

参赛学生姓名： 柏鹏飞

中学： 南京外国语学校

省份： 江苏省

国家/地区： 中国

指导老师姓名： 江凌

指导老师单位： 南京工业大学

论文题目： 新疆盐碱地区产几丁质酶菌株的
挖掘及酶法降解虾蟹类几丁质的
应用

新疆盐碱地区产几丁质酶菌株的挖掘及酶法降解虾蟹类几丁质的应用

柏鹏飞

摘要:

几丁质,是世界上仅次于纤维素的可再生资源,如果不加以有效利用,既造成资源浪费,又引起环境污染。利用微生物产几丁质酶对其高效降解,可转化生成功能性寡糖,应用于农业、食品及医药领域,实现变废为宝。新疆地区拥有特殊且丰富多样的地理环境,其极端盐碱环境来源的产几丁质酶菌株,可能会为几丁质酶法降解提供潜在的优质酶资源。

本研究从新疆达坂城盐湖采集土壤样本,从中筛选获得一株产几丁质酶的细菌 Chit62,胞外酶活为 34.10 U/mL,菌种鉴定为 *Bacillus licheniformis*。对 Chit62 菌株产几丁质酶条件进行优化,酶活最高可达 62.30 U/mL;克隆表达 Chit62 来源的几丁质酶基因 *ChiB162*,研究其酶学性质。结果显示,重组蛋白 rChiB162 具有较强的 pH 适应性,尤其在 pH 8-10 偏碱性范围内,几丁质酶酶活仍维持在 80% 以上。同时, rChiB162 在 35°C-85°C 之间都有良好的酶学活性。以 10 g/L 虾蟹壳几丁质为底物,5 h 内 rChiB162 可将 42.1% 虾蟹壳几丁质酶解为几丁寡糖。结果表明 rChiB162 具有良好的催化活性以及 pH, 温度稳定性,对虾蟹类几丁质降解具有较好的效果,具有实际应用潜力。

关键词:

新疆, 盐碱地, 虾蟹壳, 几丁质酶

目录

摘要:	I
关键词:	I
目录.....	II
一、前言.....	1
1.1 几丁质.....	1
1.2 几丁质降解产物.....	1
1.3 几丁质降解方法.....	2
1.4 几丁质酶.....	2
1.5 本课题的研究目的和主要研究内容.....	3
1.5.1 研究目的和意义.....	3
1.5.2 主要研究内容.....	4
二、材料与方法.....	5
2.1 实验材料与试剂.....	5
2.1.1 菌株与质粒.....	5
2.1.2 实验仪器.....	5
2.1.3 试剂.....	5
2.1.4 培养基和溶剂.....	6
2.2 分子生物学操作方法.....	6
2.2.1 质粒提取.....	6
2.2.2 聚合酶链式反应体系和条件 (PCR)	7
2.2.3 核酸凝胶电泳.....	7
2.2.4 产物纯化.....	7
2.2.5 同源重组反应体系及条件.....	7
2.2.6 <i>E.coli</i> BL21(DE3)感受态的制备与转化.....	8
2.2.7 菌液 PCR 及其阳性克隆验证.....	8
2.3 实验方法.....	8
2.3.1 样品采集.....	8
2.3.2 富集培养.....	8

2.3.3 产几丁质酶菌株分离.....	8
2.3.4 菌种初筛.....	8
2.3.5 菌种复筛.....	8
2.3.6 DNS 法测定酶活力.....	9
2.3.7 菌株产酶条件的优化.....	9
2.3.8 产几丁质酶菌株的鉴定与克隆.....	10
2.3.9 几丁质酶的表达与纯化.....	11
2.3.10 几丁质酶的酶学性质表征.....	12
2.3.11 重组酶水解几丁质的产物分析.....	12
2.3.12 重组酶水解虾蟹壳几丁质.....	12
三、结果与分析.....	13
3.1 菌株筛选.....	13
3.1.1 几丁质酶产生菌分离.....	13
3.1.2 初筛.....	13
3.1.3 复筛.....	14
3.2 菌株鉴定.....	14
3.2.1 菌落形态.....	14
3.2.2 16s rRNA 鉴定.....	15
3.3 Chit62 菌株产酶条件优化.....	16
3.3.1 菌株产酶曲线和生长曲线.....	16
3.3.2 碳源浓度.....	17
3.3.3 发酵温度.....	17
3.3.4 发酵初始 pH 值.....	18
3.3.5 摇瓶培养转速.....	18
3.3.6 接种量.....	19
3.4 几丁质酶的基因克隆与蛋白表达.....	19
3.4.1 几丁质酶基因扩增.....	19
3.4.2 重组质粒 PCR 扩增验证.....	20
3.4.3 蛋白表达与验证.....	20
3.5 重组几丁质酶 rChiBI62 的酶学性质.....	21

3.5.1 最适反应 pH.....	21
3.5.2 最适反应温度.....	22
3.6 重组酶 rChiBI62 降解几丁质产物分析及虾蟹壳几丁质降解应用... ..	22
四、结论与展望.....	24
4.1 结论.....	24
4.2 展望.....	24
参考文献.....	25
致谢.....	27

2024 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示

一、前言

1.1 几丁质

几丁质又名甲壳素。其来源主要为海洋甲壳类动物，如虾、蟹等。每年几丁质产量巨大。2023年，全国龙虾养殖量近300万吨，其中，江苏省养殖量近30万吨。省餐饮行业协会统计，南京龙虾季一天的餐饮消费达100吨。全国大闸蟹产量为80万吨，江苏省高达37.7万吨，为全国第一。省餐饮行业协会统计数据，江苏省及南京市年餐饮消费螃蟹分别达13万吨、2万吨[1]。然而，虾、蟹壳的利用有限，大部分都被当作废弃物处理，造成了资源的浪费，污染了环境[2]。

几丁质作为虾蟹壳中主要的成分，其降解产物种类多元，且具有显著的生物功能，在医药、农业、环境保护等领域具有广泛的应用潜力和研究价值。如何开发以虾、蟹壳为代表的几丁质资源化利用，是目前研究的热点。

1.2 几丁质降解产物

几丁质的降解产物具有不同分子量和官能团，具体分类如下。

(1) 壳聚糖

壳聚糖，通过几丁质去乙酰化而得。壳聚糖能够抑制多种细菌和真菌的生长、促进血小板聚集和纤维母细胞生长、加速伤口的自然愈合过程，使之广泛应用于各种细菌和真菌中的食物保鲜、伤口敷料和水处理、壳聚糖等领域[3]。

(2) 壳寡糖/几丁寡糖

壳寡糖与几丁寡糖分别由氨基葡萄糖单体和N-乙酰氨基葡萄糖组成，聚合度为2~20个[4]。壳寡糖与几丁寡糖在化学结构上类似，具有抑菌、抗癌、降血脂等功能。

(3) 单糖

氨基葡萄糖，是壳聚糖解聚而成的单体[5]。氨基葡萄糖对骨关节炎患者和运动员具有软骨保护的作用[6]，还可以刺激皮肤细胞的透明质酸合成、加速伤口愈合、改善皮肤水化和减少皱纹的产生[7]。N-乙酰氨基葡萄糖是几丁质的单体。N-乙酰氨基葡萄糖可以修复和维持人体软骨和关节功能，在治疗风湿性关节炎方面具有显著的效果[8]。

因此，鉴于几丁质降解产物的优良特性与潜在的经济价值，寻找高效、经济的几丁质降解方法也是目前研究者关注的重点和热点。

1.3 几丁质降解方法

(1) 物理法

通过研磨、高压、超声、射线、微波或者球磨等方法，使几丁质分子内化学键断裂，形成寡糖分子，是几丁质常见的物理降解法^[4]。

(2) 化学法

几丁质化学降解法主要通过化学试剂破坏聚合物的氢键^[4]。常见的方法主要有强酸降解、碱冻融、离子液体、超临界水、LiCl/二甲基乙酰胺、CaCl₂/甲醇等方法^[9]。

(3) 生物降解法

几丁质的生物降解是指几丁质在生物体产生的酶的特异性催化作用下，糖苷键断裂，从而将几丁质分解成寡糖或单糖的过程。几丁质的酶解过程涉及两条主要路径，旨在实现其逐步降解。其一，几丁质首先经历初步分解，转化为低聚寡糖形式，随后这些低聚寡糖在 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的催化作用下，进一步水解成 N-乙酰糖胺单体，完成其向更小分子的转化。另一路径则通过几丁质去乙酰化酶催化几丁质，形成壳聚糖这一中间产物。随后，壳聚糖在壳聚糖酶与氨基葡萄糖酶的协同作用下，逐步降解为最终的氨基葡萄糖分子，实现了几丁质向基础糖单元的彻底转化^[10]。

化学法利用酸、热液等降解几丁质，具有反应步骤简单、反应时间短等优点。但化学法存在大量挥发性有机试剂，产生的废弃物也会对环境 and 人体健康造成一定的安全隐患；物理法使用高温、高压等条件使几丁质降解，这些方法不仅要求严苛的反应条件，还往往伴随着较低的降解效率；利用酶催化几丁质降解，具有反应条件温和、特异性强、环境影响小等优点，是替代化学法和物理法，实现几丁质工业降解的首选方法^[11]。

1.4 几丁质酶

几丁质酶，其核心功能在于精准地断裂几丁质分子中的糖苷键，进而将其逐步降解为几丁寡糖、N-乙酰氨基葡萄糖等小分子化合物。这些酶类广泛存在于自

然界的原核生物与真核生物等多种生物体中。

追溯几丁质酶的发现历程，其首次亮相于科学界是在几丁质芽孢杆菌中，这一里程碑式的发现不仅揭示了几丁质酶的存在，更为后续的研究奠定了坚实的基础。随着研究的深入，科学家们逐渐认识到几丁质酶在自然界物质循环、生物防御以及生物技术领域中的重要作用，其研究和应用价值日益凸显^[12]。

(1) 外切几丁质酶

外切几丁质酶作为一类重要的酶类，根据其催化特性的不同，可以细分为几丁质糖苷酶与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶两大类。几丁质糖苷酶，作为外切几丁质酶的一种，其主要功能在于从几丁质链的非还原端开始，逐步催化并释放 N-乙酰氨基葡萄糖二聚体。例如，Jia 等^[13]从土壤中筛选出了能够产生几丁质酶 rCHI 的克劳氏芽孢杆菌 TCCC 11004。rCHI 具有外切酶活性，可催化 N-乙酰几丁质的末端，使其逐步释放(GlcNAc)₂。

β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶能够特异性地催化几丁寡糖分子中的糖苷键断裂，从而将其逐步水解为单体 N-乙酰氨基葡萄糖^[12]。例如，Qin 等^[14]通过生物信息学分析，从乙酰梭菌基因组中鉴定出 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶编码基因 CaHex。其在 90℃ 催化活性最高，并表现出较强 pH 稳定性。

(2) 内切几丁质酶

内切几丁质酶以其独特的催化机制，在几丁质聚合物链的内部实现非定向性的随机裂解，从而精准地生成一系列几丁寡糖产物。例如，Xing 等^[15]从链霉菌 ATCC 15855 中克隆表达几丁质酶 SbChiAJ103，其水解几丁质的最佳 pH 为 7.0，最适温度为 45℃。SbChiAJ103 几丁质酶能够识别含有至少 3 个单糖单元的几丁寡糖链并释放几丁二糖 (GlcNAc)₂。

1.5 本课题的研究目的和主要研究内容

1.5.1 研究目的和意义

我国水产资源丰富，每年虾、蟹壳的储备粮十分庞大，但利用率极低，浪费了大量的资源，也污染了环境。几丁质，作为虾蟹壳中的主要构成成分，其降解过程不仅产生了丰富多样的产物，而且这些产物展现出了显著的生物功能特性。这些特性使得几丁质的降解产物在多个领域，包括医药、农业以及食品工业中，

均具备了巨大的潜在应用价值。利用生物酶降解几丁质，具有专一性强、无污染、成本低等优点，是未来几丁质降解的主流策略。但目前几丁质降解酶的应用却存在着种类少、效率低、来源局限、工业应用差等缺点。因此，如何筛选高性能几丁质酶产生菌与挖掘几丁质酶，是本课题要关注的焦点。

1.5.2 主要研究内容

本研究从新疆达坂城盐湖采集土壤样本，从中筛选高产几丁质酶菌株，并克隆表达其中的几丁质酶，研究其酶学性质，主要的研究内容如下：

- 1、采集新疆达坂城盐湖区域土壤样本，进行富集培养与含几丁质培养基平板透明圈筛选，筛选分离高产几丁质酶菌株，并进行菌株鉴定；
- 2、优化分离获得菌株的产几丁质酶条件；
- 3、大肠杆菌 BL21(DE3)中进行几丁质酶异源表达，研究酶催化特性；
- 4、研究重组几丁质酶的酶解产物分布，以及对虾蟹壳几丁质降解的应用。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料与试剂

2.1.1 菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒见表 2-1。

表 2-1 菌株、质粒表

菌株和质粒	特征及用途	来源
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	用于质粒构建和蛋白表达	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-28a-ChiB162	Kan ^r , ChiB162 重组蛋白表达	本文构建
pET-28a-ChiB162	Kan ^r , ChiB162 重组蛋白表达质粒	本文构建
pET-28a(+)	Kan ^r , 大肠杆菌蛋白表达质粒	实验室保藏

2.1.2 实验仪器

本研究使用的主要仪器见表 2-2。

表 2-2 主要实验仪器列表

仪器名称	型号
数显恒温水浴锅	HH-S2
精密电子天平	BSA224S
手提式高压蒸汽灭菌器	DSX-24L
超净工作台	SW-CJ-IG
生化培养箱	SHP-150
恒温摇床	MQT-60R
高速离心机	Centrifuge 5420
微机型 pH 计	pHS-3E
PCR 仪	T960A

2.1.3 试剂

本章所使用的试剂见表 2-3：

表 2-3 主要试剂列表

试剂名称	级别
几丁质	生物试剂 BR

胰蛋白胨	生物试剂 BR
酵母粉	生物试剂 BR
NaCl	生物试剂 AR
琼脂粉	生物试剂 BR
浓盐酸	生物试剂 AR
K ₂ HPO ₄	生物试剂 AR
MgSO ₄ ·7H ₂ O	生物试剂 AR
KH ₂ PO ₄	生物试剂 AR
FeSO ₄ ·7H ₂ O	生物试剂 AR
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	生物试剂 AR
NaOH	生物试剂 AR
N-乙酰氨基葡萄糖盐酸盐	生物试剂 BR
分子生物学试剂盒	生物试剂 BR

2.1.4 培养基和溶剂

本研究所使用的培养基见表 2-4。

表 2-4 主要培养基及溶剂配制方法

培养基	配置方法
富集培养基 (g/L)	几丁质 1, 胰蛋白胨 3, 酵母粉 3, NaCl 1
初筛培养基 (g/L)	几丁质 10、琼脂粉 20 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5、K ₂ HPO ₄ 0.7、KH ₂ PO ₄ 0.3、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1
发酵 (复筛) 培养基 (g/L)	几丁质 10、酵母粉 5、胰蛋白胨 5、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5、K ₂ HPO ₄ 0.7、KH ₂ PO ₄ 0.3、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1、ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.1
LB 培养基 (g/L)	胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10 (固体培养基添加 2%琼脂粉)

2.2 分子生物学操作方法

2.2.1 质粒提取

将质粒接种到相应载体抗性的 5 mL LB 培养基中, 37℃, 180 rpm 过夜培养后, 12000 rpm 离心 1 min, 收集菌体沉淀。具体参照试剂盒说明书。

2.2.2 聚合酶链式反应体系和条件 (PCR)

PCR 反应体系和程序如表 2-5 所示。

表 2-5 PCR 扩增体系

组分	体积 (μL)
phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1
2 \times pHanta Max Buffer	25
上游引物	2
下游引物	2
模板	2
ddH ₂ O	up to 50

表 2-6 PCR 扩增程序

循环步骤	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间	循环数
预变性	98	3 min	} 30cycles
变性	98	5 sec	
退火	$T_m \pm 5$	15 sec	
延伸	72	5~10 sec/kb	
下游引物	72	15 s	

2.2.3 核酸凝胶电泳

取 3 μL DNA 样品与适量上样缓冲液混匀，加入琼脂糖凝胶上样孔中，电泳结束后，观察条带大小并记录。

2.2.4 产物纯化

将 PCR 扩增结束后的 PCR 反应液或切好的凝胶按照试剂盒说明书操作纯化回收。

2.2.5 同源重组反应体系及条件

在冰上配置以下反应体系。配制完成后，振荡离心混匀，置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 后冰上冷却，用于之后的转化。

表 2-7 同源重组反应体系

组分	体积 (μL)
----	----------------------

线性化载体	0.02×载体碱基对数 (ng)
插入片段	0.04×片段碱基对数 (ng)
ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V2	5
ddH ₂ O	Up to 10
总计	10

2.2.6 *E.coli* BL21(DE3)感受态的制备与转化

感受态的制备及质粒转化流程参考文献报道^[16]。

2.2.7 菌液 PCR 及其阳性克隆验证

挑取平板上的单菌落于 500 μL LB 培养基, 37°C 培养 3~4 h, 以菌液为模板, 按照表 2-5 配制反应体系。PCR 扩增程序见表 2-6, PCR 扩增结束后, 进行核酸胶验证, 并送检测公司进行测序。

2.3 实验方法

2.3.1 样品采集

采集新疆达坂城盐湖区域的土壤样本, 取土后保存至保温箱中带回实验室。

2.3.2 富集培养

取 5 g 土壤样品, 加入 50 mL 富集培养基, 摇床 30°C, 180 rpm 培养 2 d。

2.3.3 产几丁质酶菌株分离

将富集培养的菌液, 按 10 倍梯度稀释的方法, 共稀释 6 个梯度。每个梯度取 200 μL 菌悬液涂布固体初筛培养基, 30°C 倒置培养 3 d。产生透明圈的菌株划线分离, 并保藏。

2.3.4 菌种初筛

将 2.4.3 中分离获得的菌株单菌落用灭菌后的去离子水重悬, 点样至固体初筛培养基, 30°C 倒置培养 3 d。测量平板上菌落和透明圈的直径, 根据两者的比值选择几丁质酶产量较高的菌株进行进一步筛选。

2.3.5 菌种复筛

在 LB 培养基中, 接种经初筛后的菌株, 在 30°C 摇床中培养 24 h, 按接种量 2% 的比例将培养好的菌株转入复筛培养基部继续培养 3 d。利用 DNS 方法, 筛选出具有较高酶活力的菌株, 以便后续深入研究, 对发酵液中的几丁质酶进行酶活力测定。

2.3.6 DNS 法测定酶活力

(1) 配制 1.12 g/L (5 mM) N-乙酰氨基葡萄糖标准溶液，将 0、1、2、3、4、5 mM 标准液加入到试管中，再加入 3 mL DNS 显色剂，在试管中混合均匀，放入沸水中反应 5 min，去离子水定容至 25 mL，测量 540 nm 吸光值。分别以 N-乙酰氨基葡萄糖浓度和 A_{540} 为横纵坐标绘制标准曲线（图 2-1）。

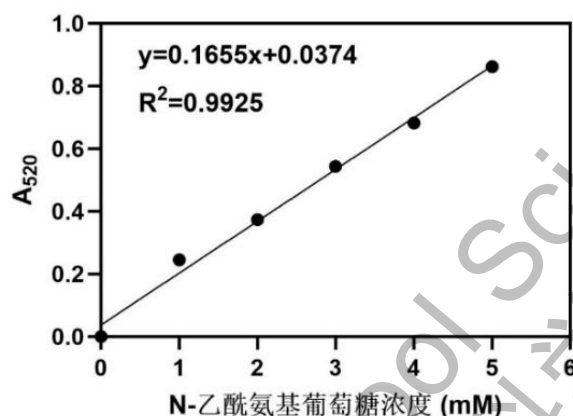


图 2-1 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线

(2) 为了测定菌株的酶活力，发酵液在 7000 rpm 下的条件离心 10 min。取 1 mL 上清液，1 mL PB 缓冲液和 1 mL 1% 几丁质混匀，37°C 保温 1 h。按上述方法测量吸光值并带入公式计算还原糖含量。酶活力单位 (U) 定义参考文献报道 [17]。

2.3.7 菌株产酶条件的优化

2.3.7.1 菌株生长曲线和产酶曲线

选取酶活力最高的菌株，接种 LB 培养基，30°C，摇床 180 rpm 培养 24 h，再以 5% 的接种量转接发酵培养基，同样条件下培养 0~7 d，每隔 1 d 测定酶活力和菌体浓度 OD_{600} 。

2.3.7.2 碳源添加量优化

以 5% 的接种量，分别使用 5、7、10、14、17 g/L 几丁质为碳源进行发酵产酶，探究碳源的最适添加量。

2.3.7.3 发酵温度优化

以 5% 的接种量，几丁质浓度为 7 g/L 的条件下，将接种好的菌株分别在 20°C、

26℃、30℃、37℃温度下发酵。

2.3.7.4 发酵初始 pH 优化

以 5% 的接种量，几丁质浓度 7 g/L，30℃ 培养，调整发酵培养基的初始 pH 值为 4、5、6 和 7 进行发酵产酶。

2.3.7.5 摇瓶培养转速优化

以 5% 的接种量，几丁质浓度为 7 g/L，培养温度 30℃，初始 pH 6.0 的条件下，分别调整摇瓶培养转速为 160、180、200、220 rpm 进行发酵产酶，研究发酵产酶的最适摇瓶培养转速。

2.3.7.6 种子液接种量优化

几丁质浓度为 7 g/L，发酵培养基 pH 值为 6.0，培养温度 30℃，摇瓶培养转速为 180 rpm 的条件下，分别以 3%、4%、5%、6% (v/v) 的接种量进行接种后发酵培养。

2.3.8 产几丁质酶菌株的鉴定与克隆

2.3.8.1 产几丁质酶菌株的鉴定

使用引物 (27F: GTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCATGAAG; 1492R: GGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTATTTTCCTTTAAGCC) 对菌株基因组进行 PCR 扩增，PCR 产物进行测序。测序结果利用 NCBI 网站中 BLAST 工具进行比对分析，用 MEGA11.0 软件分析同源性，构建系统发育树。

2.3.8.2 几丁质酶的基因克隆与表达载体构建

设计几丁质酶基因扩增引物 (ChiB162-For/ChiB162-Rev)，以 Chit62 菌株基因组 DNA 为模板，扩增目的片段。线性化载体 pET-28a-ZT 以 pET-28a(+) 质粒为模板，使用载体引物 (pET-28a-ZT-For/pET-28a-ZT-Rev) 进行 PCR 扩增。纯化回收产物，按照同源重组体系 (表 2-7) 配制反应后转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中，经过菌液 PCR 验证 (使用引物 YZ-For 与 YZ-Rev) 和测序后得到正确的重组质粒，获得重组大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET-28a-ChiB162。

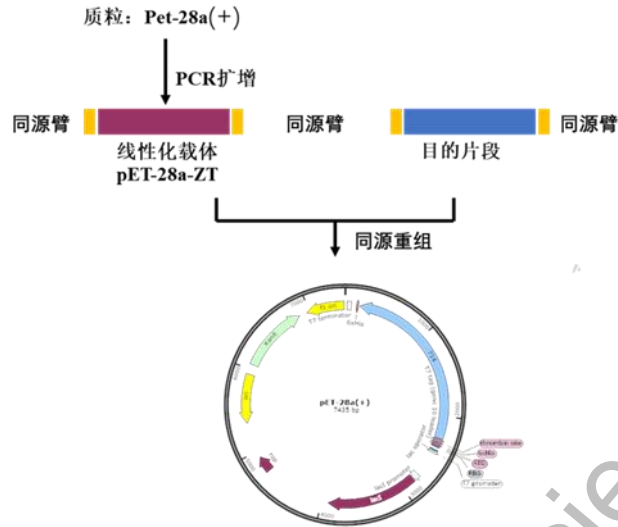


图 2-2 pET-28a-ChiB162 质粒构建示意图

表 2-9 重组质粒构建所用引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
ChiB162-For	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAAGAAAGCCGCTTCATCT
ChiB162-Rev	GTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTATTTCTTTAAGCCTGTACTT
pET-28a-ZT-For	AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCAC
pET-28a-ZT-Rev	GAATTCGGATCCGCGACCCATTTGCTGTC
YZ-For	CAGCCATATGGCTAGCATGAC
YZ-Rev	TTTCGGGCTTTGTTAGCAGCC

2.3.9 几丁质酶的表达与纯化

2.3.9.1 几丁质酶的诱导表达

将待培养菌株接种至含有 Kan 抗性的 50 mL 的 LB 液体培养基中, 37°C 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6, 加入适量 IPTG, 20°C 继续培养 24 h。

2.3.9.2 重组酶的纯化与 SDS-PAGE 验证分析

重组酶的纯化流程与 SDS-PAGE 分析参考文献报道^[17]。

2.3.10 几丁质酶的酶学性质表征

2.3.10.1 几丁质酶最适反应 pH

用不同pH缓冲液(pH 4.5-9.0)配制0.5 %几丁质底物,置于55 °C水浴中反应30 min,用DNS法测定酶活力。对比确定最适反应pH。

2.3.10.2 几丁质酶的最适反应温度

用pH7.5的缓冲液配制2%几丁质底物,置于不同温度(35 °C、45 °C、55 °C、65 °C、75 °C)中水浴反应30 min,用 DNS 方法测定酶在各温度下的活力,从而对最适宜的反应温度进行比较确定。

2.3.11 重组酶水解几丁质的产物分析

重组酶水解几丁质的产物分析采用薄层色谱法。以 1%的几丁质为底物来研究其水解特性,将纯化的酶液与 1%几丁质溶液混合,在最适反应条件下反应 0.5 h 和 3h 时终止反应取样。以标准品(GlcNAc)₂~(GlcNAc)₄对照,用毛细管取 15 μL 进行点样,各点之间的间距为 1 cm,展距为 80 cm,在层析缸中采用上行法展开 1.5~2 h,展开结束后用显色剂喷洒在干燥的硅胶板上进行染色,再用吹风机对硅胶板进行加热直至有颜色显出。

2.3.12 重组酶水解虾蟹壳几丁质

将干燥后的虾蟹壳使用球磨机研磨成颗粒,称取 5 g 虾蟹壳粉末,加入预冷的浓硫酸 50 mL,在 40°C 条件下水浴 30 min 至几丁质溶解,4°C 冰箱冷藏过夜后抽滤。滤液 8000 rpm 离心 20 min,所得沉淀加水重悬离心,多次重复洗涤直至所得虾蟹壳几丁质至中性,加入 50 mL Tis-HCl 缓冲液配置虾蟹壳几丁质。将纯化的几丁质酶酶液(2 mg/mL)与虾蟹壳几丁质混合,使得虾蟹壳几丁质终浓度为 10 g/L,55°C 反应 5 h。每隔 1 h 取样,按文献报道方法^[18],检测几丁寡糖浓度。

三、结果与分析

3.1 菌株筛选

3.1.1 几丁质酶产生菌分离

经初步分离发现，富集后的菌株能够在含几丁质筛选培养基中生长，并可以生成透明圈。初步分离筛选时，不以产生透明圈大小为据，凡菌落周围产生透明圈的菌株都进行划线分离，根据菌落形态、颜色等差异，对比去除重复后，得到151株菌。

3.1.2 初筛

为了筛选出产酶量大、产酶稳定、酶活较强的菌株，将分离纯化的目标菌点接至固体初筛培养基中，30℃培养3 d。菌株点接种筛选如图3-1所示。



图3-1 几丁质酶产生菌在几丁质初筛平板上形成透明圈

从分离到的151株菌中筛选出19株菌产酶较为稳定的菌，利用游标卡尺测量其菌落直径与透明圈直径。结果如表3-1所示。

表3-1 几丁质产生菌初筛

菌株编号	菌落直径 (mm)	透明圈直径 (mm)	直径比
Chit30	1.15	1.63	1.42±0.05
Chit36	2.58	2.98	1.15±0.03
Chit48	3.25	6.35	1.95±0.11
Chit53	1.42	1.49	1.05±0.02
Chit62	3.02	5.98	1.98±0.18
Chit65	2.36	3.25	1.38±0.03
Chit81	1.20	1.69	1.41±0.07
Chit92	2.11	3.42	1.62±0.04
Chit95	5.18	8.84	1.71±0.10
Chit99	3.25	6.58	2.02±0.16
Chit108	3.14	5.23	1.67±0.08

Chit110	4.38	5.52	1.26±0.03
Chit121	2.24	3.24	1.45±0.05
Chit128	3.02	3.42	1.13±0.02
Chit135	2.84	5.12	1.80±0.09
Chit137	4.11	7.24	1.76±0.11
Chit139	3.22	5.11	1.59±0.08
Chit143	3.33	4.22	1.27±0.02
Chit150	1.57	2.01	1.28±0.03

几丁质初筛培养基透明圈法受接种工具、菌落大小、培养基中几丁质的含量、几丁质形态、菌株本身的适应性等因素的影响。因此，该方法仅适用于目标菌株的初步筛选。为了进一步确定高产几丁质酶菌株，对上述 19 株菌进行液体发酵培养，测量胞外酶活性。

3.1.3 复筛

在 30℃ 摇床中，将上述 19 株菌株接种在 LB 培养基中培养 24 h，按照 2% 的接种量转接至复筛培养基，30℃ 培养 3 d。发酵液酶活力如图所示（图 3-2）。Chit62 的几丁质酶活力最高，为 34.10 U/mL。因此选择 Chit62 做进一步研究。

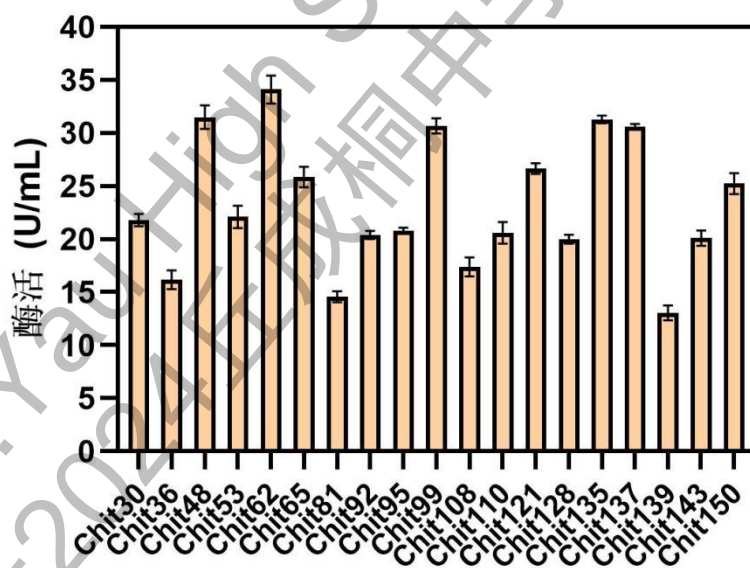


图 3-2 19 株几丁质酶产生菌粗酶酶活测定

3.2 菌株鉴定

3.2.1 菌落形态

观察菌种 Chit62 在固体平板培养基上的单菌落状态，该菌株呈现乳白色，中心微凸，圆形（图 3-3）。革兰氏染色结果表明，该菌是革兰氏阳性菌株（图

3-4)。

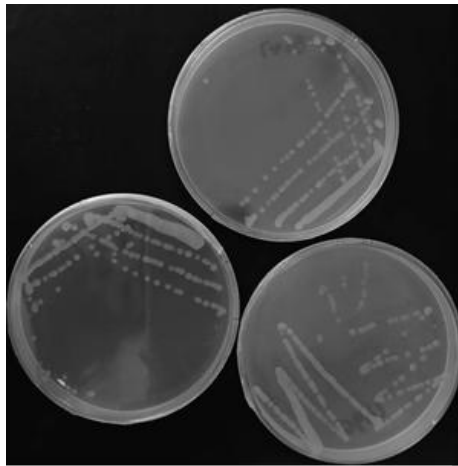


图 3-3 Chit62 菌落形态图

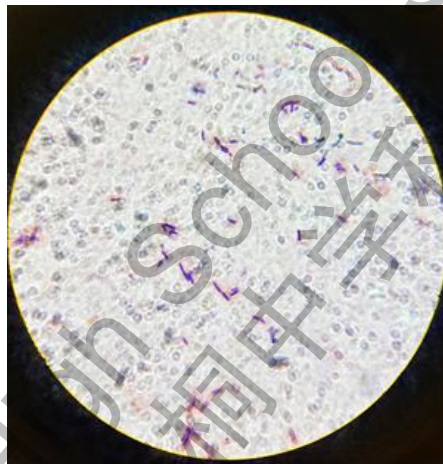


图 3-4 Chit62 革兰氏染色结果图

3.2.2 16s rRNA 鉴定

使用 16S 通用引物扩增 Chit62 基因组，扩增产物送测序公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析，与已有保藏序列进行同源性比较，并将采用 Neighbor-Joining 方法在 MEGA 软件中绘制系统发育树。结果如图 3-5 所示，确定该菌株为 *Bacillus licheniformis*。

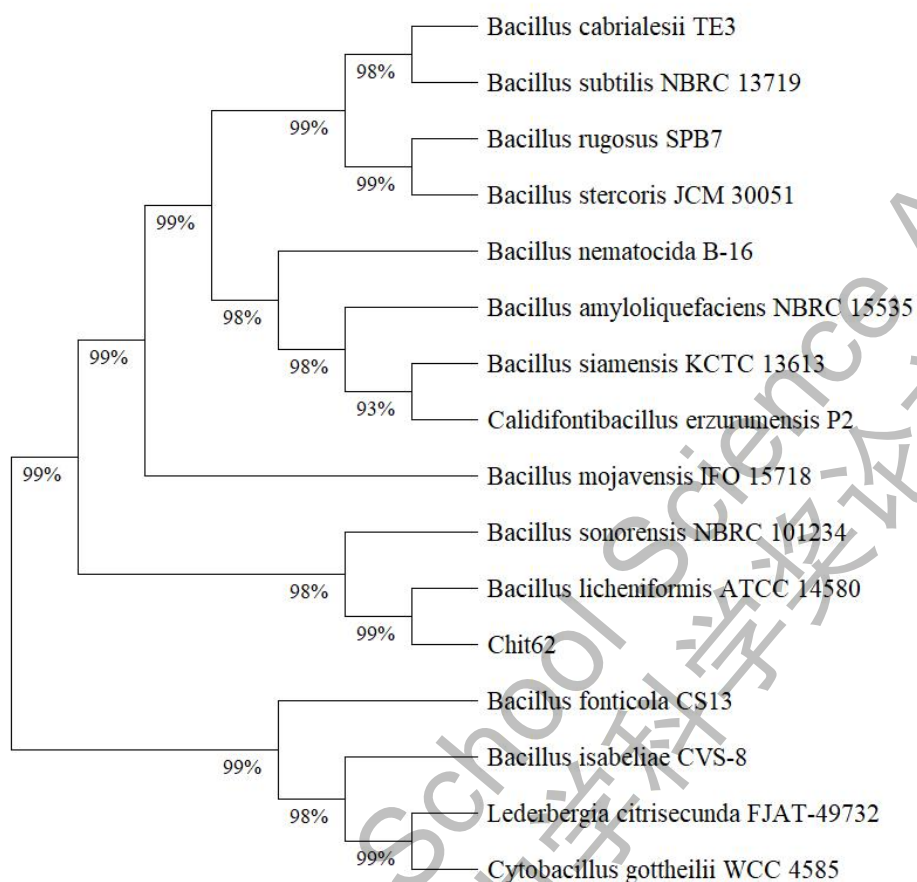


图 3-5 Chit62 菌株系统发育树

3.3 Chit62 菌株产酶条件优化

3.3.1 菌株产酶曲线和生长曲线

Chit62 菌株在发酵培养基中进行培养，每 1 d 测定酶活力和菌体浓度，由图 3-6 可以看出，第 3 d 菌株生长达到稳定期，第 4 d 产酶的酶活力达到峰值，在 4 d 之后酶活力逐渐降低。由此判断 4 d 为该菌株发酵产酶的最佳时间。

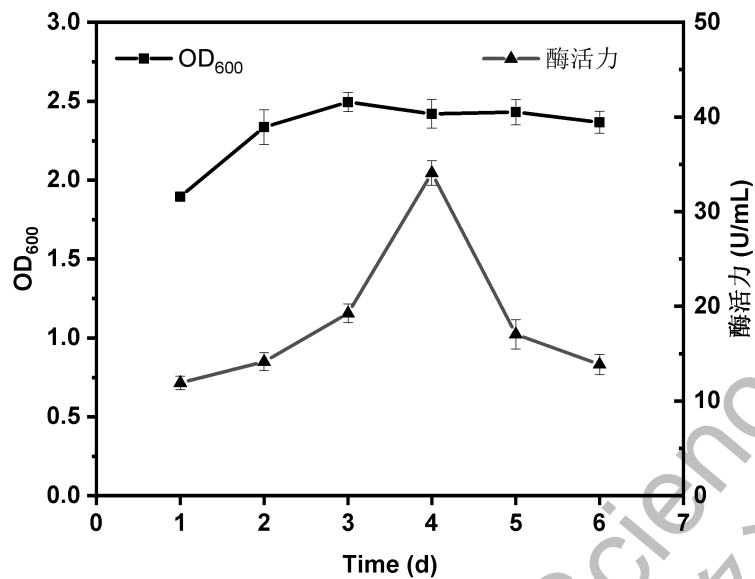


图 3-6 Chit62 生长曲线和产酶曲线

3.3.2 碳源浓度

选择几丁质为 Chit62 唯一碳源。图 3-7 显示，酶活力随着几丁质浓度的增加而增加。几丁质浓度在 7 g/L 时，经过 72 h 的发酵，酶活达到最高值，为 34.85 U/mL，是优化前的 1.03 倍。随后随着浓度的增加，酶活越来越低。

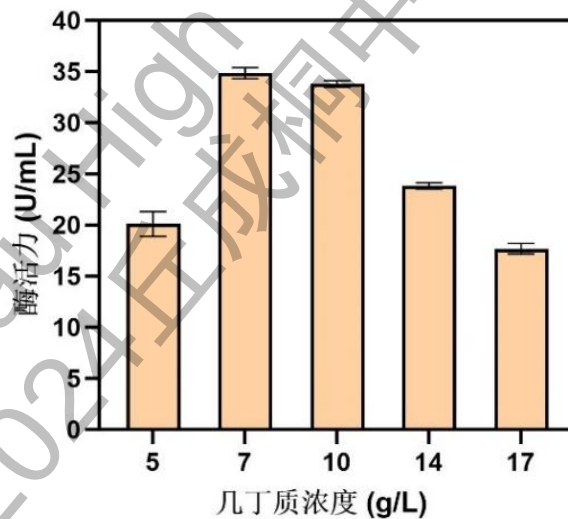


图 3-7 不同几丁质的浓度与酶活力的关系

3.3.3 发酵温度

由图 3-8 可知，随着发酵温度的逐渐升高，菌体代谢加快，从而促进产酶量的增加，因此酶活也随着增高，酶活在 30℃ 时为 40.14 U/mL，达到最高是优化前的 1.19 倍；超过 30℃ 后，酶活开始下降。

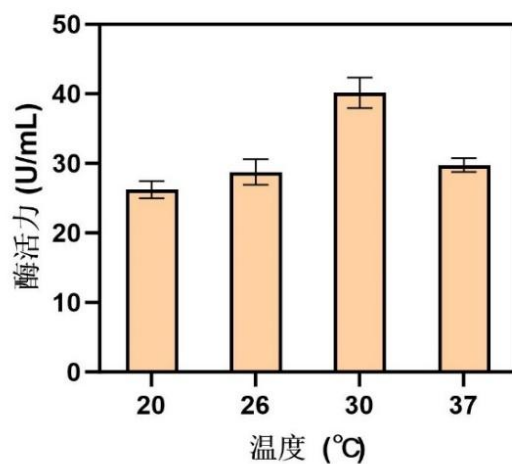


图 3-8 发酵温度与酶活力的关系

3.3.4 发酵初始 pH 值

由图 3-9 可知，酶活力在初始 pH 6.0 时为 53.73 U/mL，达到最高。而 pH 小于 6.0 和超过 6.0 后，酶活显著降低。

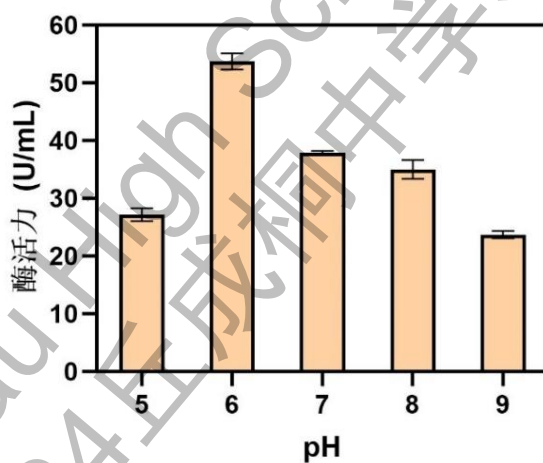


图 3-9 发酵初始 pH 值与酶活力的关系

3.3.5 摇瓶培养转速

如图 3-10 所示，培养转速在 180 rpm 时，Chit62 产酶活力最高，达到 55.44 U/mL。随着转速增加，酶活逐渐下降。因此选择菌株 Chit62 产酶的最佳摇瓶培养转速为 180 rpm。

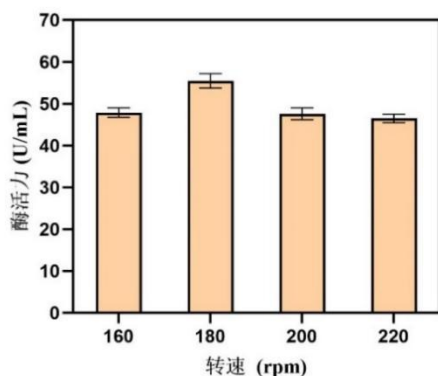


图 3-10 摇瓶培养转速与酶活力的关系

3.3.6 接种量

由图 3-11 可知，接种量在 5% 时，菌株的酶活力最大，为 62.30 U/mL，是优化前的 1.86 倍。因此，选择 5% 为产酶最佳接种量。

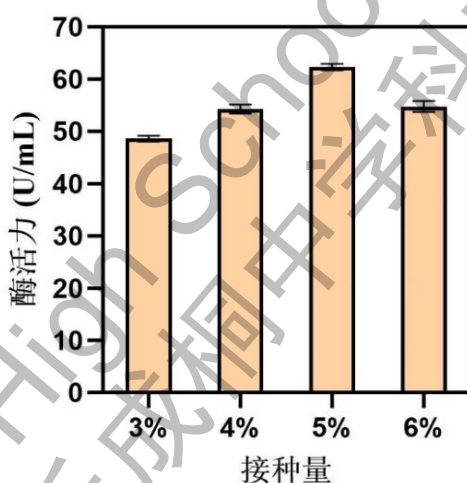


图 3-11 接种量与酶活力的关系

综上，确定最佳几丁质浓度为 7 g/L，培养温度为 30℃，初始 pH 为 6.0，摇瓶培养转速为 180 rpm，接种量为 5%，胞外几丁质酶酶活达到 62.30 U/mL，为未优化前的 1.86 倍。

3.4 几丁质酶的基因克隆与蛋白表达

3.4.1 几丁质酶基因扩增

由 3.2.2 中菌株 16s rRNA 鉴定结果显示，Chit62 为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)。基于 NCBI 中收录的 *B. licheniformis* 来源几丁质酶序列，设计引

物 ChiBl62-For 与 ChiBl62-Rev，克隆 Chit62 中几丁质酶基因。结果如图 3-12 所示，Chit62 几丁质酶基因片段成果扩增，基因片段大小在 2000 bp 左右。

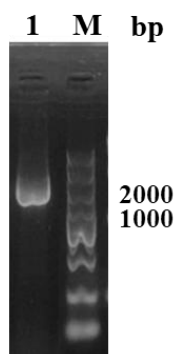


图 3-12 Chit62 几丁质酶基因片段电泳图

注：M：Marker，泳道 1：基因扩增片段。

3.4.2 重组质粒 PCR 扩增验证

采用同源重组的方法(见 2.4.3.2)将目的基因克隆至质粒 pET-28a(+)载体上，获得 pET-28a-ChiBl62。重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)后，进行菌液 PCR 验证。如图 3-13 所示，电泳条带大小为 2000 bp 左右，与 ChiBl62 基因大小值一致。挑选菌液 PCR 正确重组质粒测序验证，ChiBl62 基因大小为 2079 bp，蛋白序列长度为 693 个氨基酸。

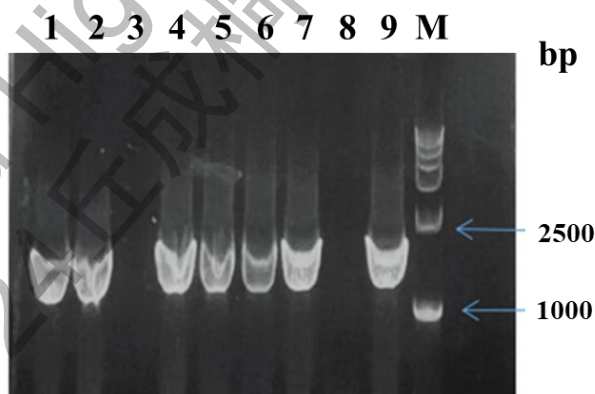


图 3-13 菌液 PCR 验证扩增图

注：M：Marker，泳道 1-9：随机挑选的菌落。

3.4.3 蛋白表达与验证

重组菌株蛋白表达结果如图 3-14 所示，粗酶液与纯化后的蛋白均在在 65~91 kDa 之间出现明显的条带与预测分子量大小相吻合。

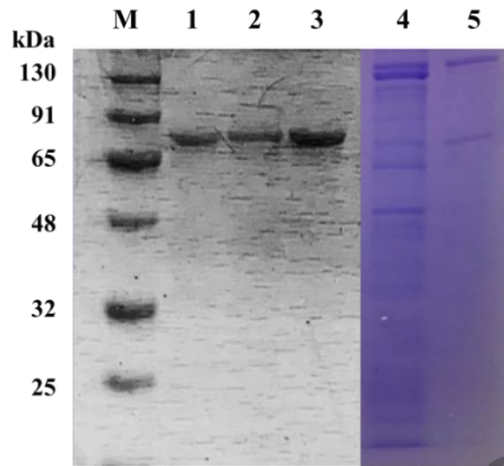


图 3-14 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

注：M：Marker；泳道 1-3：纯化后 ChiBI62；泳道 4：重组菌破碎后上清；泳道 5：重组菌破碎后沉淀。

3.5 重组几丁质酶 rChiBI62 的酶学性质

3.5.1 最适反应 pH

新疆极端环境中存在各种 pH 值不同的生态系统，尤其在盐碱地区，其环境 pH 最高可超过 9。因此新疆极端环境来源的微生物体产生的酶通常具有一定的 pH 耐受性，以适应这些不同的环境条件。通过设置不同 pH（4, 5, 6, 7, 8, 9, 10）的几丁质酶反应环境，检测 rChiBI62 最适反应 pH。rChiBI62 在 pH 为 8.0 时呈现最大酶活力，且在 pH 4-10 范围内均保留 60% 以上的酶活（图 3-15），这揭示了该几丁质酶展现出了广泛的 pH 耐受性和适应性。在 pH 值 8-10 的碱性区域内，该几丁质酶的活性能够稳定地保持在初始活性的 80% 以上，这一特性显著指示了该酶在较高 pH 环境中具备更为优越的催化效率与稳定性，进一步拓宽了其潜在的应用领域。

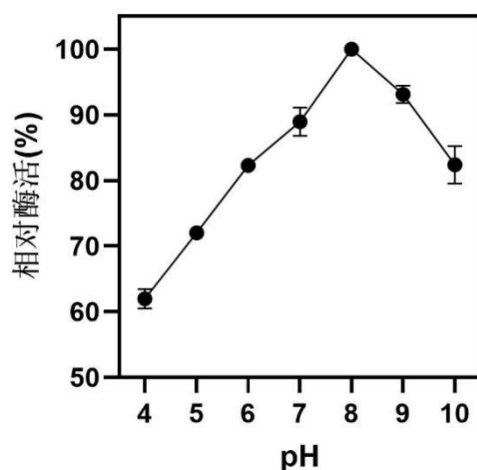


图 3-15 pH 对 rChiBl62 酶活性的影响

3.5.2 最适反应温度

新疆地区昼夜温差较大，因此推测Chit62可能在不同温度下均具有较好的稳定性。进一步考察Chit62来源的几丁质酶rChiBl62在不同温度条件下（35, 45, 55, 65, 75, 85℃）的酶活力。如图3-16所示，rChiBl62最适反应温度为55℃，在35℃-85℃之间都有良好的酶学活性，均能达到75%以上的相对酶活。结果表明，rChiBl62具有良好的温度稳定性，这使得其在高温和其他极端条件下具有较好的适应性和应用潜力。

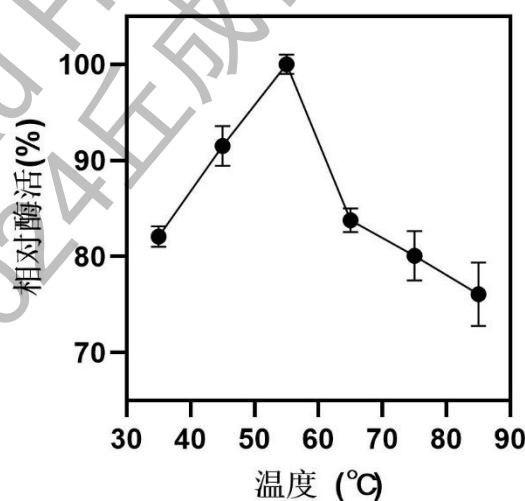


图 3-16 温度对 rChiBl62 酶活性的影响

3.6 重组酶 rChiBl62 降解几丁质产物分析及虾蟹壳几丁质降解应用

将重组酶与 1%几丁质在 55℃，pH 8.0 条件下反应不同的时间（0.5 h，3 h），

离心取上清点样，进行薄层层析。图 3-17 显示，重组酶 rChiBI62 降解几丁质的主要产物条带位置为三糖及以上的几丁寡糖，酶解产物几乎不含有单糖。因此，我们推测 rChiBI62 为内切几丁质酶。

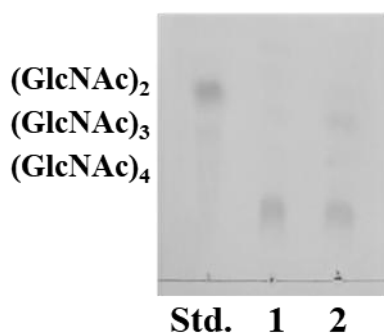


图 3-17 rChiBI62 降解几丁质产物薄层层析图

注：std.：几丁二糖、几丁三糖与几丁四糖标准品，1：水解 0.5 h 降解产物，2：水解 3 h 降解产物。

以 10 g/L 虾蟹壳几丁质为底物，使用重组 rChiBI62 在 55°C，pH 8.0 条件下反应 5 h，测量几丁寡糖产量。结果如图 3-18 所示，rChiBI62 在 5 h 内可将 42.1% 虾蟹壳几丁质酶解为几丁寡糖，具有实际应用潜力。

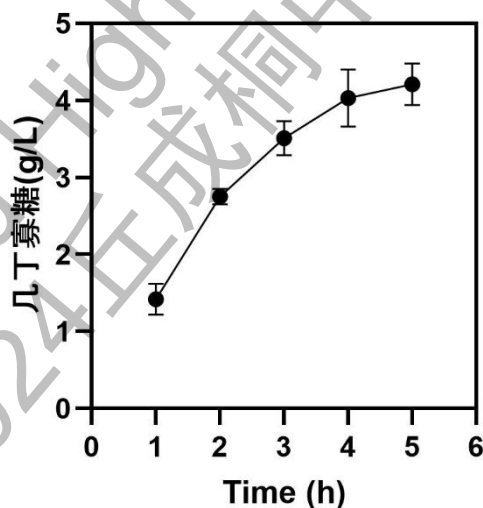


图 3-18 rChiBI62 降解虾蟹壳几丁质时间曲线图

四、结论与展望

4.1 结论

本课题从新疆达坂城盐湖区域采样,分离筛选产几丁质酶菌株,并对产酶条件进行优化。进一步从中克隆表达几丁质酶基因,并对其酶学性质与酶解产物进行分析,主要的结论如下:

(1) 对新疆极端盐碱地区样品进行富集培养与含几丁质培养基平板透明圈筛选,初筛获得 19 株产几丁质酶稳定的菌株,进一步通过摇瓶发酵与酶活检测复筛,获得产酶活性最高的菌株 Chit62,胞外胞外几丁质酶活力为 34.10 U/mL。

(2) 通过菌落形态鉴定与 16s rRNA 鉴定,确定 Chit62 菌株为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)。对菌株产酶条件优化,发现几丁质浓度为 7 g/L,发酵温度 30 °C, pH 值 6.0,接种量 5%,发酵培养 4 d 后,几丁质酶活最高可达 62.30 U/mL,是未优化前的 1.86 倍。

(3) 扩增 Chit62 菌株几丁质酶基因,基因条带大小为 2049 bp,蛋白序列长度为 693 个氨基酸。克隆 Chit62 菌株几丁质酶基因 ChiB162 至 pET28a 载体,转入 *E. coli* BL21(DE3)后,重组菌能够实现 Chit62 的表达。

(4) 探究重组蛋白 rChiB162 酶学性质, rChiB162 具有较强的 pH 适应性,其最适 pH 为 8.0。在 pH 4-10 范围内均保留 60%以上的酶活, pH 8-10 范围内,几丁质酶酶活维持在 80%以上。rChiB162 最适反应温度为 55°C,在 35°C-85°C 之间都有良好的酶学活性,均能达到 75%以上的相对酶活。

(5) rChiB162 降解几丁质主要产物为三糖及以上的寡糖,推定为内切几丁质酶。以 10 g/L 虾蟹壳几丁质为底物,55°C, pH 8.0 条件下反应 5 h, rChiB162 可将 42.1%虾蟹壳几丁质酶解为几丁寡糖,具有工业化应用潜力。

4.2 展望

目前,本研究尚未能对几丁质降解酶进行规模化发酵试验,这一不足限制了我们对几丁质降解酶在实际工业生产中应用潜力的全面评估。规模化发酵试验对于评估酶的生产效率、稳定性及其在工业规模上的应用可行性至关重要,未来的工作将着重于这一领域,以实现可持续发展的几丁质降解生物技术解决方案。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会等. 中国渔业统计年鉴, 2023.
- [2] 王珂历. 虾蟹壳的开发和产品的利用[J]. 科技资讯, 2006, 22: 212~213.
- [3] I. Hamed, F. Özogul and J. M. Regenstein. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, (48): 40-50.
- [4] 卢春兰, 王蓓. 壳寡糖和几丁寡糖的制备方法及其在水产上的应用[J]. 广东农业科学 2023, 50(02):136-146.
- [5] 刘力睿, 潘杰, 李猛. 微生物几丁质酶的研究进展、应用及展望[J]. 生物资源, 2020, 42(05): 494-504.
- [6] I Nagaoka, A Tsuruta, M Yoshimura. Chondroprotective action of glucosamine, a chitosan monomer, on the joint health of athletes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 795-800.
- [7] T Soni, M Zhuang, M Kumar, et al. Multifaceted production strategies and applications of glucosamine: a comprehensive review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(1):100-120.
- [8] 吴昊. 酶法制备N-乙酰氨基葡萄糖及催化机理的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022.
- [9] 肖宇, 于宏伟, 马爱进, 等. 球磨、超声和盐酸处理对几丁质的微观结构和酶促脱乙酰效率的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(07): 114-122.
- [10] X Zhang, J Yuan, F Li, et al. Chitin synthesis and degradation in crustaceans: A genomic view and application[J]. Marine Drugs, 2021, 19(3): 153.
- [11] S Sreekumar, J Wattjes, A Niehues, et al. Biotechnologically produced chitosans with nonrandom acetylation patterns differ from conventional chitosans in properties and activities[J]. Nature Communications, 2022, 13(1):7125.
- [12] 张阿磊, 魏国光, 张弛, 等. 几丁质资源生物降解和高值转化的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 1-21.
- [13] L Jia, W Qi, K Wang, et al. Efficient bioconversion of chitinous waste to

N-acetylchitobiose and N-acetylglucosamine using a novel salt-tolerant Chitinase from *Bacillus clausii*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2023, 11(31): 11470-11481.

[14]X Qin, Y Xin, X Su, et al. Heterologous expression and characterization of thermostable chitinase and β -N-acetylhexosaminidase from *Caldicellulosiruptor acetigenus* and their synergistic action on the bioconversion of chitin into N-acetyl-d-glucosamine[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192:250-257.

[15]A Xing, Y Hu, W Wang, et al. A novel microbial-derived family 19 endochitinase with exochitinase activity and its immobilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(11): 3565-3578.

[16]张圆. 产几丁质酶菌株的筛选与酶学性质研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.

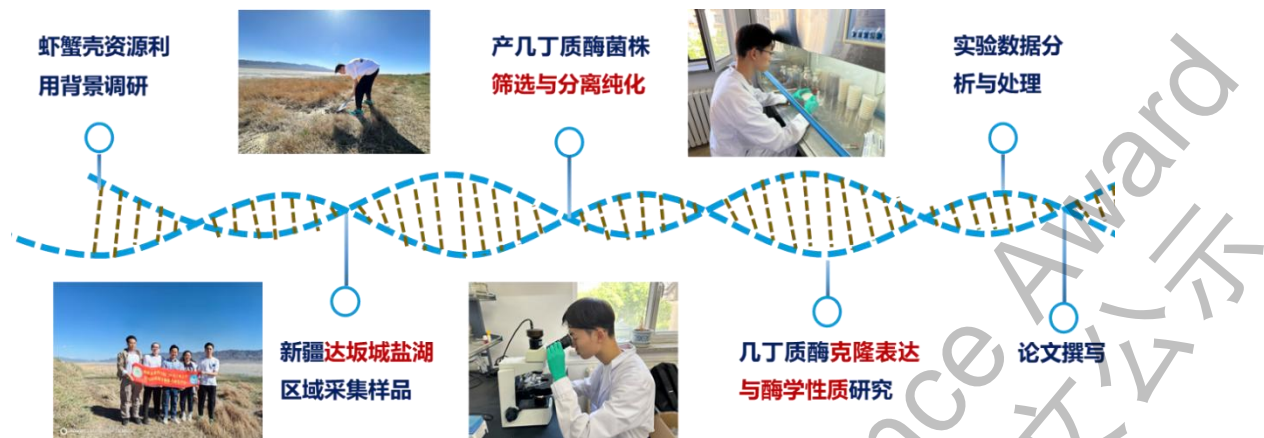
[17]王艳军. 海洋假交替单胞菌属细菌降解几丁质的特性及新型几丁质酶的表面表征[D]. 青岛: 山东大学, 2020.

[18]乔兴忠, 李永娴, 汤熙翔. 发酵法产酶生产几丁寡糖的工艺研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49 (02): 251-255.

致谢

课题实验与论文撰写的完成离不开南京工业大学食品与轻工学院江凌教授从论文选题、实验设计、问题解惑等方方面面的无私无偿的指导与帮助。与江凌教授结缘于 2023 年国际基因工程机器大赛 (iGEM)。彼时, 江老师作为参赛队伍的指导老师, 我作为参赛队伍的队长。平时的沟通交流与学习中, 深深被江老师的严谨的治学态度, 渊博的理论知识, 以及丰富的科研实验经验所折服。

本课题的萌芽起源于平常的小龙虾消费中, 一只小龙虾仅有不到三分之一被食用, 大部分虾壳成为餐余垃圾。乘着对生物科学的浓厚兴趣, 我调研了解到南京乃至江苏的小龙虾、螃蟹等餐饮消费量巨大, 随之带来的虾蟹壳的废弃处理问题严重, 如何绿色有效利用废弃虾蟹壳资源的问题在我心头萦绕。得益于 iGEM 比赛后与江老师时常保持联系, 我向其请教关于虾蟹壳的生物处理方法, 了解到其中最关键的核心在于优质几丁质酶与产酶菌株, 并在此时由江老师指导确定了课题的研究方向: 样品采集→菌种筛选→酶挖掘与分析。江老师是极端环境微生物资源保育与开发领域的专家, 经常有陆地与海洋极端环境考察与采样的任务。经江老师推荐, 参加了其组织的新疆科学考察活动, 在新疆达坂城盐湖区域进行了土壤样品的采集。后续, 在实验室中, 对土壤样品中的产几丁质酶微生物进行分离筛选, 以及产酶菌中的几丁质酶进行了克隆表达与酶学性质研究。课题执行过程中问题时常出现, 尤其在分子生物学操作方面。记忆深刻的是, 首先遇到的问题为菌株基因组 DNA 提取不出。经过江老师的理论分析与实验指导, 才发现筛选获得的产几丁酶菌株为革兰氏阳性菌, 需要溶菌酶的预处理, 破除细胞壁之后, 才能被细菌基因组提取试剂提取而出。在重组蛋白的表达过程中, 遇到了蛋白总是在大肠杆菌破碎液沉淀之中大量存在, 难以获得可溶性表达。经江老师的分析与解释, 才知道重组大肠杆菌外源蛋白表达时, 其诱导培养条件十分关键, 诱导剂浓度和培养温度对于外源蛋白的可溶性表达至关重要, 过高的诱导剂和培养温度使得表达的蛋白来不及正确折叠, 从而形成包涵体。通过降低诱导剂浓度和培养温度, 最终成功实现了重组几丁质酶的可溶性表达。



最后，再一次感谢指导老师江凌教授对于课题设计、实验指导与论文撰写规范的帮助，以及感谢在课题研究及论文撰写过程中，从样品采集、实验实施，到数据获取、分析与处理，辛苦付出的自己。

2024 S.-T. Yau High School Science Award
 仅用于2024丘成桐中学科学奖公示