

# 新食品原料壳寡糖的酶法生产研究

游清徽<sup>1,3</sup>, 杨萍<sup>1,3</sup>, 徐贤柱<sup>1,3</sup>, 裘梁<sup>2,3</sup>, 董德刚<sup>2,3</sup>, 王曼莹<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 江西师范大学生命科学学院, 南昌 330022; 2. 江西中医药大学生物技术研发中心, 南昌 330006;  
3. 江西省食品与生物技术产学研合作示范基地, 南昌 330022)

**摘要:** **目的** 针对高分子原料壳聚糖在食品工业应用中的两大难题——清洁生产与安全食用, 研究了内切壳聚糖酶 EC.3.2.1.132 在新食品原料壳寡糖工业生产中的应用。**方法** 通过广泛筛查, 选育产酶活性高、性能稳定、具有单一内切模式的野生菌种。综合应用生物工程技术构建高效表达的基因重组工程菌, 经优化发酵条件、建立简易纯化方法, 获得了专一性内切壳聚糖酶。采用循环型清洁生产工艺用于新食品原料壳寡糖的工业化生产。**结果** 从产酶量 10 U/mL 左右的野生型曲霉菌株 Jxsd-01 获得成熟基因, 构建重组毕赤酵母工程菌表达体系, 内切壳聚糖酶蛋白产量达到 0.95 g/L。采用循环型清洁生产工艺酶法生产的壳寡糖含量高达 98%, 聚合度  $n=2\sim 10$ , 原料转化率 95% 以上, 生产过程中无废水、废渣产生。**结论** 内切壳聚糖酶应用于食品工业, 实现新食品原料壳寡糖的工业化酶法生产, 达到清洁、安全、高效的效果, 具有应用推广的价值。

**关键词:** 新食品原料; 壳寡糖; 壳聚糖酶; 清洁生产; 应用推广

## Enzymatic preparation of chitooligosaccharide, a new food raw material

YOU Qing-Hui<sup>1,3</sup>, YANG Ping<sup>1,3</sup>, XU Xian-Zhu<sup>1,3</sup>, QIU Liang<sup>2,3</sup>,  
DONG De-Gang<sup>2,3</sup>, WANG Man-Ying<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 2. Biotechnology research center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Food and Biotechnology Production-Education-Research Cooperation and Demonstration Base in Jiangxi Province, Nanchang 330022, China)

**ABSTRACT: Objective** To solve the problem of the applications of chitosan, which is a polymer, in food industry, we focused on two issues: the cleaner production process and the food security. The characters of endo-type chitosanase EC.3.2.1.132, and its applications were studied in the production of chitosan saccharide, a new food raw material. **Methods** Through the extensive screening, a strain with high enzyme activity and stable performance was got, then the endo-type chitosanase was purified. By various methods of biological engineering technology, we built a recombinant engineering yeast, which can efficiently express the aimed enzyme after the optimization of fermentation conditions, and then a simple and easy purification method was established, with a circular cleaner production process, and was applied to the industrial production of the chitosan saccharide, a new food raw material. **Results** The wild type *Aspergillus* strains Jxsd -01 could produce enzyme about 10 U/mL, and the recombinant of the gene in the engineering yeast could improve the expression system, the enzyme protein expression was 0.95 g/L. The content of the chitosan saccharide in enzymatic pro-

基金项目: 江西省科技支撑计划项目(20123BBF60171)

**Fund:** Supported by the Jiangxi Science and Technology Support Project (20123BBF60171)

\*通讯作者: 王曼莹, 教授, 主要研究方向为食品工业用酶制剂研究与应用。E-mail: wangmy8888@sina.com

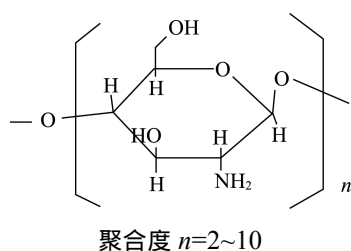
\*Corresponding author: WANG Man-Ying, Professor, College of Life Science, Jiangxi Normal University, No.99, Ziyang Road, Nanchang 330022, China. E-mail: wangmy8888@sina.com

duction was as high as 98%, with the polymers from 2 to 10. The conversion rate of raw material was more than 95%, without waste water or waste residue in the process of production. **Conclusion** The application of endo-type chitosanase in food industry can make the production process of the chitosan saccharide cleaner, safer and more efficient, so it has the value of wide application.

**KEY WORDS:** new food raw material; chitooligosaccharide; chitosanase; cleaner production process; application and popularization

## 1 引言

壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)是壳聚糖降解后的水溶性产物。结构式如下:



COS 由 2~10 个氨基葡萄糖单元以  $\beta$ -1, 4 糖苷键连结而成, 是迄今发现的唯一碱性寡糖。以脱乙酰度为 92% 以上的壳聚糖为原料生产的壳寡糖, 除极少数单元为乙酰氨基葡萄糖外, 均为氨基葡萄糖。COS 具有全面激活机体免疫机能的确切功能, 是国内外公认的一种理想食品添加剂, 我国于 2014 年 5 月 16 日已正式公告壳寡糖列入新食品原料<sup>[1]</sup>。而且, 我国农业部于 2013 年 12 月 30 日就已公告, 壳寡糖与低聚壳聚糖列入饲料添加剂品种目录<sup>[2]</sup>。

实现新食品原料壳寡糖的清洁、安全、高效、工业化生产, 应用酶学理论与酶学技术是必然趋势<sup>[3]</sup>。生物催化剂——酶蛋白可以在温和条件下有效地加速相应的化学反应, 清洁、安全、高效<sup>[4]</sup>。由于酶蛋白分子的活性中心具有特定的空间构象, 因此, 不同的酶蛋白对底物具有一定的选择性, 即酶促反应的特异性。实践证明, 高效降解高分子壳聚糖的酶蛋白必须具有特异性水解氨基葡萄糖单元间的  $\beta$ -1, 4 糖苷键的能力, 这就是国际酶学委员会确认并系统命名为 EC.3.2.1.132 的壳聚糖酶(chitosanase, CSN), 其化学名为  $\beta$ -1, 4 氨基葡萄糖苷酶<sup>[5]</sup>。尽管有报道称非专一性酶也可表现出某种程度的壳聚糖水解作用<sup>[6]</sup>, 但真正将其应用于新食品原料壳寡糖的工业化生产还存在种种困难, 难于实现。

长期以来, 国内外同行专家全力寻找高产壳聚糖酶的菌种, 研制高活性的生产用壳聚糖酶<sup>[7-11]</sup>。江西省食品与生物技术产学研合作示范基地长期致力于研制专一性壳聚糖内切酶。在获得高产壳聚糖酶野生菌株 Jxsd-01 的基础上, 综合应用生物工程技术构建了高效表达的基因重组工程菌。经优化发酵条件与纯化方法, 获得了专一性内切壳聚糖酶。采用循环型清洁生产工艺用于新食品原料壳寡糖的工业化生产, 获得清洁、安全、高效的效果, 具有应用推广的价值<sup>[12-15]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

表达载体 pPIC9K 来源于巴斯德毕赤酵母菌, 购自美国 Invitrogen 公司; Biofugestratos 高速冷冻离心机(美国科峻公司); TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭); UV-1800 型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); UPV-8000 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司); PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ 公司); HT-1300-U 型超净工作台(苏州安泰); ZD-85 型摇床(上海智城)等。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 产酶菌种筛选

在自然界中, 进行产壳聚糖酶菌种的高通量广泛筛选, 策略如下:

样品(土壤、植物等)处理——菌株初筛(菌株富集、选择性筛选)——菌株复筛(摇瓶发酵、制备粗酶液、测定酶活)——菌种鉴定——菌种保藏。

经预试验, 集中对相关土壤样品进行筛选工作。从江西各地采集土样 29 份, 包括湖泊淤泥、水产市场等地的土壤。

#### 2.2.2 毕赤酵母工程菌构建

在保持野生菌所产壳聚糖酶的稳定性与内切作用模式的前提下, 对成熟基因序列进行定点突变, 修

改壳聚糖酶基因的密码子, 通过拼接 PCR 技术扩增壳聚糖酶基因, 构建 pPIC9K-CSN 表达载体, 获得高产壳聚糖酶的毕赤酵母工程菌, 构建毕赤酵母工程菌策略如图 1。

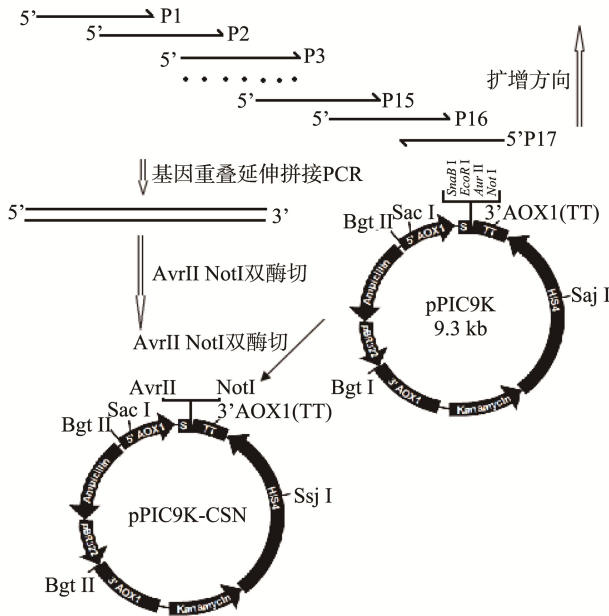


图 1 CSN 基因扩增和重组体构建示意图

Fig. 1 Amplification of CSN gene and construction of recombinant

### 2.2.3 工程菌发酵与壳聚糖酶纯化

已构建的毕赤酵母 GS115 工程菌采用甲醇诱导的培养系统进行高密发酵, 培养系统为: 酵母提取物、蛋白胨、 $K_3PO_4$ 、生物素、甲醇。采用一步亲和层析法从发酵液中纯化目的蛋白壳聚糖酶。

### 2.2.4 壳聚糖酶的特性分析与活力测定

采用基因测序法测定目的基因序列并与 Gene Bank 报道的 mature CSN 序列进行比对、确认; 采用氨基酸测序法测定壳聚糖酶的氨基酸组成与末端序列; 采用生化技术测定壳聚糖酶的等电点、最适温度、最适 pH 等酶学性质; 采用电泳法检测酶蛋白的纯度; 采用 DNS 法测定壳聚糖酶的活力大小。酶活力单位(U)定义: 在规定的最佳酶促反应条件下, 1 个酶活力单位(U)为 1 分钟内生成相当于  $1 \mu\text{mol}$  还原糖的酶量。

### 2.2.5 建立酶法降解壳聚糖工艺与壳寡糖产品质量分析

按照壳聚糖酶学性质与生态产业的标准, 建立

科学的循环型清洁生产壳寡糖工艺路线。建立新食品原料壳寡糖产品的质量控制标准。

## 3 结果

### 3.1 高产壳聚糖酶菌株

#### 3.1.1 高产壳聚糖酶的野生菌株筛选

本产学研合作示范基地从江西各地采集的 29 份土样(包括湖泊淤泥、水产市场等地的土壤)筛选获得一株高产壳聚糖酶的野生菌株 Jxsd-01, 经中科院微生物研究所鉴定为烟曲霉菌, 如图 2。

#### 3.1.2 壳聚糖酶分子组成

采用层析纯化工艺, 获得电泳纯壳聚糖酶冻干产品如图 3, 可安全地用于食品级壳寡糖或壳低聚体的工业化生产。

委托福州大学生物工程研究所, 采用美国 PE 公司 476A 型蛋白质/多肽 N 末端测序仪对内切壳聚糖酶的 N-端氨基酸序列进行测定, 结果为 YNLPNNLKQ。

#### 3.1.3 壳聚糖酶学性质

采用常规生化技术测定壳聚糖酶分子量 25 KDa,  $pI = 7.2$ , 最适温度  $60^\circ\text{C}$ , 最适 pH 6.0。

### 3.2 构建毕赤酵母 GS115 工程菌

以产酶野生菌 Jxsd-01 的总 RNA 为模板, 以上海生工合成的以下 T3、T4 为引物:

T3: 5'-CTAGCCTAGGTATAATTTGCCCAACAACTTGAAACAG-3'

T4: 5'-GGCCGCGGCCGCGTTCTAGTTCGCTATGCTTTCAA-3'

通过 RT-PCR 反转录得到目的基因如图 4。

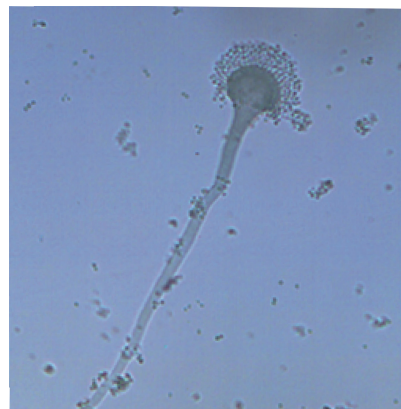


图 2 烟曲霉菌(Jxsd-01)

Fig. 2 *Aspergillus fumigatus*(Jxsd-01)

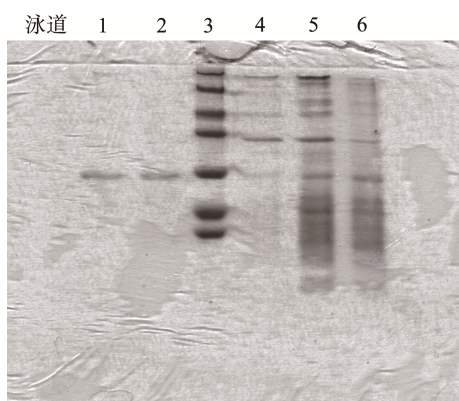


图 3 壳聚糖酶蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of chitosanase protein

- 1、2. 纯化后的壳聚糖酶蛋白带
  3. 蛋白标准品(KDa): 116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4
  4. 层析纯化去除的部分杂蛋白带
  - 5、6. 层析前的总蛋白带
- 1、2. Electrophoresis strip for the purified enzyme protein  
 3. Marker(KDa): 116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4  
 4. Electrophoresis strip for the dislodged mixed protein after chromatography  
 5、6. Electrophoresis strip for the general protein before chromatography

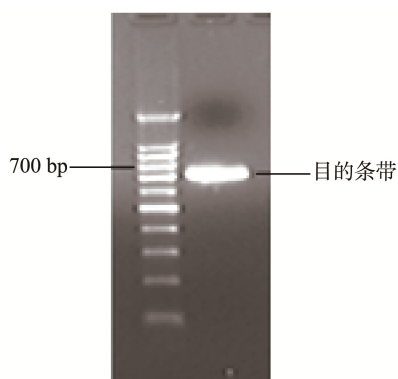


图 4 成熟 Csn 基因电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of mature Csn gene

壳聚糖酶目的基因经相应的限制性内切酶酶切、回收, 分别克隆到 pPIC9K, 转化到克隆菌 DH5 $\alpha$  中, 经测序证明结 RT-PCR 反转录获得的基因序列与 Gene Bank 报道的 mature CSN 基因相一致。构建 pPIC9K-CSN 重组载体, 通过电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 获得表达分泌型壳聚糖酶的毕赤酵母菌。经摇瓶中诱导表达, 上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 出现 25 kDa 蛋白条带。

### 3.3 组工程菌经诱导发酵产生壳聚糖酶

经发酵条件优化后, 工程菌株产酶量明显提

高, 达到 0.95 g/L 以上, 酶蛋白的比活达到 50 U/mg 以上。

### 3.4 批量生产的重组工程菌壳聚糖酶应用于壳寡糖的生产

采用重组工程菌生产的壳聚糖酶降解脱乙酰度达 92% 以上的壳聚糖, 水解产物壳寡糖产品的 TLC 层析结果理想如图 5, 自左至右, 第一道为酶解产物, 没有单糖证明酶作用模式为内切。原点无大分子壳聚糖存在证明水解完全, 原料转化率高。酶解产物为小于 10 的寡糖混合物, 分散度很低。第二道为氨基葡萄糖单糖标准对照品。第三道为没有加壳聚糖酶的壳聚糖原料, 原点不动。

测定专一性壳聚糖酶法清洁生产的壳寡糖含量达 98% 以上, 原料转化率高达 95%。

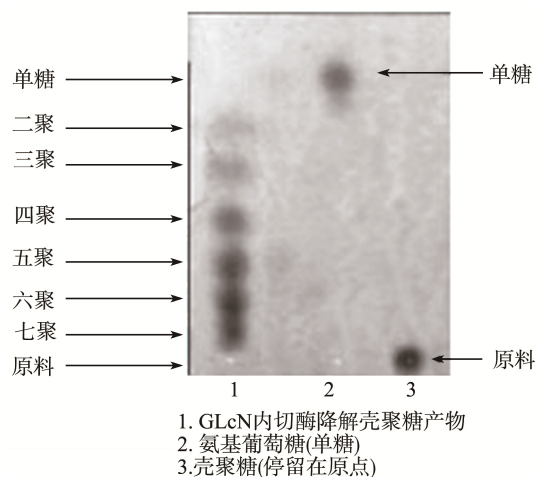


图 5 酶法生产的新食品原料壳寡糖 TLC 图谱

Fig. 5 TLC of chitoooligosaccharide, a new food raw material by enzymatic preparation

## 4 讨论

壳聚糖酶 EC.3.2.1.132 专一性降解壳聚糖高分子原料, 是生产新食品原料壳寡糖的理想生物催化剂。壳聚糖酶的活性与壳聚糖的脱乙酰度相关, 脱乙酰度越高酶活越大。如果  $\beta$ -1, 4 糖苷键一侧为乙酰氨基葡萄糖, 则催化活力明显减弱, 证明壳聚糖酶的专一性。因此, 本研究采用脱乙酰度达 92% 以上的壳聚糖作为生产食品级壳寡糖的原料。经壳聚糖酶降解获得的壳寡糖产品, 薄层层析图谱显示没有单糖存在, 证明壳聚糖酶的内切性。壳聚糖酶用于壳寡糖的生产,

优势非常显著: 第一, 反应条件温和, 常压、45 ℃、pH 6.0, 产物不发生衍生反应, 确保食用安全; 第二, 生物转化效率极高, 生产成本低, 产生明显经济效益; 第三, 生产过程中无废水、废渣产生, 清洁环保。因此, 本研究建立的循环型专一性壳聚糖酶法生产新食品原料壳寡糖新工艺, 科学、先进、可行。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准壳寡糖等6种新食品原料的公告(2014年第6号)[EB/OL].(2014-05-15) <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201405/367ce408981e4807809e107417b3d361.shtml>. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. The Announcement of approving of six new food raw materials including chitooligosaccharide (No. 6th of 2014) [EB/OL].(2014-05-15) <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201405/367ce408981e4807809e107417b3d361.shtml>.
- [2] 中华人民共和国农业部. 第2045号公告[EB/OL]. (2013-12-30) [http://www.moa.gov.cn/govpublic/XMYS/201401/t20140103\\_3730193.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/XMYS/201401/t20140103_3730193.htm). The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The No.2045th Announcement of 2013, [EB/OL]. (2013-12-30) [http://www.moa.gov.cn/govpublic/XMYS/201401/t20140103\\_3730193.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/XMYS/201401/t20140103_3730193.htm).
- [3] 王曼莹, 杨振国. 生物技术在壳寡糖 COS 功能糖清洁生产中的应用[R]. 摩尔曼斯克: 全俄罗斯几丁质学术研讨会大会报告, 2012. Wang MY, Yang ZG. The application of biotechnology in a functional sugar, chitosan oligosaccharide(COS) [R]. Murmansk: National conference of chitin across Russia, 2012.
- [4] 王曼莹, 蔡险峰. 甲壳素生物催化研究与清洁生产工艺[R]. 青岛: 第二届国际几丁质/壳聚糖学术研讨会大会报告, 2010. Wang MY, Cai XF. The research of biological catalysis of chitin and the cleaner production process, [R]. Qingdao: the 2nd international conference on chitin/chitosan conference, 2010.
- [5] 刘萍, 刘靖, 祁兴普, 等. 绿色木霉产内切壳聚糖酶的鉴定及酶学性质的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 12: 254-257, 283. Liu P, Liu J, Qi XP, *et al.* Purification and properties of endo-chitosanase secreted by *Trichoderma viride* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 12: 254-257, 283.
- [6] 张文清, 夏玮, 徐欢, 等. 非专一性酶催化壳聚糖水解脱反应的特性[J]. 功能高分子学报, 2003, 1: 44-48. Zhang WQ, Xia W, Xu H, *et al.* Reaction characteristics of chitosan hydrolysis catalyzed by non-specific enzymes[J]. *J Functional Polymers*, 2003, 1: 44-48.
- [7] Chih Yu C, Yaw Kuen L. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, (32): 197-203.
- [8] Yoxhinori M, Yoichiro I, Takeshi S, *et al.* *In Vitro* suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitosanase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitosanase gene *csnSM1* [J]. *J Gen Plant Pathol*, 2001, (67): 318-324.
- [9] Tae Kyoung E, Kang Man L. Characteristics of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KB-1 [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(12): 1036-1041.
- [10] Zhang XY, Dai AL, Kuroiwa K, *et al.* Cloning and characterization of a chitosanase gene from the koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, (65): 977-981.
- [11] Takashi K, Hiroshi I, Hiroshi N, *et al.* Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor [J]. *Process Biochem*, 2009, (44): 283-287.
- [12] 游清徽, 王曼莹. 壳聚糖酶的研制及酶法生产壳寡糖[D]. 南昌: 江西师范大学, 2006. You QH, Wang MY. Research and development on a chitosanase and preparation of chitooligosaccharides by enzymatic hydrolysis [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2006.
- [13] 杨萍, 王曼莹. 烟曲霉壳聚糖酶基因的克隆与毕赤酵母表达[D]. 南昌: 江西师范大学, 2007. Yang P, Wang MY. *Aspergillus fumigatus* chitosanase gene cloning and *Pichia pastoris* expression [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2007.
- [14] 阳丽, 杨萍, 王曼莹. 烟曲霉壳聚糖酶在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国酿造, 2010, (10): 12-16. Yang L, Yang P, Wang MY. Secretory expression of chitosanase gene from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* [J]. *China Brewing*, 2010, (10): 12-16.
- [15] 袁梁, 杨萍, 游清徽, 等. 密码子优化烟曲霉壳聚糖内切酶基因在毕赤酵母中的高效表达[J]. 安徽农业科学, 2012, (26): 12769-12771. Qiu L, Yang P, You QH, *et al.* High-level expression of codon-optimized chitosanase gene from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2012, (26): 12769-12771.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



游清徽, 博士, 讲师, 主要研究方向为天然资源开发利用研究。  
E-mail: qinghuiyou@163.com

王曼莹, 教授, 主要研究方向为食品工业用酶制剂研究与应用。  
E-mail: wangmy8888@sina.com