



低温几丁质酶基因在乳酸克鲁维酵母中的重组表达及酶学性质表征

陈立功^{1,2}, 张庆芳^{1,2}, 迟乃玉^{1,2}, 王晓辉^{1,2*}

¹ 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622

² 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622

摘要: 【目的】通过构建假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. DL-6)低温几丁质酶(chitinase A, chiA; chitinase C, chiC)的重组乳酸克鲁维酵母菌株、纯化重组蛋白并对其进行酶学性质表征, 为低温几丁质酶潜在工业化生产几丁寡糖奠定理论基础。【方法】人工合成密码子优化的几丁质酶基因, 构建重组乳酸克鲁维酵母表达质粒(pKLAC1-chiA、pKLAC1-chiC)并用电脉冲法转化到乳酸克鲁维酵母中, 实现低温几丁质酶的可溶表达。利用镍柱亲和层析纯化得到高纯度的重组几丁质酶。【结果】成功构建产低温几丁质酶的重组乳酸克鲁维酵母并纯化获得高纯度的重组几丁质酶。经 SDS-PAGE 分析在 110 kDa 与 90 kDa 附近出现符合预期大小的蛋白条带。铁氰化钾法测得 ChiA 和 ChiC 的酶活分别为 51.45 U/mg 与 108.56 U/mg。最适反应温度分别为 20 °C 和 30 °C, 最适 pH 分别为 8.0 和 9.0。在低于 40 °C, pH 8.0–12.0 时, ChiA 和 ChiC 重组酶较稳定。ChiA 和 ChiC 对胶体几丁质以及粉状底物 α -几丁质与 β -几丁质具有明显的降解活性, 且具有一定协同降解能力。【结论】首次实现假交替单胞菌来源的低温几丁质酶在乳酸克鲁维酵母中的重组表达、纯化、酶学性质及其降解产物分析, 为其他低温几丁质酶的研究提供借鉴意义。

关键词: 低温几丁质酶, 乳酸克鲁维酵母, 纯化, 酶学性质

几丁质(chitin)又称甲壳素, 是海洋中含量最高的多糖物质, 是由 N-乙酰氨基葡萄糖单糖通过 β -(1 \rightarrow 4)糖苷键连接而成的结构同多糖^[1]。它是虾、蟹壳的成分, 同时存在于真菌细胞壁、昆虫外骨

骼、节肢动物外壳以及一些绿藻中, 主要是作为支撑身体骨架以及对身体起保护的作用^[2–4]。几丁质降解产生的几丁寡糖及几丁单糖具有促进有益微生物生长、诱导植物的抗病性、免疫抗菌及增

基金项目: 国家自然科学基金(31500039); 辽宁省博士启动基金指导计划(20170520167); 大连市青年科技之星项目(2017RQ155); 大连大学博士专项基金(2017QL020); 辽宁省自然科学基金(20180550728)

*通信作者。E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-25; 修回日期: 2019-06-19; 网络出版日期: 2019-11-12

进钙及矿物质的吸收等作用,广泛地应用于农业、食品、化工、能源、环保、医药等领域^[5-6]。

几丁质酶(chitinase, EC 3.2.1.14)是专一降解几丁质生成几丁寡糖或单糖的一类酶的总称^[7]。根据其水解模式不同分为外切几丁质酶和内切几丁质酶,内切几丁质酶水解几丁质长链生成几丁寡糖;外切几丁质酶一般又分为几丁二糖酶和 β -N-乙酰己糖胺酶。几丁二糖酶水解几丁质长链的一端生成N-乙酰氨基葡萄糖二聚体, β -N-乙酰己糖胺酶则可水解几丁质长链的一端或N-乙酰葡萄糖胺二聚体生成N-乙酰氨基葡萄糖^[8-9]。几丁质酶存在于各种生物体中,如细菌、真菌、放线菌、酵母、植物、动物以及人类。海洋微生物产生的低温酶由于其特殊的晶体结构使其比中温酶、高温酶更有优势。该酶具有低温下高酶活力及高催化效率、结构高效柔顺性和热不稳定性(经过温和的热处理,在不影响产品品质的情况下即可使低温酶的活力丧失)等生物学特性^[10-11]。根据嗜冷菌 *Moritella marina* 几丁质酶(MmChi60)晶体结构的报道^[12-13],低温几丁质酶与大多数几丁质酶只有催化域与1个几丁质结合结构域不同,都包含多个几丁质结合结构域,且具有免疫球蛋白结构等特殊的结构。MmChi60 几丁质结合域和催化域的颜色氨酸补丁紧密联系底物几丁质与蛋白活性位点的结合;在几丁质结合域和相邻近的免疫球蛋白结构域之间的灵活区域利于酶与底物表面的结合,同时开放的、较浅的底物结合槽使底物更容易接触酶活性位点;两个长的免疫球蛋白结构域保证该酶与几丁质的更大接触与粘附。这些独特结构更利于蛋白在低温条件下结合不溶晶体底物,促进酶的水解,提高底物的转化效率。

课题组前期从假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. DL-6)中克隆了 *chiA* 与 *chiC*,并在大肠杆菌中

表达纯化,研究其功能^[14-15]。但大肠杆菌表达体系虽然目的基因表达量高,却存在产物主要集中在细胞内、后续的分离纯化困难等问题^[16-17]。本文拟构建低温几丁质酶乳酸克鲁维酵母表达菌株,该菌株营养要求简单、生长温度适应范围广(25–46 °C)、不产生内毒素和对人类安全;且该表达体系可实现蛋白胞外表达,具有分泌蛋白能力强、自身分泌的蛋白非常少、易于后期分离纯化等优点^[18-19]。

本实验研究了海洋细菌来源的低温几丁质酶在乳酸克鲁维酵母中的重组表达,通过分离纯化获得高纯度的重组酶,并初步分析其酶学性质,为研究乳酸克鲁维表达系统生产低温几丁质酶及工业化生产几丁寡糖奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物:大肠杆菌JM109、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis* GG799, *K. lactis* GG799)和*K. lactis* GG799/pKLAC2(空载)由实验室保存;pMD19-T Simple Vector购自TaKaRa公司;pKLAC2购自New England Biolabs公司。本研究中所用的引物及其序列见表1。

1.1.2 培养基:大肠杆菌生长于37 °C的LB培养基(胰蛋白胨1%,氯化钠1%,酵母提取物0.5%),pH 7.2–7.4,必要时加入100 μ g/mL的氨苄青霉素。乳酸克鲁维酵母生长于30 °C的YPD培养基(胰蛋白胨2%,酵母提取物1%,葡萄糖2%),电转化后用含有5 mmol/L乙酰胺的YCB培养基来筛选^[20]。

1.1.3 工具酶和主要生化试剂:限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 及T4 DNA连接酶、氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase、PCR产物纯化试剂盒、

表1. 引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>opt-chiA</i> -F	CCGCTCGAGAAAAGAATGTCCTCCAGAAAGATC
<i>opt-chiA</i> -R	CCCGAATTCTTACAAGGTCCAGTCTGCTGTAAC
<i>opt-chiC</i> -F	CCGCTCGAGAAAAGAATGTCCTCCAGAAAGATC
<i>opt-chiC</i> -R	CCCGAATTCTTACAAGGTCCAGTCTGCTGTAAC
Primer 1	ACACACGTAAACGCGCTCGGT
Primer 2	ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒等购自TaKaRa公司; *Sac* II、乳酸克鲁维蛋白提取试剂盒、YPGal培养基与酵母基础碳源(YCB)等购自New England Biolabs公司; 根据参考文献方法制备胶体几丁质(colloidal chitin)和 β 型几丁质纳米须^[21]; 酵母提取物和胰蛋白胨购自Oxoid公司; 其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 几丁质酶基因密码子的优化及合成

根据低温几丁质酶 *chiA* (GenBank No. KF234015)及*chiC* (GenBank No. KF234017)基因序列以及乳酸克鲁维酵母密码子偏好性, 去除信号肽序列, 使用GeneOptimizer软件对基因成熟肽核苷酸序列进行密码子优化, 得到新的基因序列 *chiA* (GenBank No. MK635352)及*chiC* (GenBank No. MK635353)。将优化好的基因序列送苏州泓迅生物科技股份有限公司。

以密码子优化后*opt-chiA*与*opt-chiC*的基因序列为模板, 利用Primer 5.0软件, 优化PCR引物参数, 设计添加*Xho* I和*EcoR* I限制性酶切位点和保护碱基的引物(见表1)。通过TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase进行PCR扩增不含有信号肽的成熟目的片段, 在C端引入了6×His亲和纯化标签。PCR反应条件为: 98 °C 1 min, 1个循环; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 3 min, 30个循环; 72 °C 10 min, 1个循环。将PCR产物纯化回收连接到pMD19-T载

体后转化大肠杆菌JM109感受态细胞, 接种至氨苄抗性LB培养基中筛选阳性转化子, 提取质粒用*Xho* I和*EcoR* I酶切验证。将验证正确的阳性克隆送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 重组质粒pKLAC2-*chiA*及pKLAC2-*chiC*的构建

测序结果正确的质粒 pMD19-T-*chiA* 与 pMD19-T-*chiC*, 经限制性内切酶 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后与相同酶切后的载体 pKLAC2 相连, 转入 *E. coli* JM109, 涂布氨苄抗性平板, 挑转化子, 提取质粒, 经 *Xho* I / *EcoR* I 双酶切验证, 得到构建成功的重组表达质粒 pKLAC2-*chiA* 与 pKLAC2-*chiC*。

1.4 转化子的筛选与验证

通过 *Sac* II 酶切重组质粒 pKLAC2-*chiA* 与 pKLAC2-*chiC*, 得到线性化DNA后电转 *K. lactis* GG799, 涂布YCB平板, 于30 °C恒温培养箱培养4 d后得到单菌落, 挑取转化子在YPD平板上纯化, 30 °C培养2 d。

挑取单菌落, 接入3 mL YPD液体培养基中, 30 °C、200 r/min培养过夜, 室温下3000×g离心5 min收集菌体, 提取基因组作为PCR反应的模板, 利用鉴定引物Primer 1/Primer 2进行PCR扩增, 筛选出发生同源重组的转化子。PCR扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min,

30个循环; 72 °C 10 min。

1.5 重组蛋白的表达与纯化

将筛选得到的重组菌*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiA*、*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiC*和*K. lactis* GG799/pKLAC2接种于50 mL液体YPD培养基中, 30 °C、200 r/min培养5 d, 将发酵液于10000×g离心30 min, 收集上清。利用Ni-NTA柱亲和纯化蛋白。利用SDS-PAGE检测纯化蛋白的纯度及分子量。按照BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)测定蛋白质含量。

1.6 重组蛋白的酶活测定

酶液0.1 mL与0.9 mL 1%胶体几丁质混合, 30 °C下保温30 min后, 反应混合物沸水浴中10 min终止反应, 10000×g离心5 min, 取上清0.5 mL, 加入1 mL Schales'试剂, 沸水浴10 min, 测定 OD_{420} , 设3个重复, 取平均值, 根据N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准曲线计算酶活力。酶活单位定义(U): 在上述条件下, 1 min催化产生相当于1 μ mol N-乙酰-D-氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量^[22]。

1.7 酶学性质的确定

1.7.1 最适温度和温度稳定性: 为了研究温度对低温几丁质酶ChiA与ChiC的影响, 在50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中, 4–70 °C温度下测定其活性。以酶活最大值为100%, 根据酶在不同温度下的相对活性绘制曲线, 确定酶的最适反应温度。同时, 将ChiA与ChiC酶液分别置于不同温度(4–70 °C)下保温1 h, 然后在最适反应pH和最适反应温度下检测残余酶活, 与未经过处理的酶液进行比较, 计算相对活性。

1.7.2 最适pH和pH稳定性: 在最适温度下, pH值为3.0–12.0的50 mmol/L缓冲液(pH 3.0–5.0

phosphate-citrate, pH 6.0–10.0 Tris-HCl, pH 11.0–12.0 Na_2HPO_4 -NaOH)中测定纯化蛋白ChiA与ChiC的酶活, 以酶活最大值为100%, 根据酶在不同pH值下的相对活性绘制曲线, 确定酶的最适反应pH值。同时, 将ChiA与ChiC酶液分别置于50 mmol/L不同pH的缓冲液(pH 3.0–5.0 phosphate-citrate, pH 6.0–10.0 Tris-HCl, pH 11.0–12.0 Na_2HPO_4 -NaOH)中, 20 °C下放置1 h, 然后在最适反应pH和最适反应温度下检测残余酶活, 与未经过处理的酶液进行比较, 计算相对活性。

1.8 ChiA与ChiC协同降解晶体底物的产物分析

利用高效液相色谱(HPLC)检测几丁质酶系协同降解几丁质的效率^[23]。1 mL反应体系: 1 μ mol/L ChiA或ChiC、或1 μ mol/L (ChiA+ChiC), 1 mg/mL胶体几丁质; 5 mL反应体系: 5 μ mol/L ChiA或ChiC、或5 μ mol/L (ChiA+ChiC), 2 mg/mL粉状 α 型几丁质与 β 型几丁质, 30 °C下温育, 不同时间点(0、2、4、6、8、10、24 h)加入等体积70%乙腈终止反应, 反应产物经0.22 μ m滤膜过滤后HPLC分析检测。

2 结果和分析

2.1 目的基因的合成

在氨基酸序列不变的前提下, 根据乳酸克鲁维酵母密码子的偏好性, 改造了*chiA*和*chiC*基因序列的790和630个位点, 设计了全长3159 bp的*chiA*成熟蛋白编码序列, 编码1053个氨基酸, 理论分子质量为113.54 kDa。设计了全长2628 bp的*chiC*成熟蛋白编码序列, 编码876个氨基酸, 理论分子质量为92.66 kDa。基因片段电泳结果如图1所示, 与预期大小一致。

2.2 重组质粒pKLAC2-*chiA*及pKLAC2-*chiC*的构建

提取构建的质粒,经*Xho* I 和*Eco*R I 双酶切验证,如图2所示,pKLAC2的大小为9107 bp,目的基因的大小分别为3159 bp和2628 bp,与预期片段大小相同。将验证正确的阳性克隆送到生物工程(上海)股份有限公司测序。

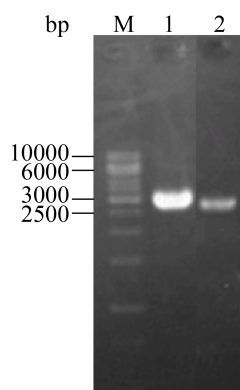


图1. *chiA*、*chiC*基因电泳结果

Figure 1. *chiA* and *chiC* gene electrophoresis results. M: 10000 bp DNA marker; lane 1: *chiA* gene; lane 2: *chiC* gene.

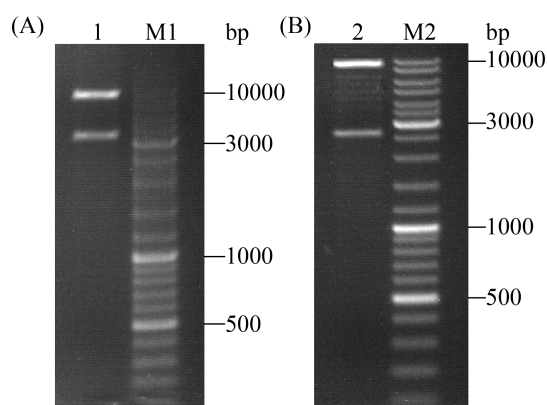


图2. 重组表达质粒pKLAC2-*chiA*及pKLAC2-*chiC*的酶切鉴定

Figure 2. The enzymatic digestion of pKLAC2-*chiA* and pKLAC2-*chiC*. Lane M1: 10 kb DNA marker; lane 1: Plasmid pKLAC2-*chiA* digested by *Xho* I and *Eco*R I; lane 2: Plasmid pKLAC2-*chiC* digested by *Xho* I and *Eco*R I; lane M2: 10 kb DNA marker.

2.3 *K. lactis* GG799转化子的筛选与验证

挑取转化子,以其基因组作为模板(图3),使用鉴定引物Primer 1/Primer 2进行PCR鉴定,挑选出的菌落均能扩增出约2.4 kb的条带,结果如图4所示,筛选到发生同源重组的转化子,说明目的基因已重组到酵母基因组中。

2.4 重组蛋白的表达纯化与酶活检测

将*K. lactis* GG799/pKLAC2和重组菌株*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiA*、*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiC*在YPD培养基中,30 °C、200 r/min培养48 h后离心取上清液经Ni-NTA柱纯化,如图5与图6所示。重组菌株发酵液上清与重组菌*K. lactis*/pKLAC2相比,重组菌*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiA*、*K. lactis* GG799/pKLAC2-*chiC*经纯化后在110 kDa和90 kDa附近可见单一蛋白条带,说明在ChiA和ChiC在*K. lactis* GG799中得到有效的分泌表达。纯化蛋白ChiA与ChiC的蛋白浓度分别为1.26 mg/mL与1.48 mg/mL,酶活力分别为51.45 U/mg与108.56 U/mg。

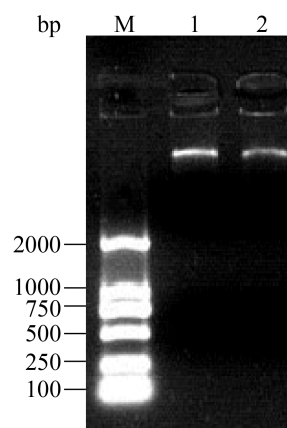


图3. 酵母转化子提取的基因组DNA

Figure 3. Genomic DNA extracted from yeast transformants. M: D2000 DNA marker; lane 1-2: Genomic DNA of yeast transformant.

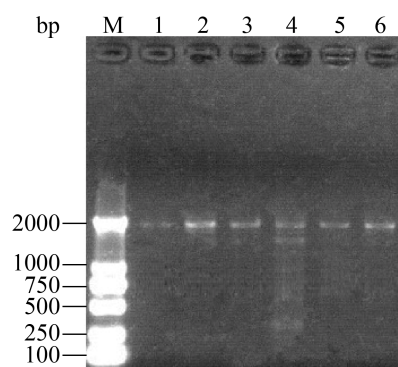


图4. 酵母转化子PCR鉴定

Figure 4. PCR identification of yeast transformants. M: D2000 DNA marker; lane 1–6: PCR products of yeast transformants.

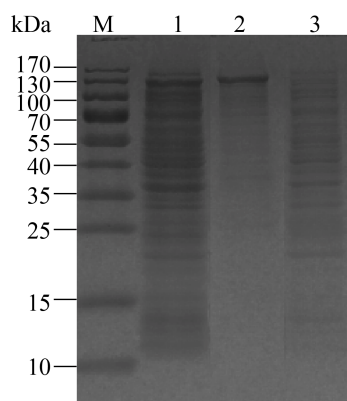


图 5. 重组菌 *K. lactis*/pKLAC2-*chiA* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 5. The SDS-PAGE analysis of expression product of ChiA in recombinant strain. M: Standard protein marker; lane 1: fermentation supernatant of recombinant strain; lane 2: purification of ChiA; lane 3: *K. lactis*/pKLAC2.

2.5 重组低温几丁质酶酶学性质分析

2.5.1 ChiA 酶学性质分析: (1) 最适反应温度测定。由图 7-A 可知, ChiA 在 10–40 °C 温度内有较高酶活, 达到 80%以上, 最适反应温度为 20 °C, 在 4 °C 时酶活在 60%以上; 在 40–70 °C 温度内, 随着温度的升高酶活力降低, 且在 50 °C 时酶活力骤降, 为最适温度下酶活的 50%左右。

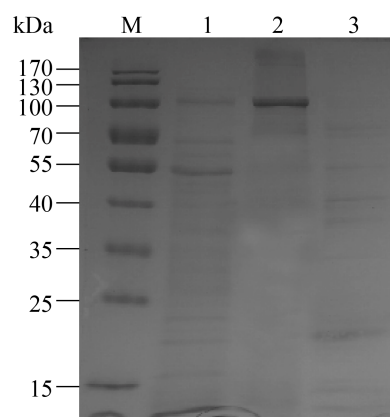


图 6. 重组菌 *K. lactis*/pKLAC2-*chiC* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 6. The SDS-PAGE analysis of expression product of ChiC in recombinant strain. M: Standard protein marker; lane 1: fermentation supernatant of recombinant strain; lane 2: purification of chiC; lane 3: *K. lactis*/pKLAC2.

(2) 热稳定性分析。由图7-B可知, ChiA在低于30 °C的环境下具有较好的热稳定性, 经过温育1 h处理后, 酶活仍保留80%以上, 且在20 °C时稳定性最好; 经高于40 °C温育处理后, 酶活下降, 但仍剩余50%以上, 说明ChiA有较好的热稳定性。

(3) 最适pH测定。由图7-C可知, ChiA在pH 8.0–9.0环境下酶活性很高, 达到95%以上, 反应的最适pH为8.0; 当pH小于8.0或大于9.0时, 酶活急剧下降, pH为7.0时, 酶活下降至60%, 在pH为3.0–6.0时酶活力低于40%; pH为10.0时, 酶活力下降至70%左右, pH为12.0时, 酶活低于40%, ChiA较为适合在偏碱性pH范围内作用。

(4) pH稳定性分析。由图7-D可知, ChiA在pH 8.0–12.0间剩余酶活力在70%以上较为稳定, 当pH为7.0时, 相对酶活力剩余60%, pH低于6.0时, 相对酶活力剩余不足40%。所以ChiA适合保存在偏碱性的环境中。

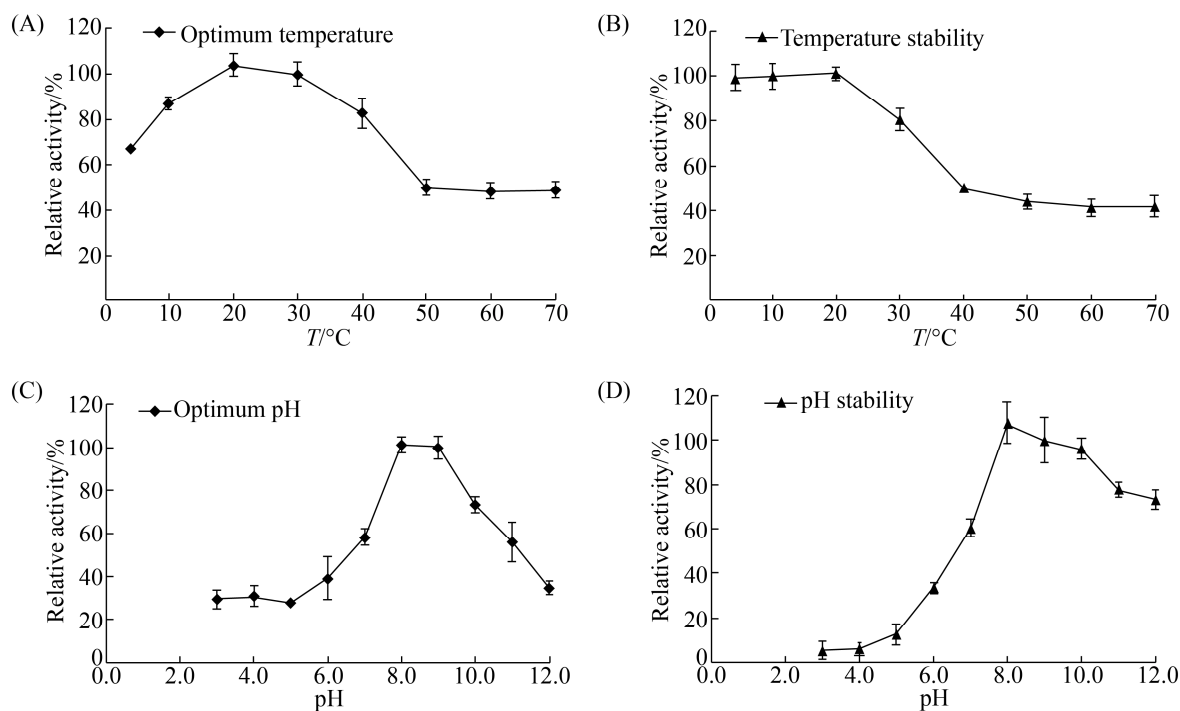


图7. 温度(A)、酶的热稳定性(B)、pH(C)、pH稳定性(D)对重组ChiA活力的影响

Figure 7. Effect of reaction temperature (A), thermal stability of the enzyme (B), pH (C) and pH stability of the enzyme (D) on ChiA enzymes activity.

2.5.2 ChiC酶学性质分析: (1) 最适反应温度测定。由图8-A可知, ChiC最适反应温度为30 °C, 在4–30 °C温度内, 随着温度的升高酶活力提高, 且在4 °C时酶活接近80%; 在30–70 °C温度内, 随着温度的升高酶活力降低, 且在50 °C时酶活力骤降, 70 °C时酶活最低, 为最适温度下酶活的60%左右。

(2) 热稳定性分析。由图8-B可知, ChiC在低于50 °C环境下具有较好的热稳定性, 经过温育1 h处理后, 酶活仍保留70%以上, 且在10 °C时稳定性最好; 经70 °C处理后, 剩余酶活最少, 但仍保留50%以上, 说明ChiC有很好的热稳定性。

(3) 最适pH测定。由图8-C可知, ChiC在pH 8.0–9.0环境下酶活性很高, 达到80%以上, 反应的最适pH为9.0; 在pH为3.0–6.0时酶活力剩余

30%; 在pH为10.0时, 酶活达到70%以上, pH大于10.0时, 酶活力急剧下降, 酶活力剩余不足40%, 该重组酶较为适合在中性和偏碱性pH范围内作用。

(4) pH稳定性分析。由图8-D可知, ChiC在pH 8.0–12.0间剩余酶活力在70%以上较为稳定, 当pH为7.0时, 相对酶活力剩余不足50%, pH低于6.0时, 相对酶活力剩余不足20%。所以ChiC适合保存在偏碱性的环境中。

2.6 ChiA与ChiC协同降解晶体底物的产物分析

利用高效液相色谱(HPLC)分析 ChiA 与 ChiC 协同降解底物 α -几丁质、 β -几丁质、胶体几丁质, 结果如图 9 所示。

由图 9-A 可知, ChiA 和 ChiC 都可单独降解胶体几丁质, 且 ChiC 降解能力高于 ChiA; 24 h

降解胶体几丁质生成的(GlcNAc)₂的含量 ChiC 为 ChiA 的 1.3 倍; ChiA 和 ChiC 协同降解胶体几丁质的效率明显高于 ChiA 或 ChiC 单独降解, 24 h 降解生成(GlcNAc)₂的含量分别为 ChiA 和 ChiC 产量的 3.0 倍和 2.3 倍。

由图 9-B 可知, ChiA 和 ChiC 都可单独降解 α -几丁质, ChiC 的降解能力高于 ChiA, 24 h 时 ChiC 降解 α -几丁质生成的(GlcNAc)₂含量是 ChiA 的 8.6 倍; ChiA 和 ChiC 协同降解 α -几丁质的效率明显高于 ChiA 或 ChiC 单独水解, 24 h 时降解生成的(GlcNAc)₂的含量分别为 ChiA 和 ChiC 降解产量的 19.0 倍和 2.2 倍。

由图 9-C 可知, ChiA 和 ChiC 都可单独降解 β -几丁质, 且 ChiC 对 β -几丁质的降解能力明显高于 ChiA; 24 h 时, ChiC 水解 β -几丁质生成的(GlcNAc)₂含量是 ChiA 的 3.0 倍; ChiA 和 ChiC

协同降解 β -几丁质的效率明显高于 ChiA 或 ChiC 单独降解, 24 h 时降解生成的 (GlcNAc)₂ 的含量分别为 ChiA 和 ChiC 产量的 4.8 倍和 1.6 倍。

由图 9-A、9-B、9-C 对比可知, 同菌株来源的 ChiA 和 ChiC 表现协同降解底物 α -几丁质、 β -几丁质和胶体几丁质作用, 对协同降解胶体几丁质效果最显著, 而酶解晶体底物 α -几丁质效果强于 β -几丁质。ChiA、ChiC、ChiA+ChiC 对胶体几丁质的降解效率明显高于 α -几丁质或 β -几丁质。24 h 时, ChiA 降解 β -几丁质生成几丁二糖为 16.0 mg/mL, 而降解 α -几丁质生成(GlcNAc)₂的产量仅为 4.3 mg/mL; ChiC 降解 β -几丁质生成几丁二糖为 48.3 mg/mL, 而降解 α -几丁质生成(GlcNAc)₂的产量为 36.7 mg/mL, 说明 ChiA 和 ChiC 对 β -几丁质的降解效率高与 α -几丁质, 推测这可能与 β -几丁质的结构有关, 与 α -几丁质相比, β -几丁质结构相对松散粗糙。

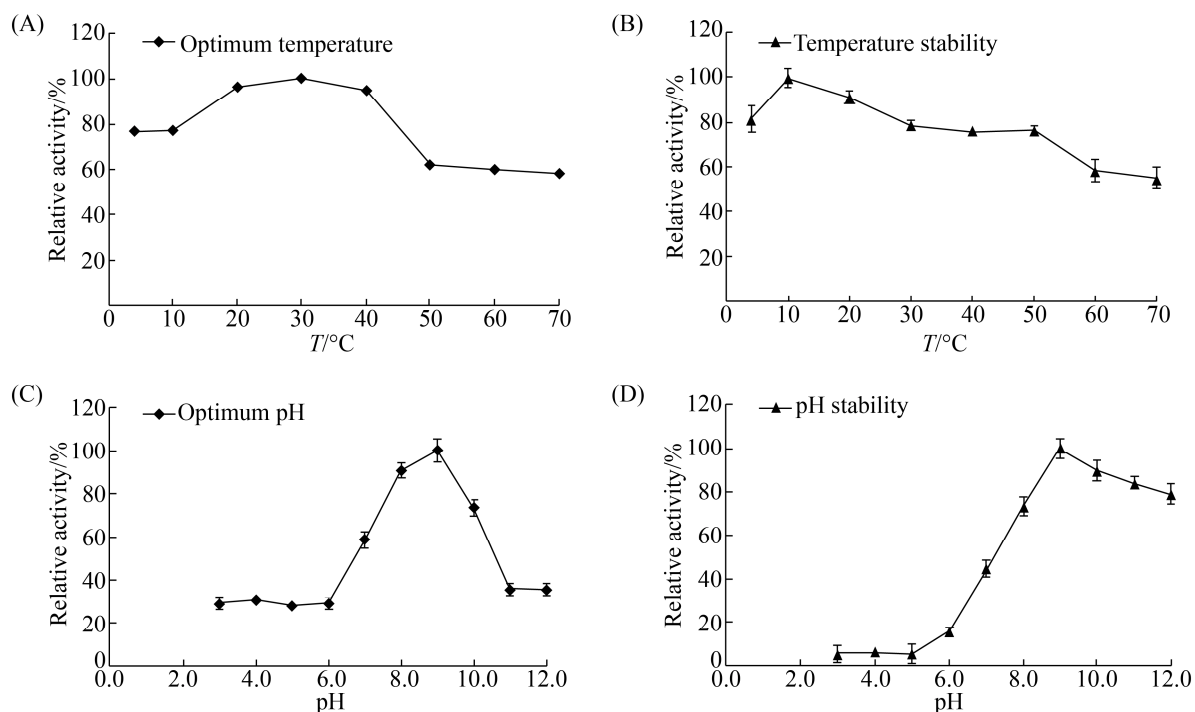


图8. 温度(A)、酶的热稳定性(B)、pH(C)、pH稳定性(D)对重组ChiC活力的影响

Figure 8. Effect of reaction temperature (A), thermal stability of the enzyme (B), pH (C) and pH stability of the enzyme (D) on ChiC enzymes activity.

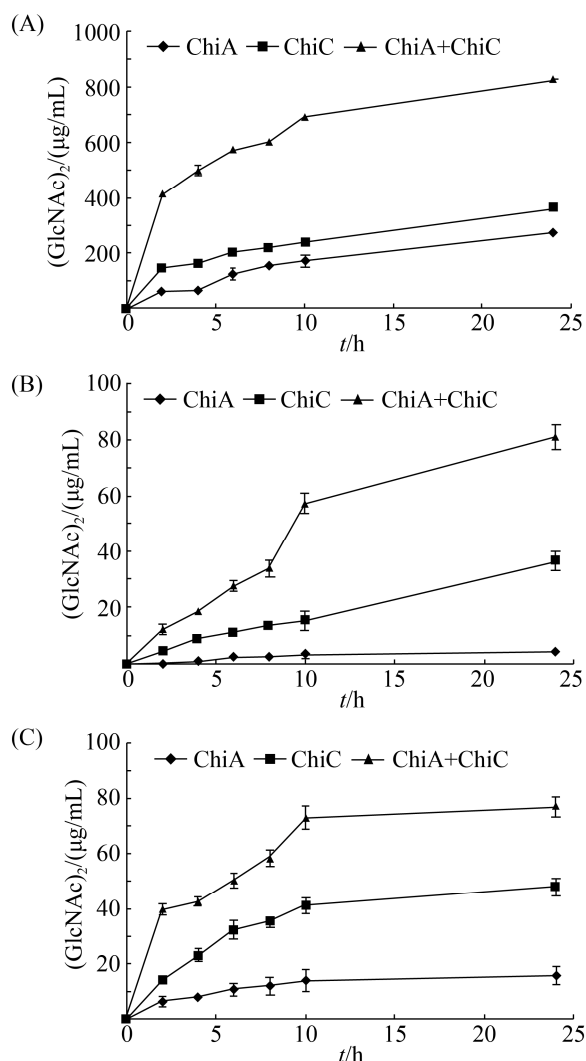


图 9. ChiA、ChiC 或 ChiA+ChiC 与胶体几丁质(A)、 α -几丁质(B)、 β -几丁质(C)在 24 h 时间内反应生成 (GlcNAc)₂

Figure 9. Formation of (GlcNAc)₂ in reaction with ChiA, ChiC or ChiA+ChiC on the substrates of colloidal chitin (A), α -chitin (B) and β -chitin (C) during a time course of 24 h. The data were expressed as the mean \pm SD for triplicates.

3 讨论

几丁质酶能够降解几丁质产生几丁寡糖及几丁单糖, 由于其免疫抗菌等特性被广泛应用于各个领域。野生菌产生的几丁质酶品质及产量太低,

分离纯化困难, 使得高纯度几丁质酶的工业化很难实现, 需通过构建工程菌表达高品质的几丁质酶, 满足生产需要。实验室前期将ChiA、ChiC在大肠杆菌中表达纯化, 但是由于大肠杆菌生长温度为37 °C, 较高的温度会使低温几丁质酶更容易变性失活; 而且大肠杆菌表达体系为胞内表达, 进行细胞破碎后才能获得重组蛋白, 分离纯化较为困难; 且超声破碎细胞的方法及其产生的高温会对目的蛋白的结构造成影响, 破碎过程中需要降温, 增加了生产成本。

本实验通过乳酸克鲁维酵母表达体系成功表达低温几丁质酶chiA和chiC, 且两种酶都表现出大肠杆菌表达体系具有的低温、耐碱及降解粉状底物的特性^[14-15]。此外乳酸克鲁维酵母表达的目的蛋白被分泌到细胞外, 无需进行细胞破碎, 易于目的蛋白的分离和纯化, 降低了生产成本。另外, *K. lactis*是经过FDA GRAS认证的食品安全级微生物^[24-25], 可添加到食品当中, 使其表达的蛋白可以广泛地应用于食品及医药领域。

本研究经密码子优化后, 成功构建了几丁质酶乳酸克鲁维酵母表达载体, 对获得的重组蛋白进行纯化及其酶学性质分析, 为低温几丁质酶工业化生产几丁寡糖提供理论参考, 并为该酶的规模化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] Gao L, Sun JN, Secundo F, Gao X, Xue CH, Mao XZ. Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414. *Food Chemistry*, 2018, 261: 329–336.
- [2] Essghaier B, Hedi A, Bejjani M, Jijakli H, Boudabous A, Sadfi-Zouaoui N. Characterization of a novel chitinase from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus marismortui* strain M3-23. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(2): 835–841.

- [3] Tang W, Li YH, Liu L, Zhang JX, Xian HQ. Characterization and production optimization of a chitinase (Tachi1) from *Trichoderma asperellum* in recombinant *Pichia Pastoris* expression system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 345–352. (in Chinese)
汤伟, 李雅华, 刘露, 张军霞, 咸洪泉. 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. *微生物学报*, 2012, 52(3): 345–352.
- [4] DasSarma S, Capes MD, Karan R, DasSarma P. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58587.
- [5] Xiao JH, Li MY, Sun M, Wang XH. Cloning and expression of a novel chitinase gene and the analysis of its hydrolysis products. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2179–2186. (in Chinese)
肖景惠, 李美玉, 孙森, 王晓辉. 一种几丁质酶基因的克隆表达及酶解产物分析. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2179–2186.
- [6] Laribi-Habchi H, Bouanane-Darenfed A, Drouiche N, Pauss A, Mameri N. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72: 1117–1128.
- [7] Liu YZ, Luo CP, Liu YF, Chen ZY. Cloning and expression of a chitinase gene from *Serratia marcescens* Strain C8-8. *Agricultural Biotechnology*, 2013, 2(3): 56–59.
- [8] Jankiewicz U, Brzezinska MS. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(6): 709–717.
- [9] Ozgen A, Nalcacioglu R, Sezen K, Demirbag Z. Characterization of chitinase genes originated from *Serratia marcescens* and their additive insecticidal activities to *Bacillus thuringiensis* strains. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22 Suppl1: S82.
- [10] Sun QH, Wu D, Zhang ZC, Zhao Y, Xie XY, Wu JQ, Lu Q, Wei ZM. Effect of cold-adapted microbial agent inoculation on enzyme activities during composting start-up at low temperature. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 635–640.
- [11] Seitkalieva AV, Menzorova NI, Rasskazov VA. Application of different enzyme assays and biomarkers for pollution monitoring of the marine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, 188(1): 70.
- [12] Stefanidi E, Vorgias CE. Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*, 2008, 12(4): 541–552.
- [13] Malecki PH, Raczynska JE, Vorgias CE, Rypniewski W. Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium. *Acta Crystallographica Section*, 2013, 69(5): 821–829.
- [14] Wang XH, Chi NY, Bai FW, Du YG, Zhao Y, Yin H. Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant exo-chitinase (ChiC) from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6. *Extremophiles*, 2016, 20(2): 167–176.
- [15] Wang XH, Zhao Y, Tan HD, Chi NY, Zhang QF, Du YG, Yin H. Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 70: 455–462.
- [16] Bhushan B. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 88(5): 800–808.
- [17] Castañeda-Ramírez JC, de la Fuente-Salcido NM, Salcedo-Hernández R, León-Galván F, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. High-level synthesis of endochitinase ChiA74 in *Escherichia coli* K12 and its promising potential for use in biotechnology. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(6): 455–462.
- [18] Xiao C, Zhang L, Li YY, Xin Y, Chen GA, Yang SR. Heterologous expression, purification and characterization of phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Kluyveromyces lactis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 87–96. (in Chinese)
肖超, 张梁, 李颜颜, 辛瑜, 陈国安, 杨盛荣. 蜡样芽孢杆菌磷脂酶 C 在乳酸克鲁维酵母中重组表达纯化及酶学性质分析. *微生物学报*, 2017, 57(1): 87–96.
- [19] Swinkels BW, Van Ooyen AJJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1993, 64(2): 187–201.
- [20] Xu LL, Liu ST, Ren YC, Hui FL. Recombinant expression of camel-prochymosin gene in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(12): 72–78. (in Chinese)
徐龙龙, 刘思彤, 任永成, 惠丰立. 骆驼凝乳酶原基因在乳酸克鲁维酵母中的重组表达. *中国食品学报*, 2017, 17(12): 72–78.
- [21] Nagpure A, Gupta RK. Purification and characterization of an extracellular chitinase from antagonistic *Streptomyces violaceusniger*. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(5): 429–439.
- [22] Chen S. Purification and characterization of an antifungal

- chitinase from *Bacillus* sp. SL-13. *Biotech World*, 2014, (12): 244–245.
- [23] Zhu XF, Zhou Y, Feng JL. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2007, 8(11): 831–838.
- [24] Lee YJ, Kim CS, Oh DK. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 787–793.
- [25] Bolotin-Fukuhara M, Toffano-Nioche C, Artiguenave F, Duchateau-Nguyen G, Lemaire M, Marmeisse R, Montrocher R, Robert C, Termier M, Wincker P, Wésolowski-Louvel M. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Letters*, 2000, 487(1): 66–70.

Recombinant expression and characterization of cold-adapted chitinase genes in *Kluyveromyces lactis*

Ligong Chen^{1,2}, Qingfang Zhang^{1,2}, Naiyu Chi^{1,2}, Xiaohui Wang^{1,2*}

¹ College of Life Sciences and Technology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning Province, China

² Liaoning Marine Microbial Engineering Technology Research Center, Dalian 116622, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] We aimed to construct recombinant *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) strains to produce cold-adapted chitinases (chitinase A, *chiA*; chitinase C, *chiC*) of *Pseudoalteromonas* sp. DL-6. We purified and characterized the recombinant proteins. [Methods] We synthesized optimized-codons chitinase genes. The recombinant *K. lactis* expression plasmids (pKLAC1-*chiA*, pKLAC1-*chiC*) were constructed successfully and transformed into *K. lactis* by electric field pulses to achieve soluble expression of cold-adapted chitinases. The recombinant proteins were further purified using Ni-NTA chromatography. [Results] The recombinant *K. lactis* producing cold-adapted chitinases was successfully constructed and obtained high purity. The purified recombinant proteins, ChiA and ChiC, appeared as a single band of approximately 110 kDa and 90 kDa by SDS-PAGE, respectively. The activities of ChiA and ChiC were 51.45 U/mg and 108.56 U/mg measured by Schales' method. The optimum temperature was 20 °C and 30 °C, and the optimum pH was 8.0 and 9.0, respectively. ChiA and ChiC were stable at pH 8.0–12.0 and below 40 °C. ChiA and ChiC have obvious degradation activity to colloidal chitin and powdered chitin including α -chitin and β -chitin. Besides, they acted synergistically to efficiently degrade chitin substrates. [Conclusion] The expression, purification, enzymatic properties and degradation products of cold-adapted chitinases in *K. lactis* were achieved for the first time. These research results provide reference for the study of other cold-adapted chitinases.

Keywords: cold-adapted chitinase, *Kluyveromyces lactis*, purification, enzymological characterization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation (31500039), by the Liaoning Province Doctoral Funding Guide Project (20170520167), by the Dalian Youth Science and Technology Star Project (2017RQ155), by the Dalian University Doctoral Special Fund (2017QL020) and by the Liaoning Natural Science Foundation (20180550728)

*Corresponding author. E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

Received: 25 March 2019; Revised: 19 June 2019; Published online: 12 November 2019