

甲壳素酶 Chisb 的定向进化及生物转化合成几丁寡糖

潘梦妍^{1,2}, 徐显皓^{1,2}, 刘延峰^{1,2}, 李江华^{1,2}, 吕雪芹^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 刘龙^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

潘梦妍, 徐显皓, 刘延峰, 等. 甲壳素酶 Chisb 的定向进化及生物转化合成几丁寡糖. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1787-1796.
Pan MY, Xu XH, Liu YF, et al. Directed evolution of chitinase Chisb and biosynthesis of chitooligosaccharides. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1787-1796.

摘要: 甲壳素酶具有广泛的工业应用前景, 如可将虾壳、蟹壳和其他甲壳废物降解成以几丁寡糖为主的高附加值产品, 但野生型甲壳素酶催化效率低, 大大限制了几丁寡糖的生产。笔者在前期研究中表达了一个具有较高催化效率的甲壳素酶 Chisb, 并对其酶学性质进行了初步研究。为进一步提高甲壳素酶 Chisb 的催化效率, 以 R13NprB-C-SP-H 为亲本, 采用易错 PCR(Error-prone PCR)技术构建随机突变体文库, 对甲壳素酶 Chisb 进行定向进化。经过 96 孔板初筛和摇瓶复筛, 获得了两个催化效率进一步提高的突变体 C43D 和 E336R。对突变体的酶学性质进行分析, C43D 和 E336R 的最适催化温度为 55 °C, C43D 的最适 pH 为 5.0, E336R 的最适 pH 为 9.0; 其催化效率相比对照分别提高了 1.35 倍和 1.57 倍; 而 E336R 和 C43D 催化产几丁寡糖的含量分别为 2.53 g/L 和 2.06 g/L, 相比对照(0.89 g/L)分别提高了 2.84 倍和 2.31 倍; 底物转化率分别为 84.3%和 68.7%, 相比对照 (29.7%) 分别提高了 54.6%和 39%。研究表明, 通过易错 PCR 引入随机突变的方法能够有效提高甲壳素酶 Chisb 的催化效率。上述研究获得的催化效率提高的正向突变体及其酶学性质分析对生物转化合成几丁寡糖具有重要研究意义和应用价值。

关键词: 甲壳素酶 Chisb, 几丁寡糖, 催化效率, 易错 PCR, 定向进化

Directed evolution of chitinase Chisb and biosynthesis of chitooligosaccharides

Mengyan Pan^{1,2}, Xianhao Xu^{1,2}, Yanfeng Liu^{1,2}, Jianghua Li^{1,2}, Xueqin Lü^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, and Long Liu^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Chitinase has a wide industrial application prospect. For example, it can degrade shrimp shells, crab shells and

Received: February 20, 2019; **Accepted:** April 2, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31622001, 21808084).

Corresponding author: Long Liu. Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31622001, 21808084) 资助。

网络出版时间: 2019-04-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190424.1452.002.html>

other crustacean waste into high value-added chitooligosaccharides. However, the low catalytic efficiency of chitinase greatly limits the production of chitooligosaccharides. In previous study, the we expressed a chitinase Chisb with high catalytic efficiency and studied its enzymatic properties. In order to further improve the catalytic efficiency of Chisb, with R13NprB-C-SP-H as the parent, here error-prone PCR was used to construct random mutant library to conduct directed evolution of chitinase Chisb. Two mutants C43D and E336R were obtained with 96-well plate primary screening and shaker-screening, and their enzymatic properties were also studied. The optimum temperature of C43D and E336R was 55 °C, and the optimum pH of C43D was 5.0, while that of E336R was 9.0. The catalytic efficiency of C43D and E336R was 1.35 times and 1.57 times higher than that of control. The chitooligosaccharide concentration of E336R and C43D was 2.53 g/L and 2.06 g/L, improved by 2.84 times and 2.31 times compared with the control (0.89 g/L), respectively. In addition, the substrate conversion rate of mutants E336R and C43D was 84.3% and 68.7%, improved by 54.6% and 39% compared with the control (29.7%), respectively. In summary, the study indicates that random mutation introduced by error-prone PCR can effectively improve the catalytic efficiency of chitinase Chisb. The positive mutants with higher catalytic efficiency obtained in the above study and their enzymatic property analysis have important research significance and application value for the biosynthesis of chitooligosaccharides.

Keywords: chitinase Chisb, chitooligosaccharides, catalytic efficiency, error-prone PCR, directed evolution

甲壳素酶 (EC 3.2.1.14) 来源广泛, 存在于各种细菌、真菌和一些高等植物的组织中^[1-2]。目前, 甲壳素酶多应用于生物防治植物病虫害和降解甲壳素产几丁寡糖等方面。近年来, 越来越多的国内外研究学者致力于研究甲壳素酶, 但是野生型的菌株甲壳素酶产量低、活性也低, 从而限制了甲壳素酶的实际应用^[3]。因此, 运用基因工程或酶工程等手段将甲壳素酶进行克隆表达、分子改造以提高甲壳素酶的催化活性, 已经成为研究热点。

Huang 等^[4]成功在大肠杆菌中高效表达了来源于蜡样芽孢杆菌的甲壳素酶基因 *ChiCH* 和 *ChiCW*, 重组的甲壳素酶 *ChiCH* 和 *ChiCW* 通过 GST 融合标签进行纯化, 纯化后的蛋白比酶活分别为 7.48 U/mg 和 3.69 U/mg。随后又对纯化后的蛋白进行了生物化学特性的鉴定, 结果发现 *ChiCH* 为外切甲壳素酶, *ChiCW* 为内切甲壳素酶。2017 年, Guo 等^[5]从来源于类芽孢杆菌属 *Paenibacillus pasadenensis* CS0611 的菌株中分离纯化了一种碱性甲壳素酶, 纯化后比酶活达到 10.28 U/mg, 经过 HPLC 检测其水解产物发现, 该酶可以将胶体甲壳素水解为甲壳二糖。2018 年, Zhang 等^[6]从梅园几丁质分解细菌 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 中表达了一种新型甲壳素

酶 *CmChi1*, 经鉴定属于糖苷水解酶 18 家族, 通过胶体甲壳素亲和层析纯化后比酶活达到 15.3 U/mg。*CmChi1* 能水解胶体甲壳素且最终产物为 GlcNAc, 得率接近 100%, 产物分离后纯度达到 98%。

此外, 还有学者通过分子对接、定点突变等技术手段对甲壳素酶的结构进行了研究。Madhuprakash 等^[7]对来源于变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans* 的甲壳素酶 D 的结构进行研究, 结果表明, 该酶同时具有水解活性和转糖基活性, 且该酶具有糖苷水解酶 18 家族的特点, 在其催化结构域中存在保守区域 DXDXE 结构, 这是首次发现单个结构域的甲壳素酶同时具有两种活性。Fan 等^[8]通过对来源于舞毒蛾 *Lymantria dispar* 的甲壳素酶进行定点突变, 并对其活性残基进行了功能分析。结果发现, 野生型的酶比突变酶具有更高的催化效率, 虽然突变位点都为负突变, 但是证明了 D143、D145 和 W146 为该酶的关键活性位点。

我们在前期研究中, 通过信号肽筛选、核糖体结合位点 (RBS) 优化和定点突变等手段, 获得了一个具有较高催化能力的甲壳素酶 Chisb, 其比酶活达到 249.62 U/mg。研究其酶学性质发现, 该酶的最适 pH 为 5.0, 最适温度为 60 °C, K_m 和 K_{cat}/K_m 分别为 2.24 mmol/L 和 3.9 mmol/(L·s)。通

过离子色谱检测其水解产物发现,以胶体甲壳素为底物,该酶最终可水解得到4种不同聚合度的几丁寡糖^[9]。

如前所述,研究者已经运用多种手段对甲壳素酶进行了研究。但运用易错 PCR^[10]或 DNA 改组^[11-12]的方式对甲壳素酶分子进行定向改造的研究较少。易错 PCR 是利用 *Taq* DNA 多聚酶不具有 3'→5'校对功能的特性,在一定条件下(如不同的 dNTPs 浓度、Mg²⁺浓度和 MnCl₂ 存在)能够按较高的机率引入随机突变的一种技术。本研究旨在前期研究基础上,采用易错 PCR 技术将随机突变引入来源于芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. DAU101 的甲壳素酶 Chisb,经过 96 孔板初筛和摇瓶复筛,获得催化效率进一步提高的突变体,为实现其在高效生物转化合成几丁寡糖中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB600 和重组菌株 R13NprB-C-SP-H^[9]均为本实验室保藏;质粒 pP43NMK_R13NprB-*chisb*-sp-his^[9]为本实验室构建;质粒 pP43NMK_MR13NprB-*chisb*-sp-his 为本

研究中构建。

1.2 试剂与培养基

试剂:可调式易错 PCR 试剂盒 (CAT#: 160903-100,北京天恩泽基因科技有限公司);几丁寡糖标准品(聚合度 1-5)购自上海甄准生物科技有限公司;甲壳素粉末 (C7170, SIGMA-ALDRICH);改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司);NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris 预制凝胶及标准蛋白 Marker (Thermo Fisher scientific);氨苄青霉素 (CAS 69-52-3)和卡那霉素 (CAS 25389-94-0)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他常用试剂均为分析纯。

培养基:种子培养基 (Luria-Bertani, LB):酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。固体培养基添加 2%的琼脂粉。

发酵培养基 (Terrific-Broth, TB):酵母粉 24 g/L,蛋白胨 12 g/L,甘油 4 mL/L, K₂HPO₄ 72 mmol/L, KH₂PO₄ 17 mmol/L。

1.3 易错 PCR 扩增 *chisb* 基因片段

以质粒 pP43NMK_R13NprB-*chisb*-sp-his 为模板,扩增 *chisb* 片段,所用引物如表 1 所示。易错 PCR 反应体系 (30 μL):*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/mL) 1 μL, 10×易错 PCR Mix 3 μL, 10×dNTPs 3 μL,

表 1 易错 PCR 引物

Table 1 The primers of error-prone PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
chisb1-F1	GGTTATTACCCTTCTTGGGGTGCCTACGGACGGGATTTTCAGGTGTGGG
chisb1-R1	CGCCAGCTTCCTTGTAGCGCTTCACCGTGCTCTCAATATTAACGTTTCTGCG
chisb1-F2	GGTTATTACCCTTCTTGGGGTGCCTACGGACGGG
chisb1-R2	CGCCAGCTTCCTTGTAGCGCTTCACCGT
chisb1-F3	GGTTATTACCCTTCTTGGGGTGCCTACGGACGGG
chisb1-R3	GCTTCACCGTGCTCTCAATATTAACG
chisb2-F1	GTTCTATGACCCGAAGGCAAAAGAGGCAGGGGTGCCGAACGC
chisb2-R1	CGCCAAGCTTTCATCATTACTTGCACTGCCTATTAACCTCCAAACGCCTGACTC
chisb2-F2	GTTCTATGACCCGAAGGCAAAAGAGGCAGGGGTG
chisb2-R2	CGCCAAGCTTTCATCATTACTTGCACTGCCTG
chisb2-F3	GTTCTATGACCCGAAGGCAAAAGAGG
chisb2-R3	CGCCAAGCTTTCATCATTACTTGCA
P43-F	GTTTGGAAAGTTAATAGGCGACTGCAAGTAATGATGAAAGCTTGGCGTAATCATGG
P43-R	CACCTGAAAATCCCGT CCG TAGGCACCCCAAGAAGGGTAATAACC

MnCl₂ 4 μL, dGTP 4 μL, 易错 PCR 引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水 12 μL。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并使用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。反应条件: 94 °C 3min; 94 °C 1 min, 45 °C 1 min, 72 °C 1 min, 重复 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.4 突变文库的构建

使用表 1 中 P43-F 和 P43-R 引物进行线性化扩增质粒 pP43NMK_R13NprB-*chisb*-sp-his。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并使用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。回收的片段 *chisb1*、*chisb2* 和载体 pP43NMK 采用一步克隆试剂盒 (ClonExpress® II, Vazyme Biotech Co., Ltd) 连接, 构建突变重组质粒 pP43NMK_MR13NprB-*chisb*-sp-his。

1.5 重组质粒转化与平板菌落 PCR 鉴定

将突变的重组质粒转化至 *E. coli* JM109 中, 涂布氨苄青霉素抗性平板, 于 37 °C 培养 8–12 h。待平板长出菌落后, 随机挑选单菌落进行平板菌落 PCR, 验证转化子的阳性克隆概率。

1.6 96 孔板初筛与摇瓶复筛

将平板上的菌落接种到 LB 液体培养基中培养一段时间, 提取质粒, 转化至 *B. subtilis* WB600 中, 涂布卡那霉素抗性平板, 37 °C 培养 12 h。待平板长出菌落后, 首先将单菌落接种至 96 孔板中, 用 LB 培养基进行种子培养, 8 h 后转接至 TB 培养基发酵培养 12 h 后测定酶活大小。

将初筛得到的正向突变体进行摇瓶复筛, 培养方法与初筛一致。将复筛得到的正向突变体送至苏州金唯智有限公司进行测序, 确定突变位点。

1.7 突变体活性与蛋白浓度的测定

以胶体甲壳素作为底物测定酶活大小。500 μL 反应体系包含 66 μL 10% 的胶体甲壳素、334 μL 磷酸氢二钠-柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0) 和纯化的突变体的反应混合物在 60 °C 振荡 15 min 后,

100 °C 加热 5 min 终止反应, 14 000 r/min 离心 5 min^[9]。使用改进的 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法在 540 nm 处测定上清液中还原糖的量^[13]。一个单位的甲壳素酶酶活定义为在 60 °C、pH 5.0 的条件下, 每小时释放 1 μmol 还原糖所需的酶量。用 GlcNAc 测定标准曲线, 加热灭活的酶作为对照。使用 Bradford 蛋白含量测定试剂盒 (Sangon Biotech Co., Ltd)^[14], 以牛血清白蛋白为标准对蛋白质含量进行测定。

1.8 突变体纯化与酶学性质研究

1.8.1 突变体纯化

将发酵液于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。上清液通过 0.45 μm 滤膜除去杂质, 以 0.1 mL/min 的流速直接上样至 His GraviTrap 柱 (GE Healthcare, Tokyo)。上样后, 用缓冲液 A (40 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 平衡柱子, 流速为 0.2 mL/min。然后用缓冲液 B (40 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 从 5%–100% 进行梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 最后使用 HiTrap™ Desalting 脱盐柱进行脱盐, 纯化后的酶液保存在 4 °C 以备使用。纯化的蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[15] 进行检测。

1.8.2 突变体酶学性质研究

为测定温度对突变体酶活性的影响, 根据 1.7 中突变体酶活的测定方法, 测定 25 °C–70 °C 等温度下, 突变体的酶活, 确定其最适反应温度。

为测定 pH 对突变体酶活性的影响, 根据 1.7 中突变体酶活的测定方法, 选择 pH 3.0–12.0 的各种缓冲液测定突变体的最适反应 pH。使用的缓冲液如下: 磷酸氢二钠-柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.0–6.0), 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.0–9.0), 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0–12.0)。使用的所有缓冲液浓度均为 20 mmol/L。

为测定不同金属离子对突变体酶活性的影

响, 分别用 1、5 和 10 mmol/L 的 CoCl_2 、 MnCl_2 、 MgCl_2 、 FeCl_3 、 CuCl_2 、 ZnCl_2 、 CaCl_2 、 KCl 、 AlCl_3 、 BaCl_2 、 NiSO_4 、 $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Li}$ 等金属离子的盐溶液在标准酶活测定条件下反应, 以不加金属离子的反应为对照, 研究金属离子对突变体酶活的影响。

以不同浓度的胶体甲壳素为底物, 测定突变体的动力学参数。使用 Matlab 软件拟合曲线, 计算米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max}), 进而推导出特征常数 K_{cat} 和催化效率比 K_{cat}/K_m 。

以上所有实验均进行 3 次, 并取平均值和方差进行计算。

1.9 高效液相色谱 (HPLC) 分析水解产物

收集 12 h 的对照菌株与突变体的发酵上清液, 在 3 g/L 的底物终浓度下分别于 55 °C 反应 2、4、6、8、10、12、20、24 h。14 000 r/min 离心 10 min 水解后的反应液, 上清液用于 HPLC 分析 (Agilent 1260 system, USA)。色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 4E 柱 (4.6 mm×250 mm), 流动相: 乙腈:水=70:30; 流速是 0.6 mL/min, 检测器用紫外检测器 (VWD), 波长 210 nm, 进样量 10 μL , 柱温 30 °C。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 扩增结果

使用表 1 的引物扩增片段 *chisb1* 和 *chisb2*, *chisb* 基因全长 1 692 bp, 分为两段进行扩增。*chisb1* 片段长 767 bp, *chisb2* 片段长 925 bp, 扩增结果如图 1 所示。扩增 *chisb1* 片段的 3 对引物中, 只有 *chisb1*-F1/R1 能扩增出目的条带, 其余 2 对引物扩增都没有明显条带; 而用引物 *chisb2*-F2/R2 扩增 *chisb2* 片段的效果没有 *chisb2*-F1/R1 和 *chisb2*-F3/R3 引物的扩增效果好。所以选用引物 *chisb1*-F1/R1 扩增 *chisb1* 片段, 引物 *chisb2*-F1/R1 扩增 *chisb2* 片段, 引入随机突变位点。

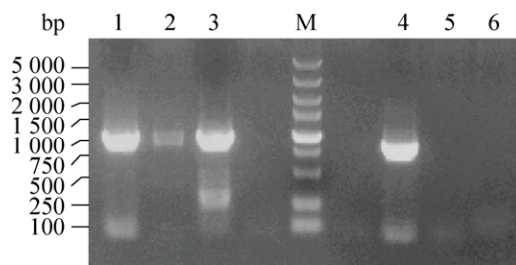


图 1 *chisb1* 和 *chisb2* 的凝胶电泳图

Fig. 1 The gel electrophoresis of *chisb1* and *chisb2*. M: marker; 1: *chisb2*-F1/R1; 2: *chisb2*-F2/R2; 3: *chisb2*-F3/R3; 4: *chisb1*-F1/R1; 5: *chisb1*-F2/R2; 6: *chisb1*-F3/R3.

2.2 突变文库的构建及平板鉴定

引物 P43-F 和 P43-R 扩增得到的线性化质粒与回收的 *chisb1* 和 *chisb2* 片段采用一步克隆试剂盒进行连接, 转化 *E. coli* JM109, 可在氨苄平板上得到约 1 000 个单菌落, 随机挑选 100 个单菌落进行 PCR 验证, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测条带大小, 结果显示全部为阳性克隆。随机挑选 8 个单菌落的验证条带如图 2 所示。可以看出, *chisb* 片段已成功转入 *E. coli* JM109 中。将平板上的单菌落接种于 LB 液体培养基进行培养, 然后提取重组质粒, 转化至 *B. subtilis* WB600, 在卡那霉素平板上长出约 700 个阳性克隆。

2.3 96 孔板初筛与摇瓶复筛结果

将卡那霉素平板上长出的约 700 个阳性克隆接种于含 LB 液体培养基的 96 孔板中, 培养 8 h 后, 再转接至 TB 发酵培养基中培养 12 h, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行酶活测定。结果显示, 其中 24 株突变体的酶活高于对照。将这 24 株突

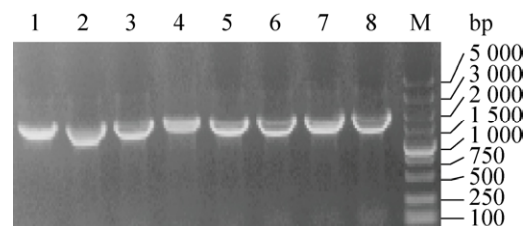


图 2 基因 *chisb* 的凝胶电泳图

Fig. 2 The gel electrophoresis of *chisb*. M: marker; 1-8: *chisb*.

变体进行摇瓶复筛鉴定, 采用同样的方法进行培养和酶活测定, 其中 2 株突变体的活力显著高于其他突变体。经过序列比对发现, 分别是第 43 位半胱氨酸突变为天冬氨酸 (C43D) 和第 336 位谷氨酸突变为精氨酸 (E336R)。

2.4 突变体的纯化

为了进一步研究突变体的酶学性质, 将摇瓶复筛得到的 2 个突变体进行了镍柱纯化。结果如图 3 和表 2 所示。由图 3 可以看出, 突变体 C43D 和 E336R 经过镍柱纯化后完全被 10% 的 B 液洗脱, 在 62 kDa 处得到一条单一的条带。由表 2 可见, 经过镍柱纯化后的突变体酶与粗酶相比, 比酶活都得到了提高, 突变体 C43D 和 E336R 的纯化倍数分别是之前的 3.05 倍和 3.69 倍, 得率分别为 80.77% 和 85.45%。

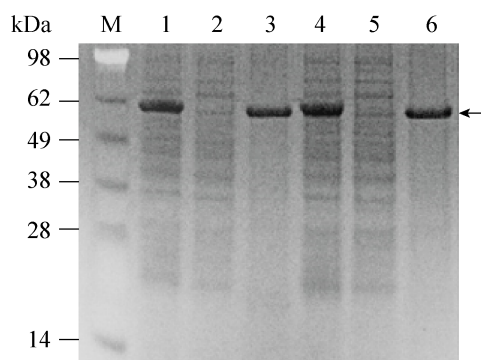


图 3 突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the mutants. M: marker; 1: the fermentation supernatant of C43D; 2: flow-through of C43D; 3: effluent of 10% buffer B of C43D; 4: the fermentation supernatant of E336R; 5: flow-through of E336R; 6: effluent of 10% buffer B of E336R.

表 2 突变体的纯化结果

Table 2 Purification results of the mutants

Mutants	Purification step	Enzyme activity (U/mL)	Protein concentration (mg/mL)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
C43D	Crude enzyme	58.97	0.68	86.72	1.00	100.00
	Ni-chelating affinity chromatography	47.63	0.18	264.61	3.05	80.77
E336R	Crude enzyme	62.33	0.82	76.01	1.00	100.00
	Ni-chelating affinity chromatography	53.26	0.19	280.32	3.69	85.45

2.5 突变体的酶学性质研究

由图 4A 可以看出, 突变体 C43D 和 E336R 的最适温度都为 55 °C, 当温度高于 55 °C, 突变体活性迅速降低。图 4B 显示了突变体 C43D 的最适 pH 为 5.0, pH 大于 5.0, 突变体活性缓慢下降; 而 E336R 的最适 pH 为 9.0, 当 pH 在 3.0–6.0 之间时, E336R 的活性呈上升趋势, pH 高于 6.0 活性下降, 但在 9.0 时活性显著上升, pH 高于 9.0 又迅速下降。

通过测定金属离子对突变体酶活的影响 (如图 5 所示), 发现 15 mmol/L 的 Mn^{2+} 对两株突变体的活性具有显著的促进作用, 高浓度的 Ba^{2+} 对突变体的活性也有促进作用。而 Ni^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 K^{+} 对突变体 C43D 的活性影响不大, 但无论是高浓度还是低浓度的 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Al^{3+} 都对 C43D 突变体活性具有抑制作用; 与 C43D 突变株一样, Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Al^{3+} 也会抑制 E336R 的活性。除此之外, 高浓度的 Zn^{2+} 也会抑制其活性。

以胶体甲壳素作为底物, 对两个突变体的动力学参数也进行了测定。软件拟合曲线如图 6 所示, 计算结果如表 3 所示。实验发现, 与对照相比, 突变体 C43D 和 E336R 的 K_m 值降低, 说明底物亲和力增加; 催化常数 K_{cat} 升高, 催化效率 K_{cat}/K_m 相比对照分别提高了 1.35 倍和 1.57 倍。

2.6 水解产物的 HPLC 分析

结果如图 7 所示。由图 7A 可以看出, 对照 (原始酶) 水解胶体甲壳素生成的几丁寡糖总量为 0.89 g/L, 底物转化率为 29.7%, 水解产物以

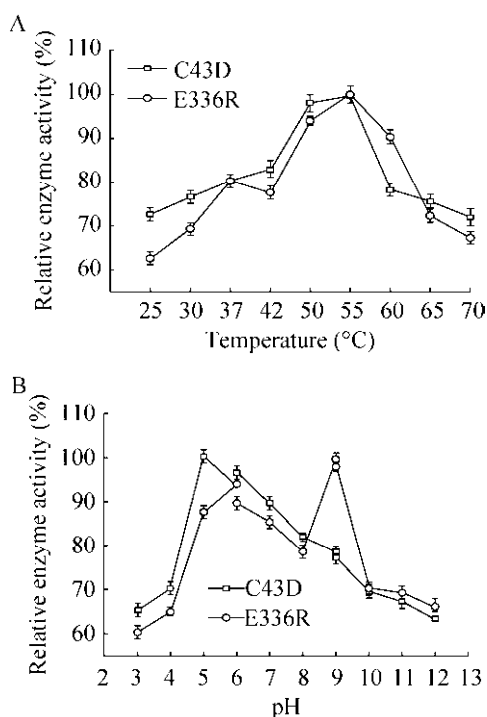


图 4 温度 (A) 和 pH (B) 对突变体活性的影响
Fig. 4 Effects of temperature (A) and pH (B) on mutants activity.

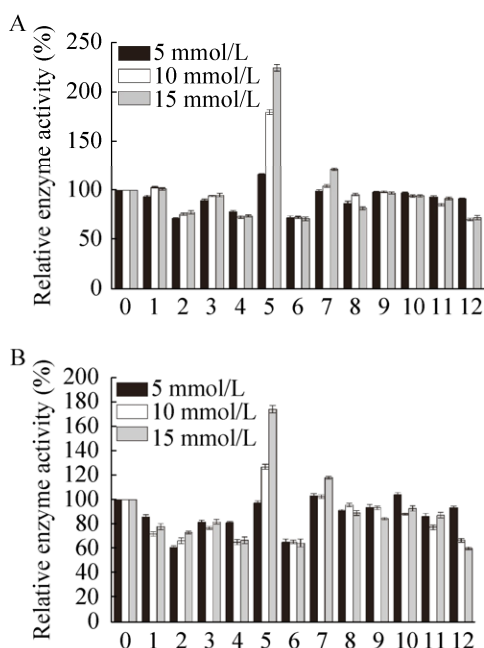


图 5 金属离子对突变体酶活的影响
Fig. 5 Effects of metal ions on mutants activity. (A) The mutant of C43D. (B) The mutant of E336R. 0-12: no metal ions, Ni⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Al³⁺, Ba²⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Zn²⁺.

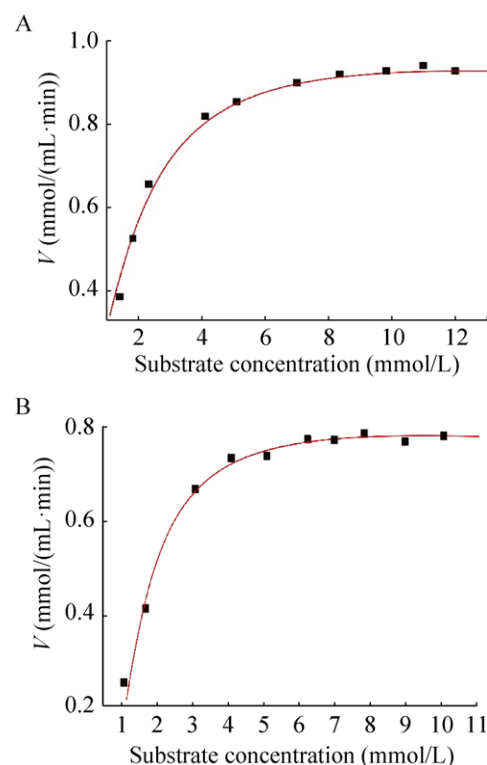


图 6 突变体 C43D (A) 和 E336R (B) 的动力学拟合曲线

Fig. 6 Kinetic fitting curves of mutant C43D (A) and E336R (B).

表 3 突变体的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of the mutants

Mutants	V_{max} (mmol/(mL·min))	K_m (mmol/L)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m L/(s·mmol)
Control ^[9]	1.42×10^{-3}	2.24	8.77	3.90
C43D	0.97×10^{-3}	2.13	11.20	5.25
E336R	0.79×10^{-3}	1.76	10.79	6.13

(GlcNAc)₂ 为主。而突变体 E336R 水解胶体甲壳素产生的几丁寡糖总量始终高于 C43D 突变体, 其催化 24 h 后几丁寡糖总量达到最大, 分别为 2.53 g/L 和 2.06 g/L, 转化率分别为 84.3% 和 68.7% (图 7B, 7C)。进一步分析发现, 突变体的催化水解产物都为 GlcNAc、(GlcNAc)₂、(GlcNAc)₃ 和 (GlcNAc)₅, 但是反应 8 h 之后, 检测不到 (GlcNAc)₃ 的生成。其中 (GlcNAc)₂ 含量最高, 反应至 24 h 时, C43D 和 E336R 突变体生成的 (GlcNAc)₂ 分别占总糖含量的 71.8% 和 57.7%。

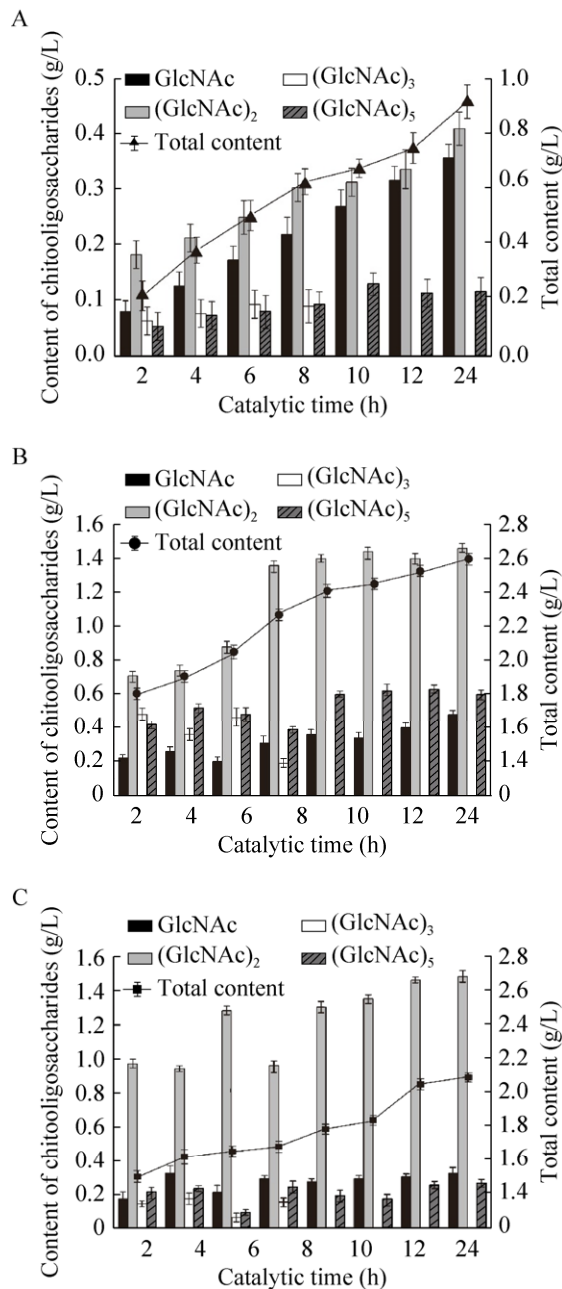


图7 突变体的水解产物分析

Fig. 7 Analysis of the hydrolysates of the mutants. (A) The hydrolysates of original enzyme. (B) The hydrolysates of E336R. (C) The hydrolysates of C43D.

3 讨论

甲壳素酶在农业、医药和生物防治方面具有广泛的应用。但是野生菌产的甲壳素酶活性较低,对于工业化生产甲壳素酶有一定差距^[16]。随

着对甲壳素酶研究的深入,研究者多采用在大肠杆菌和毕赤酵母中进行异源表达的方式生产甲壳素酶^[17-19]。除此之外,还对甲壳素酶的特性和结构进行了细致的研究。

目前,运用易错 PCR 和定点突变技术是对甲壳素酶进行改造的有效方式^[20-21]。易错 PCR 是一种使复制的 DNA 序列出现错误的一种 PCR 技术,它通过保真度低的 *Taq* DNA 聚合酶,使 DNA 复制的保真度降低,从而在合成的新链中增加错配的碱基,达到产物出现多个点突变的效果^[22]。而运用易错 PCR 对甲壳素酶进行定向进化,可能成为一种提高甲壳素酶催化活性的有效方式。本研究中,以前期获得的产甲壳素酶的重组菌 R13NprB-C-SP-H 为出发菌株,利用随机突变和高通量筛选的方法获得了底物亲和力、催化效率和比活性都明显提高的甲壳素酶突变体 C43D 和 E336R。

通过对两种甲壳素酶突变体的酶学性质进行测定发现,突变体的最适温度 (55 °C) 相比未突变的酶 (60 °C) 要低,突变体在 60 °C 时,活性显著降低,这可能是位于甲壳素酶催化结构域附近的天冬氨酸,其羧基在高温下不稳定而半胱氨酸的巯基更加稳定导致的。比较最适 pH 发现,C43D 突变体没有发生变化,E336R 突变体的最适 pH 为 9.0,造成这一现象的原因其一可能是:由于 336 位的谷氨酸为酸性氨基酸,带负电荷,当突变为精氨酸后,精氨酸为碱性氨基酸,突变后原本结构中的酸性基团变为碱性基团,在 pH 为 9.0 的缓冲溶液中,蛋白带正电荷,在碱性环境下更稳定;其二是由于突变为 Arg 之后,Arg 与周围相邻的其他氨基酸形成了新的氢键网络和盐桥结构,导致突变体的 pH 发生改变^[23-24]。而 C43D 突变体中的天冬氨酸为酸性氨基酸,带负电荷,它会影响断裂位点周围电离基团的 pKa 值,在原本酸性的环境下,使得突变体 C43D 的最适 pH 保持不

变^[25]。除此之外,天冬氨酸在甲壳素酶的催化反应中还参与配体的催化和结合。2012年,Suginta等^[26]报道了来源于哈氏弧菌的甲壳素酶A,其催化结构域附近的Asp313的羧基可以与N-乙酰基团中的-C=O(羰基)相互作用,从而使得生成的产物构像发生改变。本研究中43位的半胱氨酸位于甲壳素酶Chisb的催化结构域附近,当突变为天冬氨酸,其羧基可以与底物乙酰基团中的羰基发生相互作用,而半胱氨酸的巯基与羰基的相互作用较弱,因此突变后底物亲和力增加,说明催化结构域附近的天冬氨酸在甲壳素酶的底物结合中具有重要作用^[27]。

当以胶体甲壳素作为底物对突变体的动力学参数进行测定,我们发现,相比未突变酶的米氏常数(K_m)为2.24 mmol/L,突变体C43D和E336R的 K_m 值降低,说明突变体对底物的亲和力增加;特别是突变体E336R,由于精氨酸结构中的侧链比谷氨酸的侧链长,会导致底物的结合口袋变大,增加了酶与底物的结合能力,更多的底物会进入到底物结合口袋,因此底物亲和力显著增加;另外,精氨酸结构中所含有的阳离子不会阻碍底物结合,底物可以自由进入到底物结合口袋,使底物亲和力增加。同时,突变体的催化效率(K_{cat}/K_m)相比未突变的酶的催化效率(3.9 L/(s·mmol)),也分别提高了1.35倍和1.57倍。分析甲壳素酶Chisb的三维蛋白结构^[9,28],C43D突变体中的天冬氨酸,它可以和几丁寡糖分子中(-1)位的非还原性糖基结合形成氢键,稳定甲壳素酶的催化活性;而E336R突变体中的精氨酸与甲壳素酶Chisb周围相邻的氨基酸形成了新的盐桥,从而提高了催化效率^[29-30]。

综上所述,我们的研究证明了随机突变结合高通量筛选技术是提高甲壳素酶催化效率及其底物亲和力的一种有效手段,这为利用甲壳素酶高效生物转化合成几丁寡糖奠定了一定基础。

REFERENCES

- [1] Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 1983, 157(1): 22-31.
- [2] Schlumbaum A, Mauch F, Vögeli U, et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 1986, 324(6095): 365-367.
- [3] Jiang HB, Zhang Y, Jiang QL, et al. Advances in the research of chitinase. *Shandong Sci*, 2000, 13(4): 41-45 (in Chinese).
蒋红彬, 张瀛, 蒋千里, 等. 几丁质酶的研究概况. *山东科学*, 2000, 13(4): 41-45.
- [4] Huang CJ, Chen CY. High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(1): 8-17.
- [5] Guo XX, Xu P, Zong MH, et al. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. *Chin J Catal*, 2017, 38(4): 665-672.
- [6] Zhang AL, He YM, Wei GG, et al. Molecular characterization of a novel chitinase CmChi1 from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 and its use in N-acetyl-D-glucosamine production. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 179.
- [7] Madhuprakash J, Singh A, Kumar S, et al. Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation. *Int J Biochem Mol Biol*, 2013, 4(4): 166-178.
- [8] Fan XJ, Yang C, Zhang C, et al. Cloning, site-directed mutagenesis, and functional analysis of active residues in *Lymantria dispar* chitinase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 184(1): 12-24.
- [9] Pan MY, Li JH, Lü XQ, et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 124: 54-62.
- [10] Xu HF, Zhang XE, Zhang YM, et al. Recent advances *in vitro* molecular directed evolution. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29(4): 518-522 (in Chinese).
徐卉芳, 张先恩, 张用梅, 等. 体外分子定向进化研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(4): 518-522.

- [11] Stemmer WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(22): 10747–10751.
- [12] Moore JC, Jin HM, Kuchner O, et al. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. J Mol Biol, 1997, 272(3): 336–347.
- [13] Lee YS, Park IH, Yoo JS, et al. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. Bioresour Technol, 2007, 98(14): 2734–2741.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [16] Brzezinska MS, Jankiewicz U, Walczak M. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. Int Biodeter Biodegr, 2013, 84: 104–110.
- [17] Gao C, Zhang AL, Chen KQ, et al. Characterization of extracellular chitinase from *Chitinibacter* sp. GC72 and its application in GlcNAc production from crayfish shell enzymatic degradation. Biochem Eng J, 2015, 97: 59–64.
- [18] Wang D, Li AJ, Han HY, et al. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. Int J Biol Macromol, 2018, 116: 863–868.
- [19] Nguyen HQ, Vu VH, Le PD, et al. High-level expression, purification and properties of an Endochitinase gene without signal peptide from *Lecanicillium lecanii* 43H in *Pichia pastoris*. Mol Biol Rep, 2018, 45(5): 1067–1075.
- [20] Wang AX, Li W, Chen XL, et al. Optimization of the mutation conditions of *Trichoderma harzianum* chitinase gene using Error-prone PCR. J Northeast Agric Univ, 2013, 44(10): 134–138 (in Chinese).
王傲雪, 李微, 陈秀玲, 等. Error-prone PCR 致哈茨木霉几丁质酶突变的条件优化. 东北农业大学学报, 2013, 44(10): 134–138.
- [21] Yun CS, Matsuda H, Kawamukai M. Directed evolution to enhance secretion efficiency and thermostability of chitosanase from *Mitsuaria chitosanitabida* 3001. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(2): 559–563.
- [22] Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods Appl, 1992, 2(1): 28–33.
- [23] Liu YH, Lu FP, Yu L, et al. Acid stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha amylase through introduction of mutations. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(5): 795–803.
- [24] Binter A, Staunig N, Jelesarov I, et al. A single intersubunit salt bridge affects oligomerization and catalytic activity in a bacterial quinone reductase. FEBS J, 2009, 276(18): 5263–5274.
- [25] Kolstad G, Synstad B, Eijsink VGH, et al. Structure of the D140N mutant of chitinase B from *Serratia marcescens* at 1.45 Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002, 58: 377–379.
- [26] Suginta W, Sritho N. Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(12): 2275–2281.
- [27] Watanabe T, Uchida M, Kobori K, et al. Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58(12): 2283–2285.
- [28] Matsumoto T, Nonaka T, Hashimoto M, et al. Three-dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution. Proc Jpn Acad Ser B, 1999, 75(9): 269–274.
- [29] Yang HQ, Liu L, Shin HD, et al. Structure-guided systems-level engineering of oxidation-prone methionine residues in catalytic domain of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* for significant improvement of both oxidative stability and catalytic efficiency. PLoS ONE, 2013, 8(3): e57403.
- [30] Gumpena R, Kishor C, Ganji RJ, et al. Glu121-Lys319 salt bridge between catalytic and N-terminal domains is pivotal for the activity and stability of *Escherichia coli* aminopeptidase N. Protein Sci, 2012, 21(5): 727–736.

(本文责编 陈宏宇)