYKYIEDIGDGRGYTGGIIGFCSGTGDMLELV		62
Target	EVYTKAVPNNKKYLPELRRRLAKDESDDISNLK—GFASAWRSLGNDKAFRAAQDKVNS		116
1chk.2.A	QHYTELEPGNILAKYLPALKKVN—GSASHSGLGTPFTKDWATAAKDTVFQQAQNDERDR		120
Target	LYYQPAMKRSENAGLKTALAKAVMYDTV IQHGDGDDPDSFYALIKRTNKKMGGSPKDGTD		176
1chk.2.A	VYFDPAVSAQAKADGLR—ALGQFAYYDAIVMHGPGNDPTSFGGIRKTAMKKA—RTPAQGGD		178
Target	EKKWLNKFLDVR—YDDLMPNSDEDTQDEWRESVARV—DVFRDIVKEKNYNLNGPIHVRSN		234
1chk.2.A	ETTYLNGFLDARKAAMLTEAAHDDT-----SRVDTEQRVFLKAGNLDLNPPLKWK—		229
	EYGHFVIK		242
	—YGDP---		233

(a) HZ-1510 蛋白与壳聚糖酶 N174 的序列比对  
comparison of amino acid sequence



N174 蛋白

HZ-1510 蛋白

(b) 三维结构  
comparison of structure

图 4 解淀粉芽孢杆菌 HZ-1510 与 *Streptomyces* N174 壳聚糖酶三维结构对比

Fig. 4 Structural comparison of chitosanase from *B. amyloliquefaciens* HZ-1510 and *Streptomyces* N174

### 2.3 壳聚糖酶的重组表达及分离纯化结果

比较在不同温度下壳聚糖酶的重组表达情况,发现在 28 °C 时诱导表达的重组壳聚糖酶可溶性较 37 和 18 °C 高,因此以 28 °C 为诱导表达活性蛋白的温度条件,分别表达了重组壳聚糖酶以及作为阴性对照的 GST 蛋白。高压破碎后的上清液经 GST 亲和层析柱分离纯化, SDS-PAGE 检测纯化后的蛋白结果如图 5 所示,回收纯化得到了重组壳聚糖酶(大小约为 57 ku)以及 GST 蛋白(大小约 26 ku)。

### 2.4 重组壳聚糖酶的活性分析结果

重组壳聚糖酶的最适反应温度 该酶最适反应温度为 55 °C(图 6-a),在 25~55 °C,壳聚糖

酶活性随着温度升高呈上升趋势( $P < 0.05$ ),在 35~65 °C 具有较高的水解活性。随着温度从 60 升高至 80 °C,酶活性逐渐下降,在 55 °C 时,酶活性最高,70 °C 后,酶几乎失去活性,该酶的最适反应温度在大部分壳聚糖酶的最适反应温度(30~60 °C)范围内,且该壳聚糖酶的最适温度偏高,属于一类耐热型壳聚糖酶。

重组壳聚糖酶的最适反应 pH 该酶的最适反应 pH 为 5.5, pH 值为 3.6~5.5,壳聚糖酶活性随着 pH 值升高呈上升趋势( $P < 0.05$ ),在 4.5~6.0 具有较高的水解活性。随着 pH 从 6.0 升高至 10.0,酶活性逐渐下降。pH 为 5.5 左右时,酶活性最高(图 6-b),该壳聚糖酶的最适 pH 值与大部分芽孢杆菌壳聚糖酶的最适 pH 范围(4.0~8.0)相符。

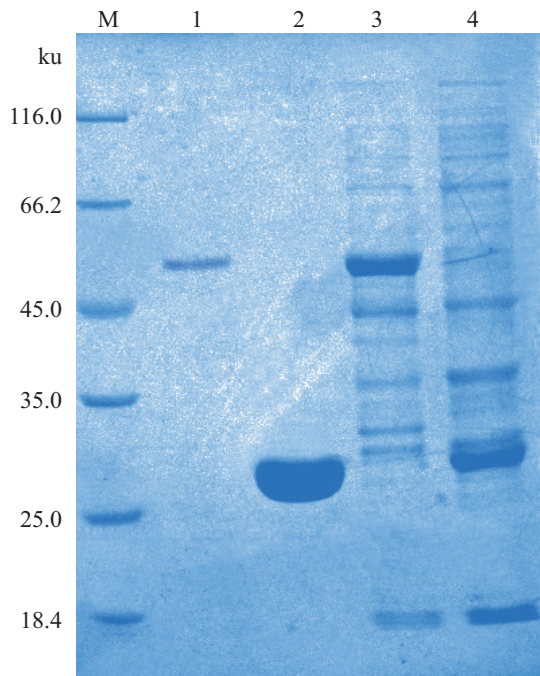


图5 重组壳聚糖酶的表达和纯化

1. 纯化后的重组壳聚糖酶; 2. 纯化后的GST蛋白; 3. 重组质粒 pGEX-5X-1-Chi表达上清液中的总蛋白; 4. 空载pGEX-5X-1表达上清液中的总蛋白; M. 蛋白marker

Fig. 5 The expression and purification of recombinant chitosanase

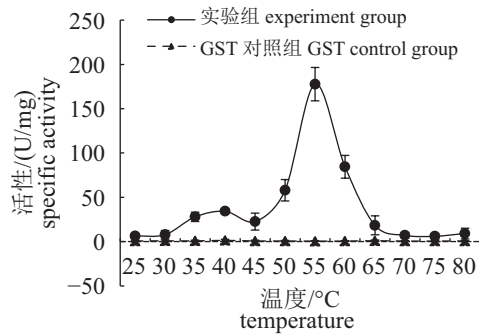
1. the purified recombinant chitosanase; 2. the purified GST protein; 3. total proteins in the supernatant of *E. coli* expressed pGEX-5X-1-Chi; 4. total proteins in the supernatant of *E. coli* expressed pGEX-5X-1; M. protein marker

金属离子对重组壳聚糖酶活性的影响 在两种不同浓度下, 9种不同金属离子对重组壳聚糖酶活性的影响结果显示,  $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 对壳聚糖酶的活性具有增强作用( $P<0.05$ ),  $Cu^{2+}$ 显著抑制壳聚糖酶的活性( $P<0.05$ ),  $Fe^{3+}$ 、 $Ag^{+}$ 、 $Ba^{2+}$ 和 $K^{+}$ 对壳聚糖酶活性都有不同程度的抑制(表2), 但是, 低浓度的 $Zn^{2+}$ 对壳聚糖酶的活性稍有促进作用, 而高浓度的 $Zn^{2+}$ 对壳聚糖酶的活性起到了抑制作用(图7)。

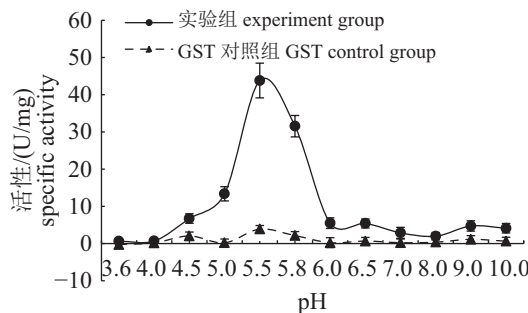
### 3 讨论

#### 3.1 信号肽与壳聚糖酶分泌表达关系

壳聚糖酶是一种分泌蛋白, 信号肽在跨膜蛋白的分泌表达转移过程中常常发挥重要作用<sup>[33]</sup>。外源蛋白在宿主菌, 如大肠杆菌中的表达形式多为细胞内不溶性表达, 形成包涵体, 少数为细胞外分泌表达。但是, 利用信号肽来引



(a)



(b)

图6 温度和pH对重组壳聚糖酶活性的影响

(a)温度对酶活性的影响; (b)pH对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature and pH on enzyme activity of recombinant chitosanase

(a)effect of temperature on enzyme activity; (b) effect of pH on enzyme activity

导外源蛋白定位分泌到细胞特定区间, 提高可溶性, 可避免因包涵体复性带来的困难。其中, 起引导作用的信号肽可以是来自表达系统自身的也可以是外源信号肽, 或者二者兼而有之。Sak-Ubol等<sup>[34]</sup>将地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的壳聚糖酶在植物乳杆菌中进行表达, 并设计了3种表达模式, 即无信号肽、含有自身信号肽和加入大肠杆菌的OmpA外源信号肽。结果显示, 当利用自身信号肽进行表达时壳聚糖酶的产量和分泌率最高, 另外两种情况下的蛋白表达量和分泌率都大大降低。但是, 信号肽在壳聚糖酶分泌过程中会被剪切掉, 因此, 行使水解功能的壳聚糖酶不需要信号肽, 可见信号肽在壳聚糖酶的分泌表达过程中起到重要的作用。除了信号肽的类别, 表达宿主的不同也可能影响蛋白的分泌表达, 例如芽孢杆菌、乳酸杆菌都可作为原核表达系统, 还可应用真核表达系统, 例如毕赤酵母、昆虫杆状病毒<sup>[35]</sup>等。

表 2 金属离子对重组壳聚糖酶活性的影响  
Tab. 2 Effect of metal ions on enzyme activity of recombinant chitosanase %

金属离子 metal ion	活性 relative activity	
	0.1 mmol/L	2.0 mmol/L
对照组 control	100.00	100.00
Fe <sup>3+</sup>	58.71±26.88	36.89±14.56
Mn <sup>2+</sup>	131.91±59.94	473.57±73.33
Ag <sup>+</sup>	62.45±13.59	64.47±2.08
Ca <sup>2+</sup>	105.45±10.32	109.51±37.20
Mg <sup>2+</sup>	135.41±17.09	126.44±12.88
Cu <sup>2+</sup>	61.46±9.62	29.57±9.49
Zn <sup>2+</sup>	103.85±28.41	47.20±14.42
Ba <sup>2+</sup>	79.16±6.63	59.16±16.23
K <sup>+</sup>	87.45±11.63	98.16±20.61

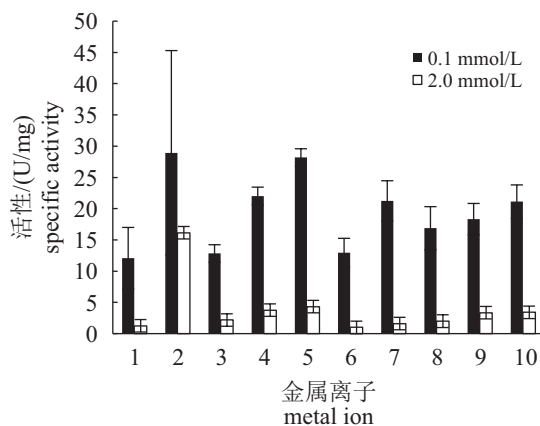


图 7 两种不同浓度金属离子对酶活性的影响

Fig. 7 Effect of different concentration metal ions on the enzyme activity

1. Fe<sup>3+</sup>, 2. Mn<sup>2+</sup>, 3. Ag<sup>+</sup>, 4. Ca<sup>2+</sup>, 5. Mg<sup>2+</sup>, 6. Cu<sup>2+</sup>, 7. Zn<sup>2+</sup>, 8. Ba<sup>2+</sup>, 9. K<sup>+</sup>, 10. control

另外, 外源蛋白的表达与诱导时菌体的浓度、IPTG浓度和温度等都有关系。本研究中IPTG的诱导浓度为1.0 mmol/L, 其浓度不能过高, 因为IPTG本身对菌体的生长是有害的。而温度对蛋白的表达影响也较大, 通常情况下, 温度高蛋白合成速率快, 但容易出现折叠不正确的问题, 出现不溶性表达。

### 3.2 壳聚糖酶结构分析

蛋白质的结构决定功能, 其三维结构的解析对分析其相关功能具有重要意义。在GH46家

族中, 最早被解析的壳聚糖酶的晶体结构是*Streptomyces* N174<sup>[20]</sup>, 与底物相互作用的氨基酸的确定是壳聚糖酶研究中的一项重要发现。本研究中的解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶属于GH46家族糖苷水解酶, 与*Streptomyces* N174壳聚糖酶有着非常相似的三维空间结构。*Streptomyces* sp. N174<sup>[32]</sup>的空间结构显示Glu-22和Asp-40是壳聚糖酶的催化关键氨基酸, 在HZ-1510壳聚糖酶中, 也存在这2个保守的关键氨基酸, 对应为Glu-55和Asp-71, 在壳聚糖酶MH-K1<sup>[19]</sup>中对应氨基酸为Glu-37和Asp-55, 这2个氨基酸在不同微生物的壳聚糖酶中都高度保守。由于这2种氨基酸均为极性带负电荷氨基酸, 在催化过程中, 若有金属阳离子的存在, 该阳离子可能会参与壳聚糖酶结合, 从而影响底物的结合, 影响酶的水解效果。

### 3.3 重组壳聚糖酶活性分析

野生菌株在自然发酵条件下所产壳聚糖酶的活性都较弱, 然而利用大肠杆菌、酵母等表达系统构造工程菌进行基因表达可以提高壳聚糖酶产量及活性, 本研究中的重组壳聚糖酶活性最高达到了177.7 U/mg。

相关研究表明, 大部分壳聚糖酶最适反应温度为30~60 °C, 解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶的最适反应温度为55 °C, 与来自*Bacillus* sp. strain CK4<sup>[15]</sup>的耐热型壳聚糖酶的最适反应温度相同, 高于枯草芽孢杆菌TKU007<sup>[36]</sup>壳聚糖酶的最适反应温度(37 °C)。大部分壳聚糖酶的最适反应pH范围为4~6.5, 少数为弱碱性(7.5~8.0)。

通过观察9种常见金属离子(Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>)对酶活性的影响, 发现在添加0.1 mmol/L金属离子的情况下, 酶的活性比2.0 mmol/L金属离子存在时酶的活性要高很多, 可见金属离子对酶活性的影响与浓度有较大的关系。如果要确定最佳浓度, 需进一步设置浓度梯度, 为金属离子在生产酶制剂过程中提供理论依据, 在酶制剂中添加可以促进酶活性的金属离子, 能使其在降解壳聚糖时有更好的水解效果。此外, 研究结果表明, Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>对酶的活性有促进作用, 生物体的细胞内含有大量的钙、镁离子, 这一现象与Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>能够促进酶活性或许有着潜在的关联。此外, 壳聚糖酶在Mn<sup>2+</sup>存在时, 也具有较高

的活性。这在其他酶类的研究中也类似的效果, 比如乙型肝炎病毒聚合酶, 在 $Mn^{2+}$ 存在条件下, 其活性是 $Mg^{2+}$ 条件下的10倍左右<sup>[37]</sup>。由于 $Mn^{2+}$ 在生物体内的含量比 $Mg^{2+}$ 低, 其生物学意义有待探讨。

#### 参考文献:

- [1] Liu S J, Shao S J, Li L L, *et al.* Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis[J]. *Carbohydrate Research*, 2015, 418: 50-56.
- [2] Dai T H, Tanaka M, Huang Y Y, *et al.* Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects[J]. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2011, 9(7): 857-879.
- [3] Chang W T, Chen Y C, Jao C L. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(6): 1224-1230.
- [4] Lee B C, Kim M S, Choi S H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of water-soluble chitosan oligosaccharides against *Vibrio vulnificus*[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2009, 24(3): 327-333.
- [5] Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, *et al.* Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose[J]. *Carbohydrate Research*, 1986, 151: 403-408.
- [6] Hadwiger L A, Beckman J M. Chitosan as a component of Pea-*Fusarium solani* interactions[J]. *Plant Physiology*, 1980, 66(2): 205-211.
- [7] Dutta J, Tripathi S, Dutta P K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications[J]. *Food Science and Technology International*, 2012, 18(1): 3-34.
- [8] Liu L C, Zhou Y, Zhao X H, *et al.* Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 17-24.
- [9] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. *Biochemical Journal*, 1991, 280(2): 309-316.
- [10] Heggset E B, Tuveng T R, Hoell I A, *et al.* Mode of action of a family 75 chitosanase from *Streptomyces avermitilis*[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(6): 1733-1741.
- [11] Zitouni M, Fortin M, Scheerle R K, *et al.* Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 5801-5813.
- [12] Jiang X Y, Chen D C, Chen L H, *et al.* Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin[J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 355: 40-44.
- [13] Zhang H, Sang Q, Zhang W H. Statistical optimization of chitosanase production by *Aspergillus* sp. QD-2 in submerged fermentation[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(1): 193-201.
- [14] Gupta V, Prasanna R, Srivastava A K, *et al.* Purification and characterization of a novel antifungal endo-type chitosanase from *Anabaena fertilissima*[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(3): 1089-1098.
- [15] Yoon H G, Kim H Y, Lim Y H, *et al.* Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3727-3734.
- [16] Wang S L, Chao C H, Liang T W, *et al.* Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(3): 334-344.
- [17] Yorinaga Y, Kumasaka T, Yamamoto M, *et al.* Crystal structure of a family 80 chitosanase from *Mitsuaria chitosanitabida*[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(3): 540-547.
- [18] Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, *et al.* Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 343(3): 785-795.
- [19] Saito J I, Kita A, Higuchi Y, *et al.* Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(43): 30818-30825.
- [20] Marcotte E M, Monzingo A F, Ernst S R, *et al.* X-ray



- structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174[J]. *Nature Structural Biology*, 1996, 3(2): 155-162.
- [21] Castro G R, Baigori M D, Méndez B S, *et al.* Effects of pH and temperature on the continuous production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* MIR-41[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1993, 58(3): 277-280.
- [22] 郝明君, 刘立春, 张涓, 等. 3种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 72-77.
- Xi M J, Liu L C, Zhang J, *et al.* Effect of three chitosan on respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(3): 72-77(in Chinese).
- [23] Zhao X H, Liu L C, Hegazy A M, *et al.* Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 357-363.
- [24] Wang L, Liu L C, Zhou Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 54-58.
- [25] Liu X L, Tang X C, Wang L, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [26] 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 Y Y. Study on the characterization, molecular cloning, and expression of a chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007(in Chinese).
- [27] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, *et al.* SIGNALP 4.0: discriminating signal peptides from transmembraneregions[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [28] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W252-W258.
- [29] Lombard V, Ramulu H G, Drula E, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D490-D495.
- [30] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [31] Lee Y S, Yoo J S, Chung S Y, *et al.* Cloning, purification, and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 113-121.
- [32] Boucher I, Fukamizo T, Honda Y, *et al.* Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(52): 31077-31082.
- [33] Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 30-40.
- [34] Sak-Ubol S, Namvijitr P, Pechsrichuang P, *et al.* Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 81.
- [35] Ogiue-Ikeda M, Machida K. Expression and purification of SH2 domains using baculovirus expression system[M]//Machida K, Liu B A. SH2 Domains: Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2017, 1555: 183-198.
- [36] 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(2): 132-138.
- [37] Li L, Fen W, Hu J M. Functional and structural dynamics of hepadnavirus reverse transcriptase during protein-primed initiation of reverse transcription: effects of metal ions[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(12): 5703-5714.

## Cloning, expression and activity analysis of chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-1510

DUAN Jing<sup>1</sup>, LIU Guangxin<sup>1</sup>, DONG Yanjun<sup>1</sup>, ZHOU Yang<sup>1</sup>, LI Jinquan<sup>2</sup>, LIU Xiaoling<sup>1</sup>,  
ZHOU Meng<sup>3</sup>, LIANG Rishen<sup>3</sup>, ZHAO Lijuan<sup>1,3\*</sup>, LIN Li<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Food Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** To study the hydrolysis activity of chitosanase, in this report, the coding sequence of chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-1510 was cloned, and glutathione S-transferase (GST) fused-chitosanase was expressed and purified from *Escherichia coli*. Furthermore, we analysed the signal peptide, amino acid sequence and its three-dimensional structure. In the end, its chitosan hydrolysis activity was measured. The chitosanase gene consisted of an open reading frame of 837 bp which encoded a protein of 279 amino acids with predicted molecular weight of 31.45 ku. The protein contained a signal peptide with a cleavage site located between the 36th and 37th amino acids. The deduced amino acid sequence homology analysis of the chitosanase revealed that it belonged to GH46 family. The recombinant chitosanase has been purified to homogeneity by using only GST column chromatography. The optimal pH and temperature for the chitosan hydrolysis activity was 5.5 and 55 °C, respectively. The enzyme activity was increased in the presence of Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. However, Fe<sup>3+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> could inhibit its activity. Furthermore, its activity could be increased in the presence of 0.1 mmol/L Zn<sup>2+</sup> while it was inhibited by 2.0 mmol/L Zn<sup>2+</sup>. This study explored the optimal condition for hydrolytic activity of chitosanase and established a theoretical basis for its industrial application.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; chitosanase; gene cloning; protein expression; activity

**Corresponding author:** ZHAO Lijuan. E-mail: zhaolijuan4234@163.com;

LIN Li. E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** Special Fund for Science and technology from Hubei Province (2015BBA228); Fund from Wuhan Science and Technology Bureau (2016020101010089); Special Funds from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201512C003)