

文章编号: 1000-5013(2008)02-0245-05

嗜麦芽窄食单胞菌产生的几丁质酶的特性

贺淹才, 刘爱花, 张荣奎, 刘治江

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 从土壤中筛选出一株产几丁质酶的革兰氏阴性细菌,通过 16S rDNA 法对酶活力最高的菌株 C 进行鉴定,确定为嗜麦芽窄食单胞菌(*S. maltophilia*)菌株.通过单因素优化法和均匀设计法确定 *S. maltophilia* 产几丁质酶的最佳条件:在 pH 值为 7.0 的基础培养基中添加质量分数为 1.0% 的酵母膏、质量分数为 0.5% 的胶体几丁质,于 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的摇床中培养 60 h.对硫酸铵沉淀获得的粗酶进行酶学性质研究,结果表明,该几丁质酶的最适反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适反应 pH 值为 7.2,在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上的温度条件下容易失活.通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,确定 *S. maltophilia* 几丁质酶的相对分子质量为 6.8×10^3 ;以筛选的 *S. maltophilia* 菌株的总 DNA 为模板,利用聚合酶链式反应(PCR)扩增出几丁质酶 DNA 测序;应用生物信息学手段推导 *S. maltophilia* 几丁质酶为分泌型蛋白酶,预测其等电点 pI 值为 5.42,相对分子质量为 6.8×10^3 (与实验纯化的酶蛋白电泳结果一致).预测该酶氨基酸序列具有信号肽区(氨基酸残基 1~41)、III 型几丁质结合区(残基 47~92)、多囊肾病域(107~194)、类纤维连接蛋白 III 型区(Fn3, 201~278)和 18 家族糖基水解域等 5 个结构功能区,5 个区域被富含 Ala, Gly, Pro, Ser 和 Thr 的短序列连接起来;在第 400~500 个氨基酸残基间有一个螺旋结构.

关键词: 几丁质酶;嗜麦芽窄食单胞菌;发酵培养;分子结构;生物信息学

中图分类号: Q 814.1; Q 939.96

文献标识码: A

几丁质酶(EC 3.2.1.14)广泛分布于自然界中的各种生物体中,其生理作用涉及到生物体的生长发育、防御病原体,甚至人的疾病发生过程^[1].它的纯品可应用于农业、医药业和轻工业^[2-6].很多种细菌都能够产生胞外分泌型的几丁质酶^[7],但是不同细菌来源的几丁质酶有不同的分子结构和不同的作用机理.有一种 C3 菌株的嗜麦芽窄食单胞菌(*S. maltophilia*),它不仅能够分泌几丁质酶,同时还分泌产生蛋白酶(EC 3.4.21-24), β 1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.58)和脂肪酶(EC 3.1.1.3)^[8].嗜麦芽窄食单胞菌产生的几丁质酶,以及其他细菌产生的几丁质酶的特性研究比较少.本文报道运用实验方法和生物信息学方法,研究一株从土壤中筛选得到的,能够产生几丁质酶的嗜麦芽窄食单胞菌,探讨其产酶条件及该菌产生的几丁质酶的有关特性.

1 材料与方法

1.1 菌株筛选和培养

土壤样本采自福建泉州市郊几丁质工厂的排污沟附近土壤中,样品经 60 目筛过筛.将土壤样本稀释涂布在平板中,挑取可以产生透明圈的菌落,再一次通过稀释涂布的方法,将其接种于纯几丁质平板和细菌几丁质平板上,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 72 h,获得纯菌落平板.从第 2 次筛选的纯菌落平板上,选取水解圈直径与菌落直径比最大的菌株,接种于 50 mL 的种子培养基(LB 培养基).培养 12 h 后,接种于 100 mL 的细菌几丁质发酵培养基中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 扩大培养.

1.2 培养基

(1) 筛选培养基(质量分数).可溶性淀粉 2.0%, KNO_3 0.1%, NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeSO_4 0.001%, 胶体几丁质 0.5%, 琼脂 2.0%, $\text{pH}=7.2\sim 7.4$. (2) 发酵液体

收稿日期: 2007-07-27

作者简介: 贺淹才(1949-),男,教授,博士,主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

培养基(质量分数). 蛋白胨 0.03%, 酵母膏 0.03%, K_2HPO_4 0.07%, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.05%, 胶体几丁质 0.5%, KH_2PO_4 0.03%, $pH = 7.0 \sim 7.4$.

1.3 酶活力测定方法

测定方法参见文[9], 采用还原糖量 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法.

1.4 分子生物学试剂及测序服务

各种酶及试剂、TaKaRa 公司的 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒等均购自上海生工生物技术公司. 引物合成和 DNA 序列测定由北京奥科生物公司进行.

1.5 超声波处理

在冰浴条件下超声波破碎菌体细胞壁, 测定破壁前后的几丁质酶的质量分数, 以判断是胞内酶, 还是胞外酶.

1.6 16S rDNA 鉴定

提取培养细菌染色体 DNA 作为模板, 16S rDNA 的两引物设计为: 5'-ACG GGC GGT GTG TAG-3' 和 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'. 聚合酶链式反应(PCR)的反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 15 min; 4 °C 保存, DNA 回收、纯化、测序.

1.7 *S. maltophilia* 产酶条件

设定培养基诱导物(胶质几丁质)的质量分数、pH 值、培养时间和培养温度为 4 个要素, 以 6 水平通过 DPS 软件得到均匀设计实验方案^[10] 进行产酶条件研究.

1.8 硫酸铵盐析和酶特性

将培养液于 4 °C, 10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 的离心机上离心 10 min, 取上清液经超滤浓缩后, 慢慢加入固体 $(NH_4)_2SO_4$ 至 90% 的饱和度, 在 4 °C 下过夜后, 于 10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心机离心 10 min, 弃上层清液, 收集沉淀, 用 $pH = 8.0$ 的 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ Na_2HPO_4 和 0.05 $mol \cdot L^{-1}$ 柠檬酸缓冲液溶解沉淀并彻底透析. 所得到的酶制品进行酶反应的最适温度和热稳定性、酶反应的最适 pH 值和酸碱稳定性、电泳相对分子质量的确定等.

1.9 几丁质酶基因的克隆与酶蛋白结构的预测

以提取的培养细菌染色体 DNA(与 16S rDNA 的模板相同)作为模板, 几丁质酶编码基因 DNA 的引物根据 GenBank 上公布的 *S. maltophilia* 34S1 的 *chiA* 序列^[11], 设计出扩增几丁质酶基因 *chiA* 和包含 Hind III, EcoRI 两内切酶位点的 2 对引物, C1 为 5'-CCC AAG CTT GAA ACT GCA CGC CCG GCA TCA -3', C2 为 5'-CG GAATTC GGC GAC TAC ACC AAA GG-3', C3 为 5'-CCC AAG CTT ACG GGC CCC ACC ATT GTA C-3', C4 为 5'-CG GAATTC GGC GAA AAA CTG CAC CAA TCC-3'. 其中, 划线部分为内切酶酶切位点. PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存. 扩增产物回收、纯化、测序.

用 Clustal W 软件进行与其他产几丁质酶细菌 DNA 序列的多重比对, 用 Phylip 软件作进化树, 用 Primer 软件推导出其蛋白序列. 最后, 采用在线蛋白质分析软件 ExPASy Proteomics Tools (<http://cn.expasy.org/tools/>), 在线跨膜区分析软件 TMHMM 2.0 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), 对该酶蛋白质结构功能预测分析.

2 实验结果

2.1 分子生物学鉴定

从土样中筛选到的革兰氏阴性细菌, 无论是培养特性, 还是显微形态, 均与嗜麦芽窄食单胞菌 *S. maltophilia* 相象. 用在线的序列差异比较的 Blast 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性分析, 表明该菌 16S rDNA 序列与 *S. maltophilia* LM G11087, S-1 等的 16S rRNA 基因序列完全相同^[12]. 确定该菌株确为 *S. maltophilia* 菌株.

2.2 生长条件与产酶条件

该菌在 pH= 7.0, 30 ℃的条件下, 培养的菌株自 12 h 开始产酶, 酶活力(u) 在震荡培养 60 h 达到最大值, 如图 1, 2 所示. 由均匀设计实验方案研究发酵条件结果是, 在 pH 值为 7.0 的基础培养基中添加

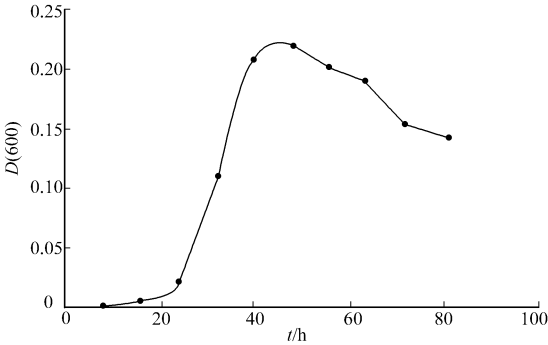


图 1 *S. maltophilia* 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *S. maltophilia*

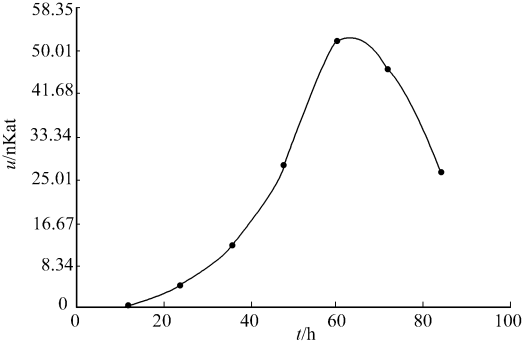


图 2 *S. maltophilia* 的酶活力变化

Fig. 2 Enzyme activity of *S. maltophilia*

加质量分数为 1.0% 的酵母膏, 质量分数为 0.5% 的胶体几丁质, 于 30 ℃摇床(180 r·min⁻¹) 培养 60 h, 几丁质酶的产出最大.

2.3 胞外酶的鉴定

经超声波破壁处理, 处理前后的酶活力无变化, 说明该酶为分泌型胞外酶.

2.4 酶相对分子质量测定

经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析, 酶提取物只显示一条蛋白带, 表明纯化后的几丁质酶为单一组分. 该菌产生的几丁质酶的相对分子质量为 6.8×10^3 .

2.5 酶反应最适温度和最适 pH 值

图 3 为酶反应相对活力(u_r) 与温度(θ) 关系. 由图 3 曲线 1 可知, 50 ℃是几丁质酶酶促反应的最适温度; 而由图 3 曲线 2 可知, 该几丁质酶热稳定性在低于 50 ℃时相对比较稳定. 当温度高于 55 ℃时, 酶活力迅速下降; 而当温度到 60 ℃时, 只保存了 20% 的酶活力. 酶反应活力与 pH 值关系, 如图 4 所示. 由图 4 可知, pH= 7.2 是酶的最适 pH 值. 几丁质酶与标准蛋白质 SDS-PAGE 的电泳结果, 如图 5 所示.

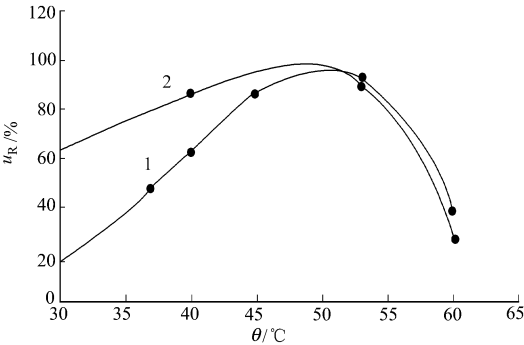


图 3 *S. maltophilia* 几丁质酶的活力与温度关系

Fig.3 *S. maltophilia* chitinase reaction suitable temperature

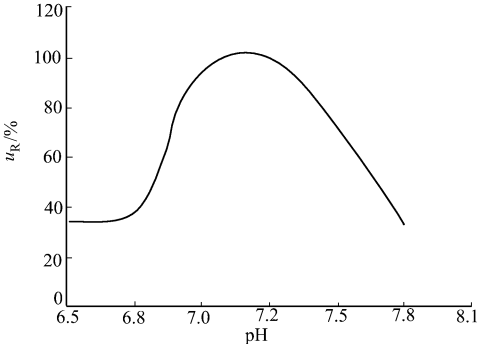


图 4 *S. maltophilia* 几丁质酶的活力与 pH 值的关系

Fig.4 *S. maltophilia* chitinase enzyme's suitable thermostability

2.6 DNA 结构与同源性分析

基因的在线分析, 如图 6 所示. 经同源性分析发现, 在 Gen Bank 中, chiA 的部分片段与 *S. maltophilia* 34S1 的 chiA, *M. xanthus* 的 USC7-1p 和 USC7-2p 基因序列(其中 USC7-2p 为类似几丁质酶基因)、*L. enzymogenes* N47 和 C3 的 chiA 和 4 个未鉴定的细菌几丁质酶基因有较高的同源性. 但是, 与它们大部分片段没有同源性, 与其他来源的几丁质酶基因同源性更低. 该菌与几种产几丁质酶的细菌用 Phylip 软件作进化树, 如图 7 所示.

2.7 蛋白质结构功能分析

根据软件分析预测, 该酶氨基酸序列具有信号肽区(氨基酸残基 1-41)、II 型几丁质结合区(残基 47-92)、多囊肾病域(Polycystic Kidney Disease Domain, 107-194)、类纤维连接蛋白 II 型区(Fn3, 201-

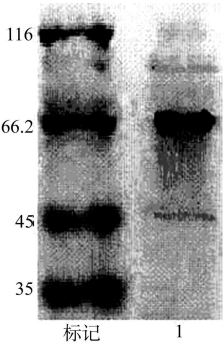


图 5 电泳结果图

Fig. 5 Result of SDS chitinase PAGE

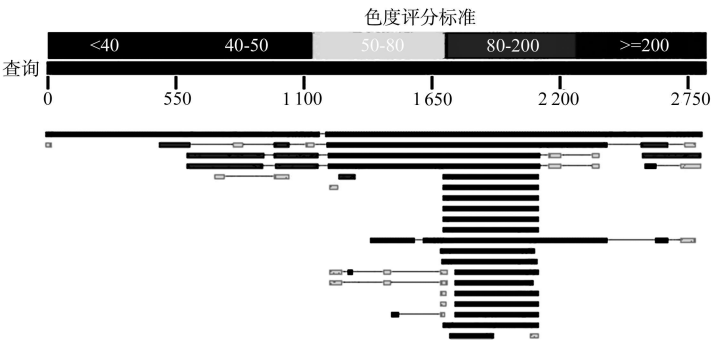


图 6 几种几丁质酶基因序列的比对分析

Fig. 6 The comparison of several chitinase gene sequences

278) 和 18 家族糖基水解域等 5 个结构功能区. 5 个区域被富含 Ala, Gly, Pro, Ser 和 Thr 的短序列连接起来, 在第 400~ 500 个氨基酸残基间有 1 个螺旋结构. 在线跨膜区分析软件 TMHMM 2.0 对其分析表明, ChiA 蛋白前端的信号肽是跨膜信号, 证明该酶是胞外分泌的蛋白. 通过 ExPASy Proteomics Tools 中的 Compute pI/Mw 预测, 该蛋白的等电点为 $pI = 5.42$, 总相对分子质量为 7.24×10^3 , 而去掉信号肽后的相对分子质量为 6.8×10^3 .

3 讨论

很多种细菌都能够产生几丁质酶, 但是不同细菌来源的几丁质酶有不同的分子结构和不同的作用机理. 由于对这些几丁质酶的性质研究不够, 对几丁质的利用和对几丁质酶的开发利用受到严重的制约. 细菌几丁质酶的来源广泛, 种类繁多, 又缺乏足够数量的、提纯的酶制品, 对几丁质酶的物理化学的性质和特性的研究相对还比较少.

嗜麦芽窄食单胞菌(*S. maltophilia*)对多种抗菌药物耐药, 常成为严重的医院内感染菌, 且在非发酵菌中已占到第 3 位^[13]. 对嗜麦芽窄食单胞菌的鉴定目前尚无十分理想的方法, 按一般非发酵菌鉴定, 操作繁琐、费时. 为此利用该菌的 16S rDNA 分子生物学方法成功地进行了鉴别. 有 1 种 C3 菌株的嗜麦芽窄食单胞菌能够分泌几丁质酶, 同时还分泌产生蛋白酶, β 1, 3- 葡聚糖酶和脂肪酶^[8].

本实验通过硫酸铵盐析得到的沉淀, 经过透析处理成酶粗制品, 样品中的蛋白经 SDS- PAGE 凝胶电泳, 确定酶蛋白的相对分子质量为 6.8×10^3 . 该实验结果与应用生物信息学方法研究的结果相互一致. 酶的相对分子质量和最适 pH 与其他细菌几丁质酶有较大的差异^[11, 14], 与测定这些细菌的基因同源性有较大的差异的结果是一致的.

本研究应用生物信息学方法分析表明, ChiA 蛋白前端的信号肽是跨膜信号, 推导该酶是胞外分泌的蛋白, 这已经过实验证实; 对培养的 *S. maltophilia* 菌体经超声波破壁处理, 处理前后酶活力无变化, 说明该酶为分泌型胞外酶.

应用生物信息学方法研究表明, *S. maltophilia* 几丁质酶的结构与大部分已知几丁质酶结构相似, 但是多一个 PKD1 结构区. 由于 Fn3 和 PKD 的结构类似, 在某些细菌糖基水解酶中也发现类似 PKD 的结构区的序列, 因此推测 PKD1 区也参与酶的水解过程. 这还需通过实验验证.

参考文献:

[1] HOLLAK C E M, WEELY S, VAN OVES M H J, et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity, a novel hallmark of Gaucher disease[J]. J Clin Invest, 1994, 93: 1288-1292.

- [2] LORITO M, DIPIETRO A, HAYES C K, et al. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*[J]. Phytopathology, 1993, 83: 721-728.
- [3] DONNELLY L E, BARNES P J. Acidic mammalian chitinase apotential target for asthma therapy[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2004, 25(10): 509-511.
- [4] ROSE M D, WINSTON F, HIETER P. Methods in yeast genetics: A laboratory course manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990
- [5] ALOISE P A, LUMME M, AYNES C A. N-acetyl glucosamine production from chitin waste using chitinases from *Serratia marcescens*[M]. Muzzarelli R A A. Chitin Enzymology. Italy: Nona, 1996: 581-594.
- [6] USUI T, HAYASHI Y, NANJO F, et al. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*[J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 23: 302-309.
- [7] WU M L, CHUANG Y C, CHEN J P, et al. Identification and characterization of the three chitin binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101[J]. Appl Environ Microb, 2001, 67: 5100-5106.
- [8] ZHANG I Z, YUEN G Y. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of bipolar leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3[J]. Biological Control, 2000, 18(3): 277-286.
- [9] 吴志刚, 朱旭芬, 冯俊丽, 等. 气单胞菌几丁质酶的性质与发酵条件[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2003, 30(6): 687-696
- [10] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 香港: 浸会大学, 2000.
- [11] DONALD Y K, RALPH M R, JULIEANN B, et al. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Strain 34S1 and its involvement in biological control[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, (3): 1047-1054.
- [12] MIYAJI T, OTTA Y, SHIBATA T, et al. Purification and characterization of extracellular alkaline serine protease from *Stenotrophomonas maltophilia* Strain S-1[J]. Lett Appl Microbiol, 2005, 41 (3): 253-257.
- [13] MICOZZI A, VENDITTI M, MONACO M, et al. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematological malignancies[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31: 705-711.
- [14] TAKEOMI M, SATOSHI A, TAKESHI H, et al. Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetylglucosamine repeating unit releasing activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 336: 514-520.

Characterization of a Chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia*

HE Yan-cai, LIU Aihua, ZHANG Rong-kui, LIU Zhijiang

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A strain of *Stenotrophomonas maltophilia* which produced extracellular chitinase was isolated from chitin rich soils of shrimp drying fields. The fermentation experiments showed that the suitable chitinase producing media were containing 1.5% colloid chitin and 1.0% yeast extract, and cultured for 60 hours ($180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) in shake flask. The optimal pH and temperature were 7.0 and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The crude enzyme was obtained from the fermentation broth by ammonium sulfate precipitation process, the enzyme optimal temperature was $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH was 7.2, respectively. The stability of chitinase decreased rapidly when the temperature get above $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. The chitinase was 6.8×10^3 by SDS-PAGE analysis. Some properties of this enzyme were deduced by bioinformatics method: this is a secretory protease; its molecular mass is 6.8×10^3 (consistent with the result by extraction chitinase electrophoresis). The predicted pI is 5.42. The enzyme amino acid sequence has five domains: signal peptide (residues 1~41), type III chitin binding domain (Chit-BD3) (residues 47~92), polycystic kidney disease (PKD) domain (residues 107~194), fibronectin type III (Fn3) domain (residues 201~278), and family 18 glycosyl hydrolases (Glyco 18) catalytic domain. Spanning each of the five domains are short sequences full of Gly, Ala, Pro, Ser, and Thr. There is a helix structure between 400th~500th residues.

Keywords: chitinase; *Stenotrophomonas maltophilia*; fermentation culture; molecular structure; bioinformatics

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)