

◆ 生物科学 ◆

耐热微泡菌 *Microbulbifer thermotolerans* YLW106 几丁质酶的基因克隆表达及酶学性质分析*

欧阳玉滢¹, 林梅², 王巧贞², 卢波², 吕心悦³, 黄俊², 周蓉², 梁士颀², 覃秋容², 王青艳², 黄庶识², 廖思明^{1,2,*}

(1. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530005; 2. 广西科学院生物科学与技术研究所, 非粮生物质能技术全国重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 3. 南宁学院食品与质量工程学院, 广西南宁 541699)

摘要:为促进几丁质废弃物的高值化利用,本研究从耐热微泡菌 *Microbulbifer thermotolerans* YLW106 菌株中克隆、表达几丁质酶基因,并探究重组酶的酶学性质。实验结果表明,成功克隆了几丁质酶基因 *Chi2375*,并在大肠杆菌中诱导表达重组酶 *Chi2375*。以胶体几丁质为底物,重组酶 *Chi2375* 的最适反应温度为 55 °C,在 50、55 °C 的半衰期($t_{1/2}$)分别为 60 和 2 h;最适 pH 值为 8.0,在 pH 值为 3.5—12.0 条件下,4 °C 保温 24 h 后重组酶 *Chi2375* 的相对酶活力保持在 85% 以上,酶活力较为稳定;5 mmol · L⁻¹ 的 Cu²⁺、1% 的 Triton X-100 和 1% 的 DTT 对重组酶 *Chi2375* 具有促进作用,相对酶活力分别约为 140%、130% 和 180%;最适底物为 β-几丁质,以胶体几丁质为底物,重组酶 *Chi2375* 的 V_{max} 和 K_m 分别为 (7.49 ± 0.25) U · mg⁻¹、(33.75 ± 1.24) mg · mL⁻¹;重组酶 *Chi2375* 与胶体几丁质反应的产物为纯度 90% 以上的几丁二糖,在医药和食品领域具有潜在的应用前景。

关键词:耐热微泡菌;几丁质酶;克隆表达;纯化;酶学性质

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2024)04-0731-11

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20240416.001

几丁质又名甲壳质、甲壳素、甲壳胺等,是由 *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺通过 β-1,4 糖苷键连接而成的线性糖类多聚物,是自然界中含量仅次于纤维素的第二大天然有机化合物,是甲壳类动物外壳、昆虫和节肢动物的外骨骼、真菌和藻类细胞壁的组成部分^[1-3]。据

统计,几丁质全球每年的产量为 1 × 10¹⁰ — 1 × 10¹¹ t^[4,5]。由于难溶于水、稀酸、碱等溶液中,每年加工虾蟹等甲壳类动物产生的大量几丁质难以得到有效开发利用,造成严重的资源浪费及环境危害。然而,几丁质的降解产物 *N*-乙酰-*D*-氨基寡糖具有良好的水

收稿日期:2024-02-27

修回日期:2024-03-24

* 国家自然科学基金项目(32060216),中央引导地方科技发展资金项目(桂科 ZY23055011),广西科学院科研发展基金项目(2021YFJ1204),广西科技重大专项(桂科 AA22096023)和广西重大科技创新基地建设项目子课题(2022-36-Z06-01)资助。

【第一作者简介】

欧阳玉滢(1998—),女,在读硕士研究生,主要从事分子酶学研究。

【通信作者简介】**

廖思明(1969—),女,研究员,主要从事微生物和分子酶学研究,E-mail:18978916636@qq.com。

【引用本文】

欧阳玉滢,林梅,王巧贞,等. 耐热微泡菌 *Microbulbifer thermotolerans* YLW106 几丁质酶的基因克隆表达及酶学性质分析[J]. 广西科学,2024,31(4):731-741.

OUYANG Y Y, LIN M, WANG Q Z, et al. Gene Cloning, Expression and Characterization of Chitinase from *Microbulbifer thermotolerans* YLW106 [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(4): 731-741.

溶性与生物相容性,以及抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降低胆固醇、促进伤口愈合、促进生长以及增强免疫力等多种生物活性,在生物医药、食品、农业和环保等领域具有较好的应用价值^[3]。

几丁质酶是专一催化分解几丁质生成几丁寡糖和单糖的一类糖苷水解酶^[6],广泛分布于各种生物体中,如细菌、真菌、植物、动物以及人类等^[4,7]。根据作用方式,几丁质酶可分为内切几丁质酶和外切几丁质酶^[8]。内切几丁质酶在几丁质内部随机切割 β -1,4糖苷键,生成N-乙酰-D-氨基葡萄糖寡聚体或几丁质二糖,主要来源于糖苷水解酶18(GH18)家族和糖苷水解酶19(GH19)家族;外切几丁质酶从非还原几丁质末端切割几丁二糖单位,生成几丁二糖或N-乙酰氨基葡萄糖单体,主要来源于GH18和糖苷水解酶20(GH20)家族^[9-12]。

根据氨基酸序列相似性,在碳水化合物活性酶数据库(<http://www.cazy.org/>)中,几丁质酶主要属于GH18和GH19家族。细菌来源的几丁质酶大部分属于GH18家族^[13]。GH18家族几丁质酶的催化结构为经典的 $(\beta/\alpha)_8$ TIM桶状结构,包括8个平行 β -折叠和外侧围绕的8个 α -螺旋。除催化结构(CD)外,GH18家族几丁质酶通常还包含其他多个结构域,例如独立的碳水化合物结合模块(CBM)、富含丝氨酸/苏氨酸的连接区以及基质辅助结合模块(例如第三型纤维连接蛋白FN-III)^[14]。根据催化结构域的序列和结构特征,细菌GH18家族几丁质酶又可分为A、B和C3个亚家族^[15]。A亚家族存在几丁质插入结构域(CID),即在原有的 $(\beta/\alpha)_8$ 结构域中插入 $(\alpha+\beta)$ 结构域,增加了底物结合口袋的深度,有助于促进酶与长链底物的结合以及提升酶沿着几丁质长链移动的持续性,多为外切几丁质酶^[16];B亚家族在loop6上存在发夹结构,多为内切几丁质酶;C亚家族则不存在插入结构,且loop7区域较长^[15,17]。到目前为止,已从细菌中分离出数百种几丁质酶。然而,由于大多数的几丁质酶为中温或中性酶,不能满足恶劣工业环境的多样化需求,因此,性能更好的新型几丁质酶在几丁质的工业生产中将具有较大的应用前景。与陆地细菌来源的几丁质酶相比,海洋细菌来源的几丁质酶往往具有较高的盐度耐受性、pH值稳定性和热稳定性,以及较多样的结构特征和功能等,是几丁质产业化利用的主要酶制剂^[18]。

微泡菌(*Microbulbifer*)为革兰氏阴性菌,1997年首次被命名,目前有30个成员(www.bacterio.net/),广泛分布于海洋或盐碱环境中,包括深海沉积物、潮间带滩涂、红树林沉积物以及海洋藻类等^[19]。本课题组前期从文昌青澜半岛逸龙湾海滩马尾藻样品中筛选到一株具有较强几丁质降解能力的耐热微泡菌 *M. thermotolerans* YLW106(菌种保藏号:CGMCC 27855),本研究将对来自该菌株的几丁质酶 Chi2375 进行基因克隆、表达和初步的酶学性质分析,拟为几丁质废弃物高值化利用提供基础研究数据。

net/genus/*Microbulbifer*),广泛分布于海洋或盐碱环境中,包括深海沉积物、潮间带滩涂、红树林沉积物以及海洋藻类等^[19]。本课题组前期从文昌青澜半岛逸龙湾海滩马尾藻样品中筛选到一株具有较强几丁质降解能力的耐热微泡菌 *M. thermotolerans* YLW106(菌种保藏号:CGMCC 27855),本研究将对来自该菌株的几丁质酶 Chi2375 进行基因克隆、表达和初步的酶学性质分析,拟为几丁质废弃物高值化利用提供基础研究数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

耐热微泡菌 *M. thermotolerans* YLW106、表达载体 pET30a、感受态细胞 *Escherichia. coli* DH5 α 、*Escherichia. coli* BL21(DE3)等均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

PrimerSTART Maxmix、In-Fusion 试剂盒、限制性内切酶 *Nde* I、*Not* I 等购自 Takara(宝)生物有限公司;胶回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、质粒 DNA 快速小提试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司;蛋白纯化用 Ni-Fast 填料购自 Qiagen 公司,阴离子柱(Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance)和分子筛(Superdex 75 Increase 10/300 GL、Sperdex Peptide 10/30 GL)购自 Cytiva 公司,引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,所使用的所有其他化学品和试剂均为分析级试剂。梯度 PCR 仪 TProfessional Thermocycler 购自德国 Biometra 公司,凝胶成像仪 Gel DocTM XR+ 购自美国 Bio-Rad 公司,蛋白层析仪 AKTA purifier 购自美国 GE 公司,高效液相色谱仪(HPLC)Ultimate 3000 购自美国 DIONEX 公司。

1.2 方法

1.2.1 胶体几丁质的制备

参考文献[20]方法制备胶体几丁质。将5g粉状几丁质加入100mL浓盐酸,缓慢搅拌至无颗粒黏稠液体状态,密封然后将其置于4℃冷藏24h。然后向经浓盐酸处理的液体中加入超纯水,离心后弃上清液,多次超纯水离心洗涤至pH值为中性,取出冻干为粉末状,过150目筛备用。

1.2.2 几丁质酶基因的克隆

从耐热微泡菌 *M. thermotolerans* YLW106 的基因测序结果中筛选出含有完整序列的几丁质酶基因

Chi2375。根据 *Chi2375* 的基因序列,利用 Takara 网站 (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools>),设计含

表 1 用于扩增几丁质酶基因的引物

Table 1 Primer sequences used to amplify the chitinase gene

无缝克隆引物 Infusion cloning primers	引物顺序 5' 到 3' Primer sequence 5' to 3'
<i>Chi2375</i> -F	AAGGAGATATACATATGGTGGACTGCAGAAGTCTGCC
<i>Chi2375</i> -R	TGCTCGAGTGC GGCCGCGGGCAGATTGTGTACATGGCTGC

PCR 程序:98 °C 3 min;98 °C 15 s,65 °C 15 s,72 °C 20 s,36 个循环;72 °C 10 min。将 PCR 扩增得到的 DNA 片段进行胶回收纯化,与经 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切处理后纯化的 pET30a 质粒,在 In-Fusion 连接酶作用下进行连接,然后将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,提取质粒送深圳华大基因科技有限公司测序。将构建成功的重组质粒命名为 pET30a-*Chi2375*。

1.2.3 序列分析和结构预测

采用 NCBI 的 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行氨基酸序列分析,采用 SignalP 6.0 工具 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 进行信号肽序列分析,采用 CLUSTALW 程序 (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 和 ESPript3 程序 (<https://espript.ibcp.fr/ESPrript/cgi-bin/ESPrript.cgi>) 进行氨基酸多序列比对,采用 NCBI 的 CD-search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 进行保守域的分析,使用 InterProScan 工具 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) 进行结构域分析,采用 ExPASy 的 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行理论分子量和等电点的预测,采用 MEGA 7.0 软件对序列进行进化树构建。采用 AlphaFold2 模型生成序列的三维 (3D) 结构模型,采用 PyMOL 程序 (Schrodinger LLC, Cambridge, MA, USA) 对 3D 图形进行分析。

1.2.4 重组几丁质酶基因在大肠杆菌的诱导表达及纯化

将测序正确的重组质粒转入 *E. coli* BLR(DE3) 感受态细胞中,于 37 °C、220 r·min⁻¹ 条件下培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.4—0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG),在 16 °C、150 r·min⁻¹ 条件下诱导 24 h,离心收集菌体。超声波破胞后用镍亲和层析 (Ni-Fast)、阴离

子柱 (Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance) 及分子筛 (Superdex 75 Increase 10/300 GL) 纯化重组酶 *Chi2375*,并对纯化后的重组酶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

子柱 (Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance) 及分子筛 (Superdex 75 Increase 10/300 GL) 纯化重组酶 *Chi2375*,并对纯化后的重组酶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.2.5 重组酶的酶学性质分析

重组酶的酶活力测定:采用二硝基水杨酸 (DNS) 法测定还原糖含量,计算几丁质酶活力^[21]。反应混合液体积为 300 μ L,由 10 μ L 适当稀释的酶液,以及 290 μ L 含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值为 8.0) 缓冲液的 1% (W/V) 胶体几丁质组成。反应混合物在 55 °C 下反应 30 min 后,加入 300 μ L DNS 溶液终止反应,沸水浴 10 min 进行显色反应,冰浴冷却 10 min 后,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,在 540 nm 处测定上清液的吸光值。以沸水浴 10 min 后的灭活酶液作为空白对照,每组实验设置 3 组平行及 1 组空白对照,取平均值,根据 *N*-乙酰 *D*-氨基葡萄糖标准曲线计算酶活力。酶活力单位 (U) 定义:标准测定条件下,每分钟水解胶体几丁质释放 1 μ mol *N*-乙酰 *D*-氨基葡萄糖所需的酶量。

(1) pH 值对重组酶的影响

取稀释的酶液,以 1% (W/V) 的胶体几丁质为底物,在 37 °C 条件下,测定 50 mmol·L⁻¹ 不同 pH 值的缓冲液 (醋酸-醋酸钠缓冲液:pH 值为 4.0—6.0;磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液:pH 值为 6.0—8.0;Tris-HCl 缓冲液:pH 值为 8.0—9.0;甘氨酸-NaOH 缓冲液:pH 值为 9.0—10.0) 对重组酶酶活力的影响,得到重组酶的最适 pH 值。将重组酶保存在不同 pH 值的缓冲液中 (甘氨酸-盐酸:pH 值为 2.5—3.5;醋酸-醋酸钠缓冲液:pH 值为 3.5—6.0;磷酸盐缓冲液:pH 值为 6.0—8.0;Tris-HCl 缓冲液:pH 值为 8.0—9.0;甘氨酸-NaOH 缓冲液:pH 值为 8.5—12.0),于 4 °C 冰箱放置 24 h;然后,根据酶活力测定方法,将经不同 pH 值缓冲液处理过的酶液加入反应体系中,测定重组酶的 pH 稳定性。每组 3 个平行,

计算不同 pH 值下重组酶的酶活力。

(2) 温度对重组酶的影响

在最适 pH 值条件下, 测定不同反应温度 (35—70 °C, 间隔 5 °C) 对重组酶酶活力的影响, 以测得的最高酶活力为 100%, 计算不同温度下的相对酶活力, 确定最适反应温度。将重组酶置于不同温度 (35—65 °C, 间隔 5 °C) 孵育 30 min, 然后在最适反应条件下测定重组酶残余酶活力, 以未处理酶液的酶活力为 100%, 计算重组酶在各温度下保温 30 min 的残余酶活力, 分析重组酶的热稳定性。将重组酶分别放置在 50 和 55 °C 下, 测定随时间变化重组酶的酶活力, 分析重组酶的半衰期 $t_{1/2}$ 值; 在梯度 PCR 仪上, 取稀释的重组酶在一系列温度 (48、50、52、54、56、58 和 60 °C) 上热激 30 min, 然后在最适反应温度和 pH 值条件下测定残余酶活力, 分析重组酶的热半失活温度 T_{50}^{30} 值; 以未经温度处理的重组酶的酶活力为 100%, 每组 3 个平行, 计算不同温度条件下重组酶的酶活力。

(3) 底物特异性、 K_m 和 V_{max} 的测定

分别以 1% (W/V) 的胶体几丁质、虾壳细粉几丁质、 α -几丁质、 β -几丁质、壳聚糖、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为底物, 在最适条件下测定重组酶酶活力。

在最适 pH 值和最适温度条件下, 测定以不同浓度 (10—70 mg · mL⁻¹) 胶体几丁质为底物时重组酶的酶活力, 使用软件 Origin 绘制 1/V-1/[S] 双倒数曲线, 得出重组酶的 K_m 、 V_{max} 。

(4) 金属离子和化学试剂对重组酶的影响

取经过稀释的重组酶与终浓度分别为 1 和 5 mmol · L⁻¹ 的金属离子 (Na⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺) , 以及终浓度分别为 0.5% 和 1.0% 的有机试剂 [Triton X-100、乙醇、异丙醇、二甲基亚砜 (DMSO)、吐温-20、吐温-80、乙二胺四乙酸 (EDTA)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、二硫苏糖醇 (DTT)] 混匀后在 4 °C 孵育 24 h, 在最适条件下测定它们对重组酶酶活力的影响。以不添加影响因子的酶活力为 100%, 计算各种试剂作用下重组酶的残余酶活力。

(5) 盐离子浓度对重组酶的影响

取经过稀释的重组酶与终浓度为 0.5—3.5 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液混匀后在 4 °C 孵育 24 h, 在最适反应条件下测定它们对重组酶酶活力的影响。以不添加 NaCl 溶液的酶活力为 100%, 计算不同浓

度 NaCl 溶液作用下重组酶的残余酶活力。

(6) 水解产物分析

以几丁单糖、几丁二糖、几丁三糖、几丁四糖为标样, 测定重组酶的水解产物。在 290 μ L 含 0.5% (W/V) 胶体几丁质的体系中, 加入浓度为 2 mg · mL⁻¹ 的重组酶 10 μ L, 于 50 °C 反应 0.5、2.0、4.0、8.0、24.0、48.0、72.0 h, 沸水浴 10 min 终止反应, 室温冷却, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液。采用高效液相色谱仪和分子排阻色谱法 (SEC) 检测重组酶 Chi2375 降解胶体几丁质生成的产物, 使用示差折光检测器, 分离柱为分子筛 Spherdex Peptide 10/30 GL (Cytiva, USA); 流动相为超纯水, 流速为 0.3 mL · min⁻¹; 柱温为常温。

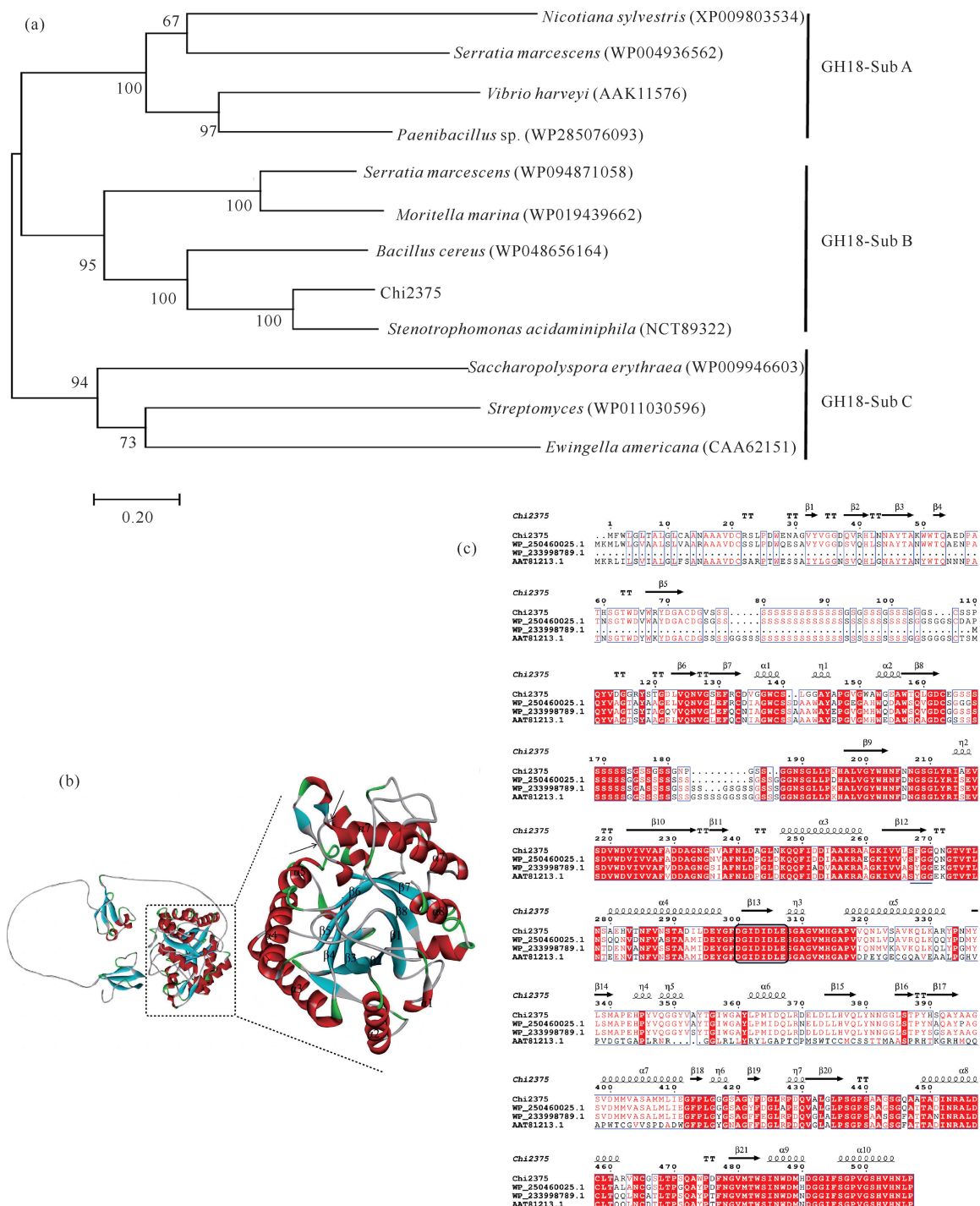
2 结果与分析

2.1 几丁质酶生物信息学分析

根据耐热微泡菌 *M. thermotolerans* YLW106 的基因组序列分析, 获得几丁质酶的基因序列 Chi2375 (NCBI 登录号: OR979724)。该基因序列与 *M. thermotolerans* HB226069 菌株的几丁质酶基因 (NCBI 登录号: CP130317)、*M. thermotolerans* DAU221 菌株的几丁质酶基因 (NCBI 登录号: CP014864) 以及 *Microbulbifer* sp. YPW1 菌株的几丁质酶基因 (NCBI 登录号: CP055157) 的序列一致性分别为 99.54%、99.41% 和 78.86%。Chi2375 的氨基酸序列与来源于 *Microbulbifer* sp. GX H0434 的几丁质酶 (NCBI 登录号: WP_250460025)、*M. hydrolyticus* 的几丁质酶 (NCBI 登录号: AAT81213.1) 以及 *M. pacificus* 的几丁质酶 (NCBI 登录号: WP_233998789.1) 的一致性分别为 80.93%、60.41% 和 77.89%。使用 ProtParam 工具分析, Chi2375 基因全长 1 521 bp, 编码 507 个氨基酸, 理论分子量为 53.79 kD, 等电点为 4.732。使用 SignalIP 6.0 工具分析信号肽序列, 显示 Chi2375 的第 18 和 19 位氨基酸残基为信号肽酶切割位点。使用 InterProScan 工具分析, Chi2375 含有 1 个 Glyco_18 结构域 (位于 196—507 位氨基酸残基)、2 个碳水化合物结合结构域 (CBM, 分别位于第 19—74 位氨基酸残基, 第 109—156 位氨基酸残基), 以及连接不同结构域之间的、由多个丝氨酸 (Ser) 残基组成的长链。通过 BLAST 程序分析, 采用 CLUSTAW 程序和 MEGA 7.0 软件对 Chi2375 进行序列比对和进化树构建 [图 1(a)], Chi2375 属于 GH18 家族的 B 亚家族。利用

AlphaFold2 模型构建 Chi2375 的三维结构, 显示 Chi2375 的催化结构域为典型的 $(\beta/\alpha)_8$ TIM 结构, 在 $\beta 6$ 与 $\alpha 6$ 之间具有 1 个由 2 个 β 折叠和 1 个 α 螺旋组成的插入结构域, 呈现 GH18 家族 B 亚家族的结

构特征[图 1(b)]. 保守域分析发现, Chi2375 具有 GH18 家族几丁质酶中保守的几丁质结合序列 SXGG 和催化序列 DXXDXDXE[图 1(c)].



(a) Molecular phylogenetic tree of chitinase Chi2375; (b) Protein structure of Chi2375; red indicates α -helix, blue indicates β -fold; (c) Alignment of putative chitinase sequences from *Microbulbifer* sp. GX H0434 (WP_250460025), *M. hydrolyticus* (AAT81213.1), *M. pacificus* (WP_233998789.1) and Chi2375

图 1 几丁质酶生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of chitinase

2.2 重组酶的诱导表达与纯化

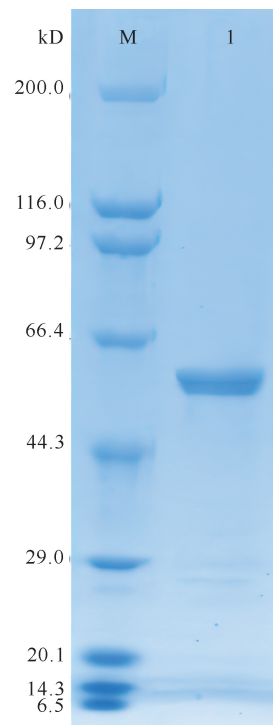
将目的基因与表达载体连接构建 pET30a-*Chi2375* 重组表达质粒, 并导入大肠杆菌表达, 经镍柱纯化后, SDS-PAGE 电泳结果表明, 重组蛋白为单一条带, 分子量大小约 53 kDa, 与理论分子量一致, 可以满足下一步酶学性质的研究分析(图 2)。

2.3 重组酶的酶学性质分析

2.3.1 pH 值和温度对重组酶 *Chi2375* 酶活力的影响

如图 3(a)所示, 重组酶 *Chi2375* 的最适 pH 值为 8.0; 在 pH 值为 6.5-9.0 时, 相对酶活力保持在 80% 以上; 当 pH 值小于 6.0 或大于 9.0 时, 相对酶活力下降至 40% 以下, 表明重组酶 *Chi2375* 是一种偏碱性的酶。在 pH 值为 3.5-12.0 条件下, 4 °C 保温 24 h 后重组酶 *Chi2375* 的相对酶活力保持在 85% 以上, 表明重组酶 *Chi2375* 具有极高的 pH 耐受性。

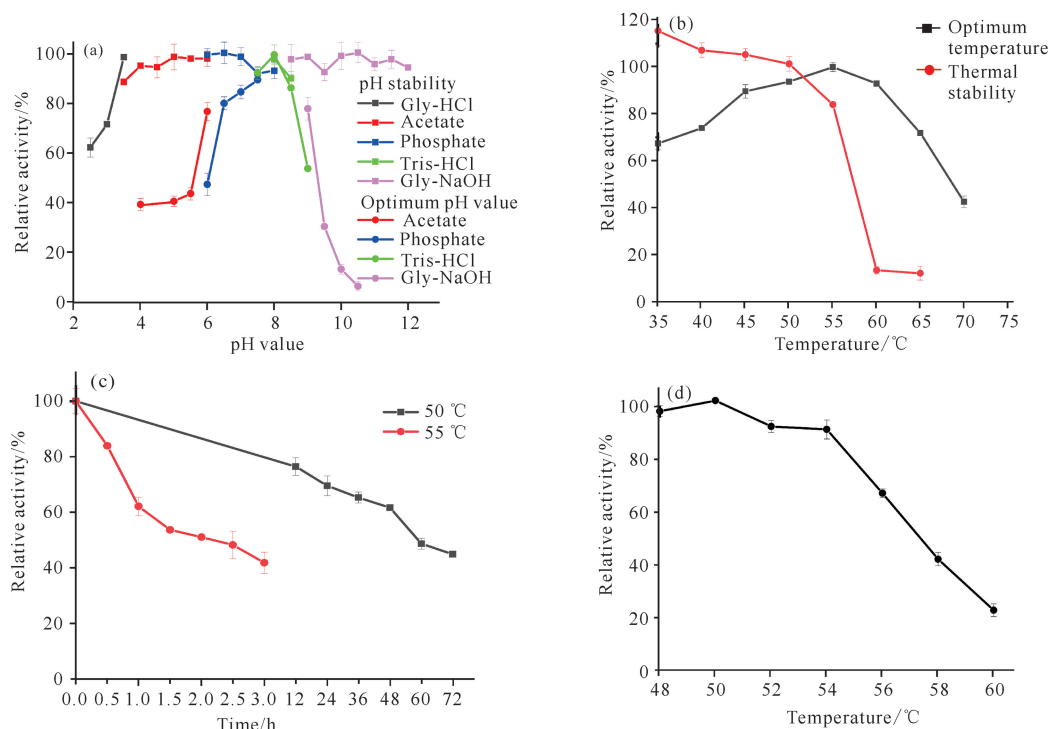
如图 3(b)所示, 重组酶 *Chi2375* 的最适温度为 55 °C; 在 45-60 °C 时, 相对酶活力在 80% 以上; 重组酶 *Chi2375* 在 35-55 °C 温度范围孵育 30 min 后, 相对酶活力在 80% 以上; 但当温度为 60 °C 时, 相对酶活力则急剧下降至 10% 以下。如图 3(c)和图 3(d)所示, 重组酶 *Chi2375* 在 50、55 °C 的半衰期 $t_{1/2}$ 值



M: molecular mass marker; I: purified *Chi2375*.

图 2 重组酶 *Chi2375* 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant *Chi2375*



(a) Optimum pH value and pH stability of recombinant *Chi2375*; (b) Optimum temperature and thermal stability of recombinant *Chi2375*; (c) Half-life of recombinant *Chi2375* at 50 and 55 °C; (d) Thermal stability of recombinant *Chi2375*

图 3 pH 值和温度对重组酶 *Chi2375* 的影响

Fig. 3 Effects of pH value and temperature on recombinant *Chi2375*

分别为 60 和 2 h, 热半失活温度 T_{50}^{30} 为 57 °C, 属于中等耐温酶。

2.3.2 重组酶 Chi2375 的底物特异性、 K_m 和 V_{max}

重组酶 Chi2375 对胶体几丁质的水解活力最高, 对 β -几丁质的水解活力是胶体几丁质的 85%; 以 α -几丁质为底物时, 重组酶酶活力很低, 仅为胶体几丁质的 1.5%; 以壳聚糖为底物时, 重组酶酶活力极低, 约为胶体几丁质的 0.5%; 重组酶 Chi2375 对细粉几丁质和 CMC-Na 无水解能力(图 4)。以胶体几丁质为底物, 利用软件 Origin 2019, 通过双倒数作图法拟合出重组酶 Chi2375 的 K_m 和 V_{max} 分别为 34.19 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 7.491 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (图 5)。

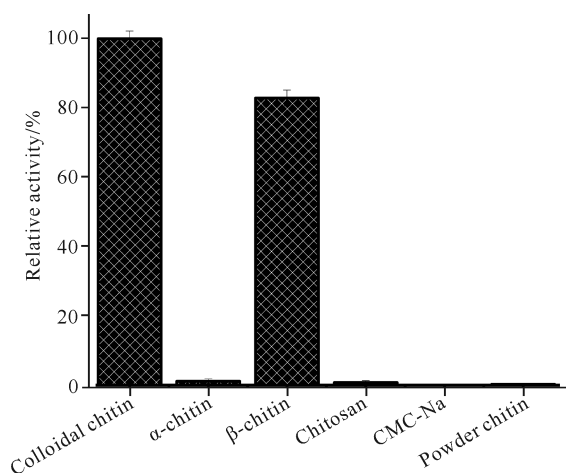


图 4 重组酶 Chi2375 的底物特异性测定

Fig. 4 Substrate specificity of recombinant Chi2375

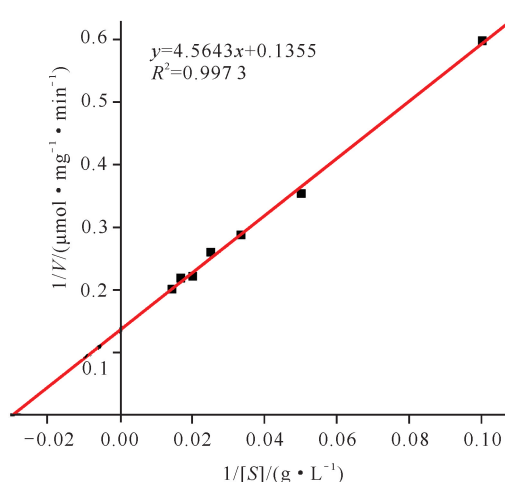


图 5 重组酶 Chi2375 的 K_m 和 V_{max}

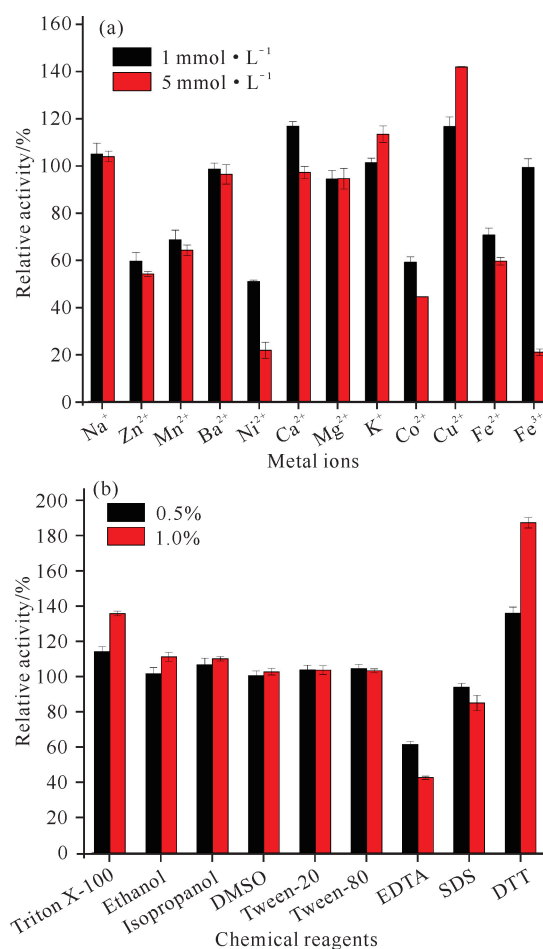
Fig. 5 K_m and V_{max} of recombinant Chi2375

2.3.3 金属离子和有机试剂对重组酶 Chi2375 酶活力的影响

K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子对重组酶 Chi2375 有激活作用, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、

Fe^{3+} 等金属离子对重组酶 Chi2375 具有不同程度的抑制作用, Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 对重组酶 Chi2375 酶活力影响不明显[图 6(a)]。在离子浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对重组酶 Chi2375 的激活作用明显, 相对酶活力均约为 116%。当离子浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Cu^{2+} 对 Chi2375 的激活作用增强, 相对酶活力为 140%; Ni^{2+} 和 Fe^{3+} 对重组酶 Chi2375 的抑制作用明显, 相对酶活力下降至 20% 以下。

如图 6(b) 所示, 0.5% 的 EDTA 对重组酶 Chi2375 具有明显抑制效果, 相对酶活力为 59.4%; 1.0% 的 EDTA 和 SDS 抑制重组酶 Chi2375 的酶活力, 相对酶活力分别为 42.9% 和 85.2%; 1.0% 的 Triton X-100 和 DTT 对重组酶 Chi2375 有明显的激活作用, 相对酶活力分别为 135.7% 和 186.9%; 乙



(a) Effects of 1 and 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ metal ions on the activity of recombinant Chi2375; (b) Effects of 0.5% and 1.0% chemical reagents on the activity of recombinant Chi2375

图 6 金属离子和有机试剂对重组酶 Chi2375 活力的影响

Fig. 6 Effects of metal ions and chemical reagents on recombinant Chi2375

醇、异丙醇、DMSO、吐温-20 和吐温-80 对重组酶 Chi2375 酶活力影响不大, 相对酶活力维持在 100%—110%。由此可见, 重组酶 Chi2375 是一种对有机溶剂耐受的几丁质酶。

2.3.4 盐离子浓度对重组酶 Chi2375 酶活力的影响

如图 7 所示, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液对重组酶 Chi2375 酶活力无影响。在 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液处理时, 重组酶 Chi2375 的相对酶活力在 90% 以上。在 1.5 — $3.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下, 重组酶 Chi2375 的相对酶活力仍保持在 75% 以上。

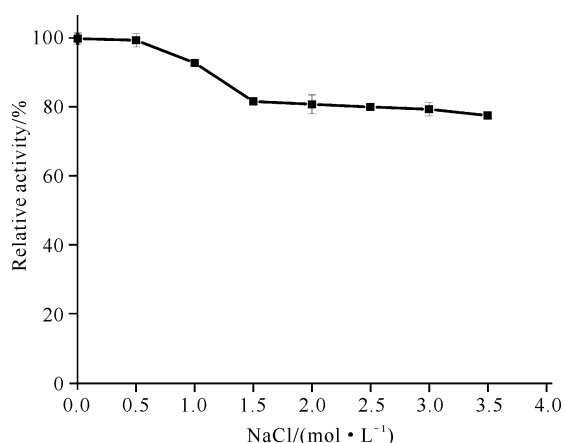


图 7 盐离子对重组酶 Chi2375 活力的影响

Fig. 7 Effects of NaCl concentration on stability of recombinant Chi2375

2.3.5 水解产物分析

采用分子排阻色谱法检测重组酶 Chi2375 降解胶体几丁质生成的产物, 结果如图 8 所示。不同反应时间 (0.5—72 h) 的终产物均以几丁二糖 [(GlcNAc)₂] 为主 (>90.0%), 以及少量的几丁单糖 (GlcNAc) (<10.0%), 说明重组酶 Chi2375 是一种外切几丁质酶。

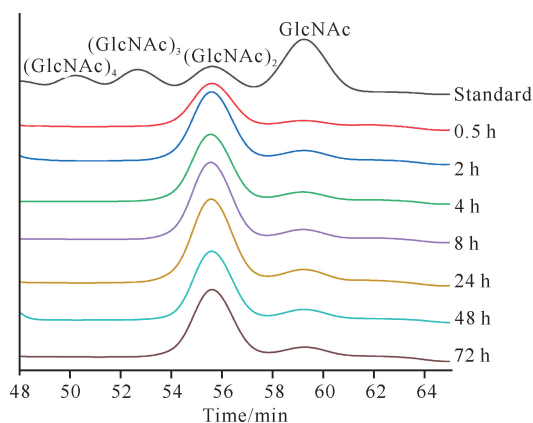


图 8 重组酶 Chi2375 水解胶体几丁质产物的 HPLC 图谱

Fig. 8 HPLC chromatograms of hydrolysis products of colloidal chitin by recombinant Chi2375

3 讨论

如今, 随着几丁质酶的应用愈加广泛, 对于其性能的研究需求也越来越大。重组酶 Chi2375 具有两个独立碳水化合物结合结构域 (CBM), CBM 有助于酶与几丁质底物的结合, 增加酶与底物的亲和力, 提高催化效率。

3.1 温度和 pH 值

重组酶 Chi2375 为碱性几丁质酶, 目前, 有关碱性几丁质酶的报道较少, 其中大多数几丁质酶为中性酶, 最适 pH 值为 7.0—8.0。例如, 来自 *Aeromonas* sp. SK10 的几丁质酶 Chi18A 的最适 pH 值为 8.0, 来自 *Aeromonas* sp. SK15 的几丁质酶 Chi18C 最适 pH 值为 7.5^[22]。重组酶 Chi2375 具有较高的 pH 耐受性, 在 pH 值为 3.5—12.0 的缓冲液中, 于 4 °C 条件下孵育 24 h 仍有 90% 以上的残余酶活力, 与大部分海洋几丁质酶在 pH 值为 4.0—9.0 中表现出较高稳定性的特性相一致^[23,24]。重组酶 Chi2375 的最适温度低于来自 *A. fumigatus* 的几丁质酶 YJ-407 (60 °C)^[25], 但高于来自 *A. griseoaurantiacus* 的几丁质酶 KX010988 (40 °C)^[26]。细菌来源的几丁质酶在 20—55 °C 具有较宽泛的温度耐受性。例如, 来自转棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 的几丁质酶 Tachi1 在 35—50 °C 保温 1 h 后具有 50% 以上的酶活力^[27]; 来自白长链霉菌 *Streptomyces albolongus* ATCC 27414 的几丁质酶 SaChiA4 在 35—55 °C 保温 24 h 仍保持 60% 以上的酶活力^[3]; 来自家蚕 *Bombyx mori* 的几丁质酶 Silkworm 在 25—55 °C 保温 1 h 仍具有 50% 以上酶活力^[28]。重组酶 Chi2375 在 35—50 °C 孵育 30 min 具有 100% 以上的相对酶活力, 在 55 °C 孵育 30 min 仍具有约 80% 的相对酶活力, 符合这一特性。

3.2 底物特异性

与多数来源于 GH18 家族的几丁质酶不同, 重组酶 Chi2375 除了能降解胶体几丁质外, 对 β-几丁质也具有较强的降解能力 (酶活力是胶体几丁质的 82.90%)。目前报道的几丁质酶主要是能降解 α-几丁质, 能降解 β-几丁质的较少。

3.3 金属离子和有机试剂

金属离子与底物活化或静电稳定有关, 并通过稳定底物-酶复合物在酶催化中发挥作用^[29]。5 mmol · L⁻¹ 的 Cu²⁺ 对重组酶 Chi2375 具有促进作用, 酶活力提高了约 1.4 倍; 而 Zn²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、

Co^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 则对重组酶 Chi2375 的酶活力具有抑制作用, 相对酶活力均不足 65%; Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^+ 对 Chi2375 活力影响不明显。与重组酶 Chi2375 不同的是来自海洋弧菌 *Vibrio* 的几丁质酶 Chi4668, 在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 和 K^+ 的作用下, 其相对酶活力分别在 140% 和 120% 以上^[30]。来自海洋烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* df673 的几丁质酶 $\Delta 30\text{AfChiJ}$, 在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 、 Na^+ 和 K^+ 的作用下, 相对酶活力在 120% 左右^[31]。来自耐热微泡菌 *M. thermotolerans* DAU221 的几丁质酶 MtCh509 (氨基酸序列未公开) 对己烷、异戊醇和异丙醇等有机溶剂具有较强的耐受性^[32], 与重组酶 Chi2375 相似, 但与作为碱性酶的重组酶 Chi2375 不同, MtCh509 是酸性酶, 其最适 pH 值为 4.6—5.0。

3.4 盐离子浓度

重组酶 Chi2375 对高盐离子浓度具有较好的耐受性, 是一种耐盐的几丁质酶。耐盐酶对需要高盐条件的工业过程至关重要。海洋来源的酶对高盐浓度具有一定的耐受性, 来自海洋细菌 *Pseudoalteromonas aurantia* DSM6057 的几丁质酶 Chi23 在 $4.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h 后残余酶活力仍保留 80% 以上^[33]; 来自海洋 *Aspergillus fumigatus* df673 的几丁质酶 $\Delta 30\text{AfChiJ}$, 在 9% (浓度约为 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 NaCl 溶液中 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 3 h 后残余酶活力仍保留 70% 以上^[31]。

3.5 水解产物分析

重组酶 Chi2375 的降解产物主要为 $(\text{GlcNAc})_2$, 且产物组成不随反应时间的延长而变化, 这一产物特征与几丁质外切酶以 $(\text{GlcNAc})_2$ 为一个单元对底物进行切割的特性一致。与 GH18 家族 A 亚家族中的其他几丁质酶相似, 如来自猪粪便环境的几丁质酶 Echi47^[34]、来自哈维弧菌 *Vibrio harveyi* 的几丁质酶 Chi4668^[30] 作为典型的 GH18 家族 A 亚家族几丁质酶可以将几丁质降解为 $(\text{GlcNAc})_2$ 。而有关 GH18 家族 B 亚家族的几丁质酶, 目前报道的主要为内切几丁质酶, 如来自海洋细菌 *Pseudoalteromonas aurantia* DSM6057 的几丁质酶 Chi23, 其水解胶体几丁质 120 min 的产物为 $(\text{GlcNAc})_2$ 和 $(\text{GlcNAc})_3$ ^[33]; 来自海洋细菌 *Paenicibacillus barengoltzii* 的几丁质酶 PbChi70, 其水解胶体几丁质的产物最初为 $(\text{GlcNAc})_2$ 、 $(\text{GlcNAc})_3$ 和 $(\text{GlcNAc})_4$, 水解 4 h 后为 GlcNAc 和 $(\text{GlcNAc})_2$ ^[24]。与大多数 GH18

家族 B 亚家族几丁质酶不同的是, 重组酶 Chi2375 属于外切酶。一些具有免疫活性的细胞表面存在 $(\text{GlcNAc})_2$ 的残基受体, 因此 $(\text{GlcNAc})_2$ 可用于抗肿瘤及提高机体免疫力; 此外, $(\text{GlcNAc})_2$ 还具有抑制 α -糖苷酶的作用, 可用于二型糖尿病的治疗。重组酶 Chi2375 可降解胶体几丁质得到纯度 90% 以上的 $(\text{GlcNAc})_2$, 因此重组酶 Chi2375 在医药领域具有广阔的应用前景。

4 结论

本研究获得的重组酶 Chi2375, 基因全长 1 521 bp, 编码 507 个氨基酸, 属于 GH18 家族, 具有几丁质酶的保守催化序列 DXXDXDXE。重组酶 Chi2375 的最适反应温度为 $55 \text{ }^\circ\text{C}$, T_{50}^{30} 值约为 $57 \text{ }^\circ\text{C}$, 最适反应 pH 值为 8.0, pH 值为 6.5—9.0 时相对酶活力在 80% 以上, 为中等耐温碱性几丁质酶。金属离子 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Cu^{2+} 及有机试剂 Triton X-100、DTT 对该酶活力具有促进作用, 而 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 EDTA 对该酶活力具有明显抑制作用。用胶体几丁质作为底物时重组酶 Chi2375 的酶活力最高, 其水解产物主要为 $(\text{GlcNAc})_2$ 。重组酶 Chi2375 属于 GH18 家族 B 亚家族外切几丁质酶, 且对 β -几丁质具有降解活力, 是一种新型的几丁质酶。在后续的研究中, 本课题组将开展重组酶 Chi2375 的结构功能研究, 阐明其作用机制, 进一步挖掘其潜能, 为提高该酶对海洋甲壳类废弃物的综合利用水平奠定理论基础。

参考文献

- [1] RAY L, PANDA A N, MISHRA S R, et al. Purification and characterization of an extracellular thermo-alkali stable, metal tolerant chitinase from *Streptomyces chilikensis* RC1830 isolated from a brackish water lake sediment [J]. *Biotechnology Reports*, 2019, 21: e00311.
- [2] PAN M Y, LI J H, LV X Q, et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 124: 54-62.
- [3] GAO L, SUN J N, SECUNDO F, et al. Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414 [J]. *Food Chemistry*, 2018, 261: 329-336.
- [4] LV J R, ZHANG Y M, MA M H, et al. Characterization of chitinase from *Exiguobacterium antarcticum* and its

- bioconversion of crayfish shell into chitin oligosaccharides [J]. Food Research International, 2022, 158: 1115-17.
- [5] HOWARD M B, EKBORG N A, WEINER R M, et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2003, 30(11): 627-635.
- [6] 刘邮洲, 罗楚平, 刘永锋, 等. 黏质沙雷氏菌 C8-8 几丁质酶基因的克隆与表达 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 487-491.
- [7] 高兆建, 丁飞鸿, 陈欢, 等. 产黄青霉抗真菌几丁质酶的纯化及特性分析 [J]. 食品科学, 2021, 42(14): 129-136.
- [8] 王琳, 陈雅如, 程湄婕, 等. 微生物几丁质酶研究进展及应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(12): 101-110.
- [9] ZHOU J, CHEN J H, XU N, et al. The broad-specificity chitinases: their origin, characterization, and potential application [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(8): 3289-3295.
- [10] LI Z K, WANG T, LUO X, et al. Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum* [J]. Biological Control, 2018, 126: 36-44.
- [11] 郑家敏. 几丁质酶高产菌株选育及酶学性质研究 [D]. 福州: 福州大学, 2018.
- [12] 刘朋, 叶波平. 微生物几丁质酶研究进展及应用现状 [J]. 科学技术创新, 2018(12): 52-53.
- [13] OYELEYE A, NORMI Y M. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications [J]. Bioscience Reports, 2018, 38(4): BSR2018032300.
- [14] 赵沙, 颜子娟, 张舒, 等. 细菌几丁质酶结构、功能及分子设计的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(7): 1179-1191.
- [15] 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(5): 494-504.
- [16] LI H, GREENE L H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8654.
- [17] SUN X M, LI Y J, TIAN Z N, et al. A novel thermostable chitinolytic machinery of *Streptomyces* sp. F-3 consisting of chitinases with different action modes [J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 136.
- [18] DAS S, DEY P, ROY D, et al. N-acetyl-D-glucosamine production by a chitinase of marine fungal origin: a case study of potential industrial significance for valorization of waste chitins [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 187(1): 407-423.
- [19] LIU C, SHEN N K, WU J F, et al. Cloning, expression and characterization of a chitinase from *Paenibacillus chitinolyticus* strain UMBR0002 [J]. PeerJ, 2020, 8: e8964.
- [20] 郝之奎. *Chitinolyticbacter meiyuanensis* 的筛选鉴定及其发酵产几丁质酶研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [21] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [22] KIM S, PARK J, OH J, et al. Molecular characterization of four alkaline chitinases from three chitinolytic bacteria isolated from a mudflat [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 12822.
- [23] LI R K, HU Y J, HE Y J, et al. A thermophilic chitinase 1602 from the marine bacterium *Microbulbifer* sp. BN3 and its high-level expression in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 68(5): 1076-1085.
- [24] YANG S Q, FU X, YAN Q J, et al. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii* [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 1041-1048.
- [25] XIA G Q, JIN C S, ZHOU J, et al. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407 [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(14): 4079-4085.
- [26] SHEHATA A N, ABD EL ATY A A, DARWISH D A, et al. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(Pt A): 990-999.
- [27] 汤伟, 李雅华, 刘露, 等. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化 [J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 345-352.
- [28] ZHANG H B, LIU M Y, TIAN Y J, et al. Comparative characterization of chitinases from silkworm (*Bombyx mori*) and bollworm (*Helicoverpa armigera*) [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2011, 61(2): 267-275.
- [29] ANDREINI C, BERTINI I, CAVALLARO G, et al. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles [J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008, 13(8): 1205-1218.

- [30] HE X X, YU M, WU Y H, et al. Two highly similar chitinases from marine *Vibrio* species have different enzymatic properties [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(3): 139.
- [31] HE B, YANG L Y, YANG D F, et al. Biochemical purification and characterization of a truncated acidic, thermostable chitinase from marine fungus for *N*-acetylglucosamine production [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10:1013313.
- [32] LEE H, LEE Y, CHOI Y. Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221 [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 303.
- [33] WANG Y J, JIANG W X, ZHANG Y S, et al. Structural insight into chitin degradation and thermostability of a novel endochitinase from the glycoside hydrolase family 18 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2457.
- [34] LIU Y C, YAN Q J, YANG S Q, et al. Novel protease-resistant exochitinase (Echi47) from pig fecal environment DNA with application potentials in the food and feed industries [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(27): 6262-6270.

Gene Cloning, Expression and Characterization of Chitinase from *Microbulbifer thermotolerans* YLW106

OUYANG Yuying¹, LIN Mei², WANG Qiaozhen², LU Bo², LÜ Xinyue³, HUANG Jun², ZHOU Rong², LIANG Shijie², QIN Qiurong², WANG Qingyan², HUANG Shushi², LIAO Siming^{1,2,*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. National Key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Institute of Biological Sciences and Technology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. College of Food and Quality Engineering, Nanning University, Nanning, Guangxi, 541699, China)

Abstract: To promote value-added utilization of chitin wastes, the chitinase gene was cloned from *Microbulbifer thermotolerans* YLW106 and expressed, and then the enzymatic properties of the recombinant enzyme were characterized. The results showed that the chitinase gene *Chi2375* was cloned from *M. thermotolerans* YLW106, and the recombinant enzyme *Chi2375* was expressed in *Escherichia coli*. *Chi2375* showed the optimum temperature of 55.0 °C and the half-life ($t_{1/2}$) of 60 h and 2 h at 50 °C and 55 °C, respectively. The optimum pH value was 8.0 and the relative activity of the recombinant enzyme *Chi2375* remained stably above 85% after incubation at 4 °C and pH value 3.5–12.0 for 24 h. In addition, 5 mmol · L⁻¹ Cu²⁺, 1% Triton X-100 and 1% DTT improved the activity of *Chi2375*, with the relative activities of 140%, 130% and 180%, respectively. The most suitable substrate was β-chitin. With colloidal chitin as the substrate, the V_{max} and K_m of *Chi2375* were (7.49 ± 0.25) U · mg⁻¹ and (33.75 ± 1.24) mg · mL⁻¹, respectively. The product of the reaction of *Chi2375* with colloidal chitosan was chitobiose with the purity above 90%, demonstrating application potential in medicine and food.

Key words: *Microbulbifer thermotolerans*; chitinase; cloning and expression; purification; enzymatic properties