

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90090

淀粉酶链霉菌几丁质酶克隆表达及催化功能分析

Cloning, expression and catalytic function analysis of chitinase from *Streptomyces diastaticus*

李 芹¹ 王立梅² 齐 斌^{1,2}LI Qin¹ WANG Li-mei² QI Bin^{1,2}

(1. 苏州大学医学部药学院, 江苏 苏州 215123;

2. 常熟理工学院苏州市食品生物技术重点实验室, 江苏 常熟 215500)

(1. College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China;

2. Research Center of Fermentation Engineering, Changshu Institute of Technology,

Changshu, Jiangsu 215500, China)

摘要:目的: 提高几丁质酶降解几丁质生产几丁寡糖产量。方法: 利用基因工程方法对淀粉酶链霉菌几丁质酶进行克隆、原核表达、酶学性质探究, 并通过同源建模、催化域氨基酸比对、定点突变等方法探究几丁质酶活性位点。结果: 克隆和原核表达后, 产酶周期由 7 d 缩短至 24 h, 酶活可达 132 U/L, 较原始菌酶活性(100 U/L)提高了 32%。决定几丁质酶活性的氨基酸为催化域的 128, 130 位的天冬氨酸和 132 位的谷氨酸。结论: 对几丁质酶基因克隆表达后, 其产酶周期缩短、酶活性提高。

关键词: 淀粉酶链霉菌; 几丁质酶; 克隆表达; 同源建模; 定点突变

Abstract: Objective: This study focused on improving the production of chitosan oligosaccharides by chitinase degradation of chitin. **Methods:** Using genetic engineering methods to clone, prokaryotic expressing, and investigating enzymatic properties of the chitinase from *Streptomyces diastaticus*, and the chitinase activity was explored by homology modeling, amino acid comparison of the catalytic domain, and site-directed mutagenesis. **Results:** After cloning and prokaryotic expression, the enzyme production cycle was shortened from 7 d to 24 h, and the enzyme activity reached 132 U/L, which was 32% higher than the original bacterial enzyme activity (100 U/L). The amino acids that determine the activity of chitinase was Asp at position

128, 130, and Glu at position 132 of the catalytic domain. **Conclusion:** Clonal expression of the chitinase gene resulted in a shorter enzyme production cycle and increased enzyme activity.

Keywords: *Streptomyces diastaticus*; chitinase; clonal expression; homology modeling; site-directed mutagenesis

几丁质是一种天然碱性线性多糖, 其结构由多个 *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺通过 β -1,4 糖苷键连接组成, 是来自甲壳动物的外骨骼以及真菌和昆虫细胞壁的第二个最丰富的天然生物聚合物^[1]。其年生物合成量约为 1 000 亿 t, 降解产物中的几丁寡糖、壳低聚糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖被广泛应用于食品、纺织、农业等领域, 具有普遍的生物活性和广阔的市场开发前景^[2]。几丁寡糖是由几丁质或壳聚糖降解获得的水溶性物质, 聚合度为 2~20, 是目前自然界中唯一带正电的碱性氨基酸寡糖^[3], 具有良好的水溶性、抗氧化和抗肿瘤活性^[4]。目前, 制备几丁寡糖的方法包括化学和物理降解、酶催化水解^[5]和转糖基化介导的合成^[6]。大多数几丁寡糖是通过化学方法生产的, 主要使用酸或氧化剂来降解几丁质^[7], 该方法会造成严重的环境污染和资源浪费^[8]。转糖基化介导的几丁寡糖合成是几丁寡糖酶促生产的新方法, 该反应取决于在供体和受体糖之间引入新的糖苷键^[9]。据报道^[10-12], 只有少数 GH18 几丁质酶具有转糖基化(TG)活性。酶催化因具有反应条件温和、酶促副反应少、产品安全性高、无环境污染等优点, 将逐步取代传统的酸性或氧化降解方法^[13]。因此, 利用几丁质酶降解法降解几丁质生产几丁寡糖的研究较多^[14-15]。

几丁质酶是一类可以催化几丁质并将其专一性降解为几丁寡糖、壳聚糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺的糖苷键水解

基金项目:江苏省科技厅重点研发计划(重点)项目(编号: BE2020386); 苏州市科技计划项目(编号: SS202120, SS202124)

作者简介:李芹, 女, 苏州大学在读硕士研究生。

通信作者:齐斌(1965—), 男, 常熟理工学院研究员, 博士。

E-mail: qibin65@126.com

收稿日期:2021-11-06

酶^[16]。然而,目前产几丁质酶活性高、用于工业化生产几丁寡糖的菌株极少,只有少数黏质沙雷氏菌和木霉菌等。张博阳等^[17]对桑氏链霉菌几丁质酶基因 *ChiKJ40* 进行克隆表达,得到几丁质酶活性为 0.080 U/mL。Li 等^[18]采用 PCR 方法对 *Streptomyces sampsonii* (Millard&Burr) Waksman KJ40 的几丁质酶基因 *ChiKJ406136* 进行克隆并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,其粗蛋白质和纯化蛋白质溶液中的几丁质酶活性仅为 0.045,0.033 U/mL。研究拟对淀粉酶链霉菌 CS1801 几丁质酶 PROKKA01070 基因在大肠杆菌中进行克隆,通过原核表达系统获得可溶性几丁质酶,对其活性进行探究,结合同源建模、催化域氨基酸比对及其催化域关键氨基酸位点突变,验证其活性口袋内部关键氨基酸的功能,揭示这些氨基酸残基在酶催化中的作用,为该菌的后续深入研究及工业生产几丁寡糖提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

淀粉酶链霉菌 (*Streptomyces diastaticus*)CS1801:由实验室从虾酱中筛选得到;

大肠杆菌 Top10 感受态、大肠杆菌 BL21(DE3)、细菌 DNA 抽提试剂盒、高 GC 含量 PCR 扩增试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提取试剂盒、定点突变试剂盒、氨苄青霉素钠:生工生物工程(上海)股份有限公司;

PMD-19T 载体基因克隆试剂盒以及限制性内切酶 (EcoR I 和 Xho I):宝日医生物技术(北京)有限公司;

pET-32a(+)载体:南通柯休克生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

全温振荡培养箱:ZQZY-CF 型,上海知楚仪器有限公司;

微孔板分光光度计:XMARK 型,美国 Bio-Rad 公司;

恒温培养箱:GHP-9270 型,上海索普仪器有限公司;

电子天平:XS105DU 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

高速台式离心机:Legend Micro 17R 型,德国 Thermo 公司;

高速冷冻离心机:CR22G II 型,日本 Hitachi 公司;

垂直电泳系统:protean II 型,美国 Bio-Rad 公司;

PCR 基因扩增仪:My Cyclor 型,美国 Bio-Rad 公司;

琼脂糖水平电泳槽:DYCP-31BN 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像系统:Gel Doc X 型,美国 Bio-Rad 公司;

核酸浓度测定仪:NanoDrop 2000 型,德国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 胶体几丁质制备 称取 10 g 几丁质粉末,加至 200 mL 浓盐酸中,均匀搅拌至全部溶解,过滤,加入

1 000 mL 蒸馏水,离心,用蒸馏水洗沉淀至中性,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 几丁质酶 ChiA 基因扩增和克隆 根据细菌 DNA 提取试剂盒提取淀粉酶链霉菌 CS1801(*Streptomyces diastaticus* CS1801)基因组 DNA。根据已获得的淀粉酶链霉菌全基因组测序数据库信息中,几丁质酶 PROKKA01070 基因序列用 Primer Premier 5.0 生物软件设计两条引物,在两条引物的 5'端分别引入酶切位点,如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	引物序列(5'-3')	酶切位点
F	CCGGAATTCGTGTACGACCGAACTAC-CACG	EcoR I
R	CCGCTCGAGTCAGTCGATCGCGTGGAT-CAG	Xho I

去除几丁质酶 PROKKA01070 基因序列的信号肽,PCR 扩增目的基因片段,PCR 反应条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环,72 ℃ 30 min,4 ℃ 保存。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果,将 PCR 产物与 pMD19-T 载体通过 T4 连接酶 16 ℃ 连接过夜后转化至 Top10 感受态细胞中并进行蓝白斑筛选,挑选白色单克隆菌落进行菌液 PCR 验证,将鉴定为阳性的重组菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 表达载体的构建 将测序正确的 ChiA/pMD19-T 质粒与表达载体 pET-32a(+)分别用 EcoR I 酶和 Xho I 酶双酶切。验证酶切产物后,切胶回收质粒和基因片段。酶切的 *ChiA* 基因片段用 T4 连接酶与酶切的 pET-32a(+)连接。转化 Top10 感受态细胞,培养过夜。菌落 PCR 和质粒酶切鉴定后,获得的阳性重组菌 ChiA/pET-32a(+)/Top10 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.4 重组几丁质酶 SDS-PAGE 分析 将测序正确的 ChiA/pET-32a(+)转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上,挑取阳性克隆于 50 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 培养过夜。按 2%接种量接种至新鲜的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 震荡培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8,用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,16 ℃ 诱导 24 h。收集菌体,按 1 g/5 mL 加入裂解液,加入溶菌酶 1 mg/mL,冰育 45 min,分别于-20 ℃、室温下进行冻融循环。破壁后,10 000 r/min 离心 20 min,取菌体、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析^[19]。

1.2.5 酶活测定 采用 DNS (3,5 二硝基水杨酸) 法^[20-21]。N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准曲线为 $y = 3.3106x - 0.0774$, $R^2 = 0.9959$ 。

1.2.6 重组几丁质酶的表达

(1) 反应温度:采用标准几丁质酶活性测定法测定 20~70 °C 下几丁质酶活性。

(2) pH 值:分别在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0~5.0)、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 6.0~8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 和碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.0~11.0) 中进行标准酶活性测定,确定 ChiA 的最佳反应 pH,所有缓冲液浓度均为 50 mmol/L。

(3) 金属离子及化学试剂:分别用 1,5,10 mmol/L 的 $MgCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、KCl、NaCl、 $C_2H_3O_2Li$ 、EDTA、巯基乙醇、SDS,在标准几丁质酶测定条件下探究几丁质酶活性。

(4) 底物:用 1% 的胶体几丁质、粉状几丁质、虾壳粉、蟹壳粉、壳聚糖、羧甲基纤维素钠,于磷酸氢二钠-磷酸二氢钠盐缓冲液 (pH 7.0) 中,50 °C 反应 30 min,测定 ChiA 的底物特异性。

1.2.7 同源建模 在 NCBI 的 PDB 结构数据库中,将几丁质酶 ChiA 的氨基酸序列进行 BLAST,将检索出的同源性高的蛋白作为模板,利用同源建模的方法构建几丁质酶 ChiA 的三维结构。几丁质酶同源建模选用 SWISS-MODEL 在线软件^[22],建模后用 PROCHECK 作拉氏图评估预测三维结构的可信度^[23]。

1.2.8 氨基酸多序列比对 根据几丁质酶 ChiA 同源建模模型,利用 Clustal Omega 在线软件,比对分析几丁质酶 ChiA 编码的催化域氨基酸序列与其他同源性高并且晶体结构确定的几丁质酶催化域的氨基酸序列,推测几丁质酶 ChiA 的催化反应机制。

1.2.9 催化域关键氨基酸的突变 以 ChiA/pET32a (+)/Top10 作为出发菌株,采用定点突变试剂盒^[24],根据 18 家族几丁质酶 ChiA 催化域氨基酸比对结果,选择催化结构域中的关键氨基酸位点进行定点突变,探究其催化活性。为了确保所需的突变是序列中唯一的突变,在生工生物工程(上海)股份有限公司中对插入的 DNA 的整个区域进行测序。

1.2.10 突变体在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达 将序列突变正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑取单菌落至 50 mL 含有 Amp(100 μ g/mL)的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养过夜。按 2% 接种量接种至新鲜的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 震荡培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.6~0.8,用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,16 °C 诱导 24 h。收集菌体,按 1 g/5 mL 加入裂解液,加入溶菌酶 1 mg/mL,冰育 45 min,于 -20 °C、室温下进行冻融循环。破壁后,10 000 r/min 离心 20 min,去沉淀留上清酶液。

1.2.11 突变体酶活力和动力学参数测定 用 DNS 法测定突变体酶活。动力学参数测定:在反应管中加入不同质量浓度(1.25,2.50,5.00,7.50,10.00,12.50 mg/mL)的底物胶体几丁质,加入相同量的适量酶液,50 °C、200 r/min 摇床反应 30 min。加入 1.5 mL DNS,煮沸 5 min 显色,冰水中冷却至室温,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 540 nm 处测定吸光值。通过制作 Michaelis-Menten 动力学曲线测定 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 值。

2 结果与分析

2.1 基因克隆及鉴定

由图 1 可知,几丁质酶 PROKKA01070 基因扩增结果与实验室前期全基因组测序结果一致,大小为 1 065 bp;菌液 PCR 验证结果在约 1 065 bp 处有目的条

表 2 用于定点突变的引物序列

Table 2 The primer sequences used in site-directed mutation

突变引物	引物序列(5'-3')
D128A	F-GACGTCTTCGACGGCATCGCCGTCGACTGGGAGTATCCGAA R-GTTCGGATACTCCAGTCGACGGCGATGCCGTCGAAGACGTC
D128N	F-CGACGTCTTCGACGGCATCAACGTCGACTGGGAGTATCCG R-CGGATACTCCAGTCGACGTTGATGCCGTCGAAGACGTCG
D130A	F-CGACGGCATCGACGTCGCCTGGGAGTATCCGAACGCCTG R-CAGGCGTTCGGATACTCCAGGGCAGTCGATGCCGTCG
D130N	F-CTTCGACGGCATCGACGTCGAACGTCGACTGGGAGTATCCGAACGCC R-GGCGTTCGGATACTCCAGTTGACGTCGATGCCGTCGAAG
E132A	F-GGCATCGACGTCGACTGGGCGTATCCGAACGCCTGCGGG R-CCCAGGCGTTCGGATACGCCAGTCGACGTCGATGCC
E132Q	F-CGGCATCGACGTCGACTGGCAGTATCCGAACGCCTGCGG R-CCGAGGCGTTCGGATACTGCCAGTCGACGTCGATGCC

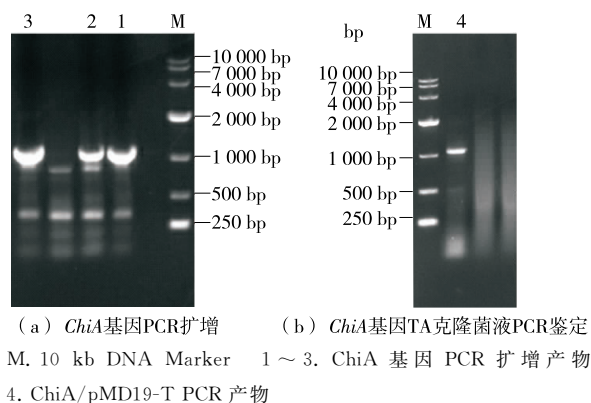


图 1 *ChiA* 基因 PCR 扩增及克隆鉴定

Figure 1 PCR amplification and clone identification of *ChiA* gene

带,与测序结果一致,说明阳性克隆 *ChiA/pMD19-T/Top10* 构建成功。

2.2 *ChiA/pET32a(+)* 表达载体的构建与鉴定

由图 2 可知,菌落 PCR 电泳显示在约 1 065 bp 处有一目的条带。双酶切验证结果表明,约在 1 065,6 000 bp 有目的条带,大小与预期结果相符,表明目的基因和表达载体连接方向正确,证明原核表达载体 *ChiA/pET32a(+)* 构建成功。

2.3 表达产物的鉴定及酶活检测

由图 3 可知,45 kDa 附近有目的条带,与预测蛋白大小相差无几,说明该重组菌成功表达蛋白。将构建好的重组菌株诱导表达后,在 pH 7.0,50 °C 下,诱导后的酶活为 132 U/L,而未诱导的检测不到酶活性,说明重组几丁质酶 *ChiA* 在大肠杆菌中成功表达且重组几丁质酶活性比原始酶活性(100 U/L)提高了 32%。

2.4 重组几丁质酶的特征

2.4.1 pH 和反应温度 由图 4 可知,重组酶在 pH 7.0 下显示出最高的活性,最佳反应温度为 50 °C。

2.4.2 金属离子和化学试剂 由表 3 可知,10 mmol/L 浓度下,Zn²⁺ 和 Fe³⁺ 对该重组酶有较强烈的抑制作用,相

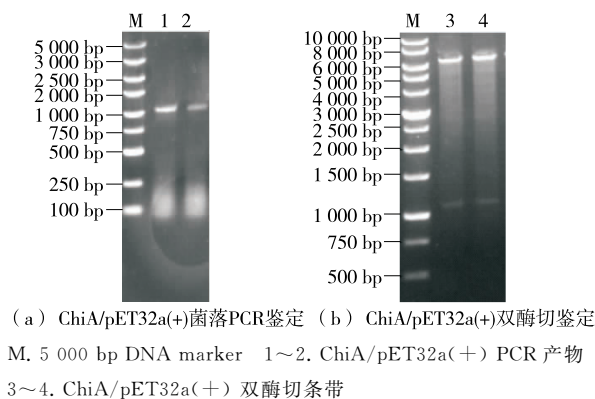


图 2 重组质粒 *ChiA/pET32a(+)* 鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid *ChiA/pET32a(+)*

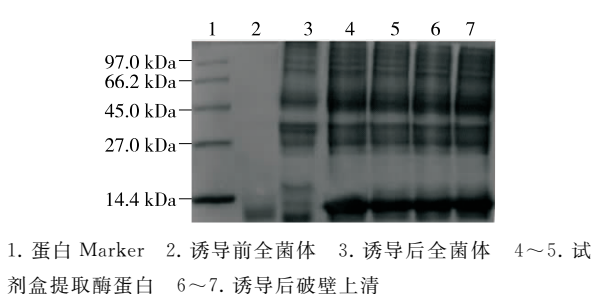


图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

对酶活力只有 37.7%和 35.3%;Mg²⁺、Ca²⁺、SDS、巯基乙醇、EDTA 对该酶也有不同程度的抑制,但 K⁺、Na⁺、Li⁺ 对该酶分别有 6.3%,10.6%,8.6%的促进作用。1,5 mmol/L 浓度下,Zn²⁺ 和 SDS 对重组酶有较强的抑制作用,其他离子和试剂对该酶无明显影响。1 mmol/L 浓度下,Ca²⁺、Fe³⁺ 和 Mg²⁺ 对该酶有一定的促进作用。试验浓度下,Na⁺ 和 Li⁺ 对该酶均有促进作用。

2.4.3 底物 由表 4 可知,当以胶体几丁质为底物时,重组酶的相对酶活性最高;当以粉末为底物时,重组酶的相对酶活性为 9.8%。当以 1% 虾壳粉和蟹壳粉为底物时,

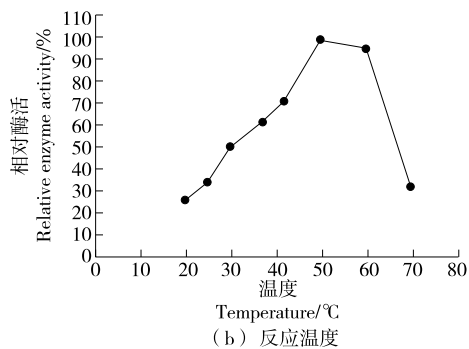
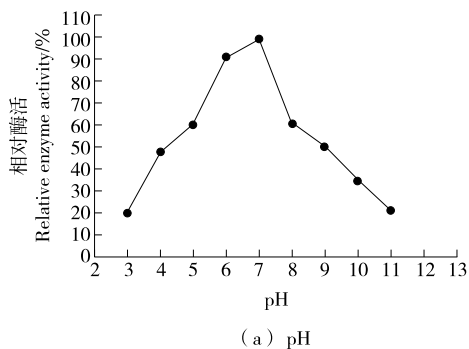


图 4 pH 和反应温度对 *ChiA* 活性的影响

Figure 4 Effects of pH and temperature on *ChiA* activity

表 3 离子和化学试剂对重组酶 ChiA 酶活力的影响
Table 3 Effects of different metal ions and chemicals on ChiA activity %

试剂	浓度/(mmol · L ⁻¹)		
	1	5	10
Mg ²⁺	105.4±2.3	91.1±3.0	56.8±2.8
Ca ²⁺	110.0±2.6	99.2±3.4	77.4±1.8
Zn ²⁺	43.1±3.0	38.7±1.8	37.7±2.4
Fe ³⁺	102.5±1.9	88.6±2.3	35.3±3.4
K ⁺	89.6±3.2	90.2±3.5	106.3±2.7
Na ⁺	110.2±1.0	109.8±2.3	110.6±2.0
Li ⁺	112.5±3.0	104.3±2.8	108.6±3.4
SDS	79.8±1.6	56.3±2.0	47.1±3.1
巯基乙醇	96.8±3.0	87.6±2.0	56.8±2.4
EDTA	97.2±3.6	82.5±3.3	60.5±1.2

表 4 ChiA 的底物特异性测定结果
Table 4 Determination of substrate specificity of ChiA

底物	相对酶活力/%
胶体几丁质	100.0±0.2
粉末几丁质	9.8±0.3
虾壳粉	6.5±0.4
蟹壳粉	5.8±0.3
壳聚糖	0.0±0.0
羧甲基纤维素钠	0.0±0.0

只检测到微弱酶活;当以壳聚糖和羧甲基纤维素钠为底物时,检测不到酶活。综上,重组酶可以有效地降解胶体几丁质,对几丁质具有底物特异性,而壳聚糖、羧甲基纤维素钠等几丁质结构类似物不能与重组酶特异性结合。

2.5 同源建模

经比对分析,选择与几丁质酶 ChiA 催化结构域中的结构基序(PDBID: 4w5u)在相应的密码子区域具有 69.03% 的氨基酸序列相似性的嗜热链霉菌(StChi40)的几丁质酶作为 ChiA 同源建模的模板。由图 5 可知,ChiA 属于 18 家族糖苷水解酶,其结构由 8 个 α -螺旋内桶和 8 个 β -折叠外桶组成,它们紧密地挤在一起,并由一个不规则的卷曲段连接。18 家族中对应 β -3 和 β -4 链的两个高度保守的氨基酸片段具有相似的结构,底物结合位点位于 β -3 和 β -4 链的保守序列形成的环缝中。

由图 6 可知,90.4%,8.6%,1.0%和 0%的氨基酸分别落入核心区、偏好允许区、一般允许区和不允许区。总的来说,90%以上的氨基酸在其偏好区,说明预测的几丁质酶三维结构可信。

2.6 ChiA 催化氨基酸序列分析

序列比对分析所选序列,包括环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans* W1-12)菌株 Chitinase A1 的 A 链

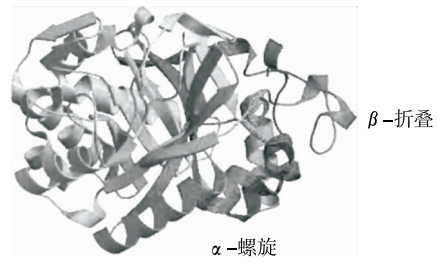


图 5 几丁质酶 ChiA 的三级结构模型
Figure 5 Three-dimensional structure model of chitinase ChiA

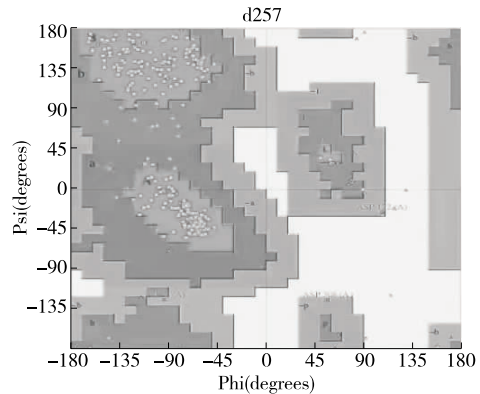


图 6 几丁质酶三维结构拉氏图
Figure 6 Ramachandran plot of the modeled 3D structure of chitinase

(PDB: 1ITX_A)、嗜热链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus* StChi40)菌株几丁质酶的 A 链(PDB:4W5U)、关节杆菌(*Arthrobacter* sp. TAD20)菌株 Chitinase B 的 A 链(PDB:1KFW)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)菌株 Chitinase A 的 A 链(PDB:1X6L)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)菌株 Chitinase A 的 A 链(PDB:2WK2)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)菌株 Chitinase A 的 A 链(PDB:1RD6)和哈氏弧菌(*Vibrio Harveyi*)菌株几丁质酶的 A 链(PDB: 3B8S_A)。由图 7 可知,8 种菌的氨基酸序列和功能有差异性,但都具有高度保守的催化域的关键氨基酸。ChiA 具有两个典型的 18 家族糖苷水解酶的保守域,分别为 87~90 位的“SxGG”结构和 125~132 位的“DxxDxDxE”结构,在催化域的环缝部位。有研究^[25-27]表明,几丁质酶“SxGG”保守模块的活性中心负责酶与底物结合,“DxxDxDxE”保守域的催化活性中心具有催化降解底物功能。¹²⁵DxxDxDxE¹³²形成即($\beta\alpha$)8 桶的 β -4 链,构成催化域的核心部位。

2.7 重组菌株中活性位点氨基酸的定点突变

为了证实 ChiA 中保守氨基酸的功能,将 D128、D130 和 E132 残基用 Asn、Ala 或 Gln 取代,产生 6 个突变体: D128N、D128A、D130N、D130A、E132Q 和 E132A。

由图 8 可知,突变体的比活性大大降低,特别是

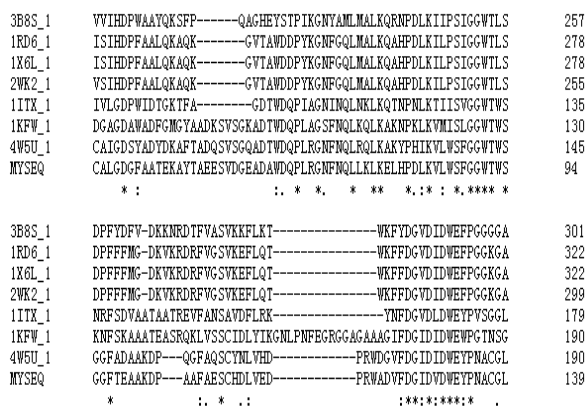


图 7 几丁质酶 ChiA 催化域与其他生物体的催化域多重序列比对

Figure 7 Multiple sequence alignment of the catalytic domain of chitinase ChiA with that of other organisms

E132A、E132Q 几乎完全失活 (12.7, 13.2 U/L), 证实了 Glu-132 在酶催化中起重要作用; 在突变体中, D128N、D128A、D130N 和 D130A 也表现出较低的比活性, 证实了 D128、D130、E132 氨基酸在 18 家族的保守区域中起重要作用。有研究^[28]报道, Glu-132 在催化反应中作为质子供体起着关键作用。突变体 D130N 的比活性在阴性突变体中最高, 因为天冬酰胺提供的氢键可以取代天冬氨酸提供的氢键, 而丙氨酸不能产生氢键^[25]。天冬氨酸在 130 位的催化作用主要由氢键支持, 因此氢键的存在极大地稳定了 ChiA 的催化活性^[29]。第 128 位的天冬氨酸被认为是 D130 的辅助因子, 增加了 D130 的 pKa^[30]。此外, DXXDXDXE 保守结构域中的中间 Asp 可以增加几丁质酶的转糖基活性^[31]。

2.8 重组几丁质酶突变体的动力学常数

由表 5 可知, 6 个突变体的催化效率与重组酶相比显著降低, 其 K_m 值明显升高, 可能是突变体与底物胶体几

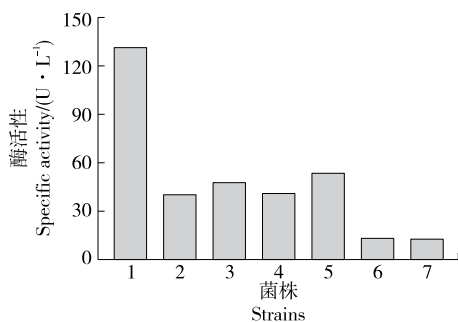


图 8 各个突变体酶活

Figure 8 The specific activities of the mutants

表 5 ChiA 及其突变体的动力学参数

Table 5 Kinetic parameters of ChiA and its mutants

酶	$V_{max}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1})$	$K_m/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$k_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m/(\text{mL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$
D128A	0.356	0.923	2.94	3.19
D128N	0.365	0.883	3.05	3.45
D130A	0.358	0.901	2.95	3.27
D130N	0.376	0.832	2.94	3.53
E132A	0.339	1.697	4.97	2.93
E132Q	0.342	1.682	5.04	3.00
ChiA	0.536	0.281	5.96	21.20

丁质之间的亲和力减小, 证明了 D128、D130、E132 是催化几丁质酶降解几丁质生产几丁寡糖的关键氨基酸活性位点。

3 结论

以淀粉酶链霉菌 CS1801 几丁质酶基因序列为研究对象, 以大肠杆菌 BL21(DE3) 为表达宿主, 成功表达了几丁质酶 ChiA。结果表明, 几丁质酶重组工程菌培养周期缩短至 24 h, 酶活为 132 U/L, 较原始酶提高了 32%。重组几丁质酶的最适反应温度为 50 °C, pH 为 7.0, 且该酶具有胶体几丁质底物特异性。第 128, 130 位的天冬氨酸和 132 位的谷氨酸是几丁质酶 ChiA 催化结构域内的催化活性氨基酸。为进一步提高几丁质酶的活性及酶法生产几丁寡糖的效率, 可通过分离纯化、酶固定化等技术对几丁质酶进行研究, 获得催化生产几丁寡糖效率得到提高的几丁质酶。

参考文献

[1] THARANATHAN R N, KITTUR F S. Chitin-The undisputed biomolecule of great potential[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2003, 43(1): 61-87.

[2] HORN S J, SIKORSKI P, CEDERKVIST J B, et al. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides[J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(48): 18 089-18 094.

[3] 吴玉潇, 徐海涛, 高云华, 等. 壳寡糖的生物活性研究进展[J]. 明胶科学与技术, 2015, 35(3): 128-132.

WU Yu-xiao, XU Hai-tao, GAO Yun-hua, et al. Research progress on production of chitoooligosaccharides[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2015, 35(3): 128-132.

[4] THAMTHIANKUL S, SUAN-NGAY S, TANTIMAVANICH S, et al. Chitinase from Bacillus thuringiensis subsp Pakistani[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 27(56): 395-401.

[5] WEI Guo-guang, ZHANG A-lei, CHEN Ke-quan, et al. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from crayfish shell wastes pretreated via high pressure homogenization[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 37(171): 236-241.

- [6] TAIRA T, FUJIWARA M, DENNHART N, et al. Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas revoluta*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS [J]. *BBA Proteins Proteom*, 2010, 1 804 (4): 668-675.
- [7] WANG S L, LIN T Y, YEN Y H, et al. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(15): 2 507-2 515.
- [8] WANG Di, LI An-jie, HAN Hong-yu, et al. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 40(116): 863-868.
- [9] MALLAKUNTLA M K, VAIKUNTAPU P R, BHUVANACHANDR A, et al. Transglycosylation by a chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* generates longer chitin oligosaccharides[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5 113-5 525.
- [10] 潘梦妍. 甲壳素酶的克隆表达与分子改造研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 2.
PAN Meng-yan. Cloning, expression and molecular modification of chitinase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019: 2.
- [11] ZAKARIASSEN H, HANSEN M C, JRANLI M, et al. Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(25): 5 693-5 703.
- [12] MADHUPRAKASH J, SINGH A, KUMAR S, et al. Singh, structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation [J]. *International Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 4(4): 166-178.
- [13] LONHIENNE T, MAVROMATIS K, VORGIAS C E, et al. Cloning, sequences, and characterization of two chitinase genes from the Antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: Isolation and partial characterization of the enzymes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1 773-1 779.
- [14] DONG Hui-zhong, WANG Yao-song, ZHAO Li-ming, et al. Key Technologies of enzymatic preparation for DP 6~8 chitooligosaccharides[J]. *J Food Eng*, 2015, 38(4): 336-344.
- [15] 李静, 赵祥颖, 刘建军. 微生物几丁质酶及其在食品领域的应用[J]. *食品工程*, 2006, 34(1): 47-48.
LI Jing, ZHAO Xiang-ying, LIU Jian-jun. The review of microbial chitinase and its application in food field[J]. *Food Engineering*, 2006, 34(1): 47-48.
- [16] 陈三凤, 李季伦. 黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) 几丁质酶的纯化和性质[J]. *微生物学报*, 2005, 26(2): 14-19.
CHEN San-feng, LI Ji-lun. Purification and properties of chitinase from *Flavobacterium* sp[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 26 (2): 14-19.
- [17] 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 等. 桑氏链霉菌几丁质酶 ChiKJ40 基因的克隆表达及其抑菌作用[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(5): 1 016-1 026.
ZHANG Bo-yang, ZHU Tian-hui, HAN Shan, et al. Cloning, expression and antibacterial functions of Chi KJ40, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii* [J]. *Microbiology China*, 2018, 45 (5): 1 016-1 026.
- [18] LI Shu-jiang, ZHANG Bo-yang, ZHU Han-ming-yue, et al. Cloning and expression of the chitinase encoded by ChiKJ406136 from *Streptomyces sampsonii* (Millard & Burr) Waksman KJ40 and its antifungal effect[J]. *Forests*, 2018, 9(11): 699-717.
- [19] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5 259): 680-685.
- [20] 连明珠. 南极 *Pseudoalteromonas* sp. AC444 低温几丁质酶性质分析与基因克隆及普里兹湾深海沉积物中几丁质酶基因多样性研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2006: 28.
LIAN Ming-zhu. Characterization and gene clone of cold-active chitinase from the *Pseudoalteromonas* sp. AC444 and chitinase diversity in deep sea sediment of Prydz Bay, Antarctic[D]. Xiamen: Xiamen University, 2006: 28.
- [21] 张学英, 黄忠意, 章发盛. 两种检测还原糖方法的比较[J]. *食品与机械*, 2017, 33(2): 66-69.
ZHANG Xue-ying, HUANG Zhong-yi, ZHANG Fa-sheng. Comparative study on two methods for sugar detection in Jerusalem artichoke[J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(2): 66-69.
- [22] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3 381-3 385.
- [23] 郝俊尧, 马富强, 杨广宇. 产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. KS-85 来源肌酸酶活性中心的关键氨基酸功能研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 37(3): 1-9.
HAO Jun-yao, MA Fu-qiang, YANG Guang-yu. Functional analysis of key residues in the active center of creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 37(3): 1-9.
- [24] CAI Wen-xuan, LI Sha, ZHOU Jia-wei, et al. Functional analysis of active site residues of *Bacillus thuringiensis* WB7 chitinase by site-directed mutagenesis[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2009, 25(12): 2 147-2 155.
- [25] SYNSTAD B, GASEIDNES S, VAN AALDEN D M F, et al. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(2): 253-262.
- [26] DUHMEKLAIR A. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution[J]. *Structure*, 1994, 2(12): 1 169-1 180.
- [27] VAAJE-KOLSTAD G, HOUSTON D R, RAO F V, et al. Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin[J]. *Bba-Proteins Proteom*, 2004, 1 696(1): 103-111.
- [28] NI Hong, ZENG Si-quan, QIN Xiao-wei, et al. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2015, 11(3): 304-315.

- 展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(12): 144-157.
XU Yu-juan, CHENG Li-nua, BU Zhi-bin, et al. Research progress in preservation and processing of Lingnan characteristic fruits[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(12): 144-157.
- [3] ZHU Xiang-rong, WANG Hui, SUN Jian, et al. Pericarp and seed of litchi and longan fruits: Constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2019, 20(6): 503-512.
- [4] 张林泉, 龚丽, 苏建. 荔枝果肉果汁深加工前处理工艺及设备[J]. 食品与机械, 2005, 21(2): 44-45.
ZHANG Lin-quan, GONG Li, SU Jian. Technology and equipment of pulp and syrup of litchi pretreatment before deep processing[J]. Food & Machinery, 2005, 21(2): 44-45.
- [5] 卿艳梅, 李长友, 曾山. 龙眼柔性对辊剥壳机设计与试验[J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 126-132.
QING Yan-mei, LI Chang-you, ZENG Shan. Design and experiment of longan flexible counter roll sheller[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 126-132.
- [6] 齐文娥, 陈厚彬, 彭朵芬, 等. 中国龙眼产业发展现状、问题与对策建议[J]. 广东农业科学, 2016, 43(8): 169-174.
QI Wen-e, CHEN Hou-bin, PENG Duo-fen, et al. Development status, problems and countermeasures of longan industry in China[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(8): 169-174.
- [7] 罗建东, 闫军威. 龙眼剥壳机的设计简介[J]. 食品与机械, 2005, 21(5): 28-29.
LUO Jian-dong, YAN Jun-wei. A brief introduction to the designing of the longan rind machine[J]. Food & Machinery 2005, 21(5): 28-29.
- [8] 康宁波, 尚梦玉, 何建国, 等. 链式气动冲切自动化干红枣去核机设计[J]. 农业工程学报, 2018, 34(22): 19-26.
KANG Ning-bo, SHANG Meng-yu, HE Jian-guo, et al. Design of chained pneumatic punching automatic dried jujube pit removing machine[J]. Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering, 2018, 34(22): 19-26.
- [9] 王华, 张剑锋. 基于单片机控制的大枣去核机设计与试验[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 115-118.
WANG Hua, ZHANG Jian-feng. Design and experimental research of jujube core-removing machine base[J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 115-118.
- [10] 刘奎, 杨莉玲, 朱占江, 等. 连续式杏果去核机设计[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 113-116.
LIU Kui, YANG Li-ling, ZHU Zhan-jiang, et al. Structure design of the continuous apricot pit removing machine[J]. Food & Machinery, 2019, 35(2): 113-116.
- [11] 李长友, 马兴灶, 程红胜, 等. 荔枝定向去核剥壳机设计与试验[J]. 农业机械学报, 2014, 45(8): 93-100.
LI Chang-you, MA Xing-zao, CHENG Hong-sheng, et al. Design and experiment of litchi denucleating and decorticating machine[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(8): 93-100.
- [12] 谢海军, 卿艳梅, 郑丁科, 等. 气动式龙眼去核装置的设计与试验[J]. 农业工程学报, 2006(7): 211-213.
XIE Hai-jun, QING Yan-mei, ZHENG Ding-ke, et al. Design and experiment of a longan core-removing mechanism[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006(7): 211-213.
- [13] 叶石华. 全自动灯笼桂圆肉加工设备的研制[J]. 农业技术与装备, 2020(5): 38-41.
YE Shi-hua. Development of automatic longan meat processing equipment[J]. Agricultural Technology and Equipment, 2020(5): 38-41.
- [14] 罗建东. 一种龙眼去核机: CN 108902995 A[P]. 2018-11-30.
LUO Jian-dong. A longan kernel removing machine: CN 108902995 A[P]. 2018-11-30.
- [15] 林通. 龙眼去核机: CN 211721792 U[P]. 2020-10-23.
LING Tong. Longan kernel removing machine: CN 211721792 U[P]. 2020-10-23.
- [16] LI Cheng-han, HSU Yu-ting, HSIEH Chun-hung, et al. A novel semiautomatic flesh peeling and seed removing mechanism for dried longan[J]. Agriculture, 2021, 11: 48-59.
- [17] 汪懋华. 把握实施乡村振兴战略机遇推动广东荔枝产业创新发展[J]. 现代农业装备, 2018(4): 17-21.
WANG Mao-hua. Grasp the opportunity of implementing the rural revitalization strategy to promote the innovation and development of litchi industry in Guangdong province[J]. Modern Agricultural Equipment, 2018(4): 17-21.
- [18] 卿艳梅, 李长友, 曹玉华, 等. 龙眼力学参数的测试分析[J]. 农业机械学报, 2010, 41(8): 131-134.
QING Yan-mei, LI Chang-you, CAO Yu-hua, et al. Test and analyse on macromechanic parameters of longan[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(8): 131-134.
-
- (上接第 7 页)
- [29] SUGINTA W, SRITHO N. Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by vibrio harveyi chitinase A[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2012, 76(12): 2 275-2 281.
- [30] 王晓辉, 曹洪玉, 张庆芳, 等. 低温几丁质酶 chiA 基因克隆、同源建模及序列分析[J]. 大连大学学报, 2015, 36(6): 60-65.
WANG Xiao-hui, CAO Hong-yu, ZHANG Qing-fang, et al. Cloning, homology modeling and sequence analysis of cold-adapted chiA[J]. Journal of Dalian University, 2015, 36(6): 60-65.
- [31] RAO V P, KRISHNA M M, NARAYAN D S, et al. Applicability of endochitinase of Flavobacterium johnsoniae with transglycosylation activity in generating long-chain chitoooligosaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 40(117): 62-71.