

## 通过 N 端替换提高木聚糖酶的热稳定性

# Improvement of the Thermostability of Xylanase by N-terminus Replacement

杨浩萌<sup>1</sup> 孟 昆<sup>1</sup>, 罗会颖<sup>1</sup>, 王亚茹<sup>1</sup>, 袁铁铮<sup>1</sup>, 柏映国<sup>1</sup>, 姚 斌<sup>1\*</sup>, 范云六<sup>2</sup>

YANG Hao-Meng<sup>1</sup>, Meng Kun<sup>1</sup>, LUO Hui-Ying<sup>1</sup>, WANG Ya-Ru<sup>1</sup>, YUAN Tie-Zheng<sup>1</sup>, BAI Ying-Guo<sup>1</sup>,  
YAO Bin<sup>1\*</sup> and FAN Yun-Liu<sup>2</sup>

1 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

2 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1 Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Biotechnology Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**摘 要** 以来源于 *Thermomonospora fusca* 的耐高温木聚糖酶 TfxA 和来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的高比活木聚糖酶 XYNB 为亲本, 构建出耐热高比活融合木聚糖酶 TB, 将 TB 在大肠杆菌 BL21 和毕赤酵母 GS115 中进行表达并对表达产物的酶学性质进行分析比较。分析表明, 融合蛋白 TB 最适 pH 值为 6.0, 最适温度为 70°C, 较 XYNB 有大幅度的提高; 在热稳定性方面, TB 明显优于 XYNB, 将两种稀释好的酶液分别在 80°C 和 90°C 下热处理 3min, TB 的热稳定性较 XYNB 提高了 6 倍左右; TB 的 pH 稳定性为 5~9 (相对剩余活性在 50% 以上的 pH 范围) 较 XYNB 有所下降, 但两者的比活性基本不变, 保持了亲本 XYNB 的高比活性。通过同源建模和序列比较, 分析了可能影响融合蛋白 TB 酶学性质的因素, 为进一步研究木聚糖酶的结构与功能提供了新的思路。

**关键词** 融合木聚糖酶, 木聚糖酶氮端, 热稳定性

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0026-07

**Abstract** The hybrid xylanase TB was constructed by the substitution of the N-terminus segment of the *Streptomyces olivaceoviridis* xylanase XYNB with corresponding region of *Thermomonospora fusca* xylanase TfxA. The hybrid gene tb, encoding the TB, was correctly expressed in *Escherichia coli* BL21 and *Pichia pastoris* GS115. TB was purified and its enzymatic properties were determined. The results revealed that the optimal temperature and optimal pH of TB were at 70°C and 6.0, which have been obviously improved compared with those of XYNB. The thermostability of TB were all about six-fold of XYNB's after incubating the properly diluted enzyme solutions at 80°C and 90°C for 3min, respectively. The pH stability of TB was 5~9, which was narrower than that of XYNB. Still, TB remains a high specific activity as XYNB does. Analysis of a homology modeling and sequence similarity were used to reveal the factors influencing the enzymatic properties of TB and the discussion for the relationship between structure and function of xylanase was given.

**Key words** hybrid xylanase, N-terminus of xylanase, thermostability

Received: November 8, 2005; Accepted: November 10, 2005.

This work was supported by Grant from Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863 Program (No. 2003AA214030)) and Chinese Key International S&T Cooperation Projects(No. 2004DF060800).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

国家高技术研究与发展计划(863计划)项目(No. 2003AA214030)和国际科技合作重点项目计划(No. 2004DF060800)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的复合酶系。内切  $\beta$ -1,4-木聚糖酶以内切方式水解木聚糖分子中的  $\beta$ -1,4 糖苷键,是一类重要的半纤维素酶<sup>[1]</sup>。按氨基酸序列同源性分类,大多数木聚糖酶属第 F/10、G/11 族糖基水解酶<sup>[2,3]</sup>。对 10 组、11 组木聚糖酶催化区晶体结构的分析表明,第 10 组木聚糖酶催化区形成  $(\beta/\alpha)_8$  桶状结构,而第 11 组木聚糖酶形成  $\beta$ -折叠结构,蛋白整体呈“右手”型。一般第 10 组木聚糖酶有较大的分子量(大于 30kD)及酸性的等电点,而第 11 组木聚糖酶有较小的分子量及碱性的等电点,也有一些来自真菌的木聚糖酶有酸性的等电点。

木聚糖酶可以广泛应用于纸浆工业、饲料工业、食品工业及能源工业等众多领域<sup>[4,5]</sup>。有望在生产实践中应用的木聚糖酶必须具备优良性质,如高比活性的酶可降低应用成本,抗逆性强的酶具有更好的贮存和应用稳定性等。由于在不同领域中应用的木聚糖酶需具有不同的综合性质,而天然酶往往难以满足,因此,有必要利用基因工程技术,有目的地选育、改良木聚糖酶,从而发挥其应用潜力。

对木聚糖酶结构中影响热稳定性的因素进行研究有利于木聚糖酶在生产中的应用。大多数木聚糖酶的最适温度在 50~60℃ 之间。迄今为止,只发现 20 余种细菌和不足 10 种真菌能产耐热木聚糖酶。而嗜热细菌产生的木聚糖酶的最适温度高达 100℃ 以上<sup>[6]</sup>,如栖热袍菌属。值得注意的是现已发现的耐热木聚糖酶中只有 *Thermomonospora fussa* 的 TfxA 属于 G/11 族糖苷水解酶,其它都属于 F/10 族<sup>[6]</sup>。来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 也属于第 11 族木聚糖酶,是一种具有优良性质的高比活木聚糖酶,其编码基因已由本实验室克隆获得<sup>[7]</sup>。因此,我们选择 TfxA 与 XYNB 作为本实验的亲本,希望获得酶学性质有所改善的融合酶,为进一步研究木聚糖酶结构与功能的关系及其应用提供良好的材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

木聚糖酶基因 *xynB* (EMBL 收录号为: AJ292317)由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆<sup>[7]</sup>,木聚糖酶基因 *TfxA* 来源于 *Thermomonospora fussa* 由本实验室保存。大肠杆菌 (*E. coli*) Jm109 和 BL21、克隆质粒 pUC19 和表达质粒 pET22b(+ )均购

自 Novagen 公司。巴斯德毕赤氏酵母 (*P. pastoris*) GS115、载体 pPIC9 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 工具酶和生化试剂

限制酶及 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;引物由上海生物工程公司合成;蛋白质分子量标准为上海生化研究所产品;可溶性木聚糖 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (from Birchwood) 购自 Sigma 公司;分子筛 Superdex 75<sub>HR</sub> 10/30 预装柱购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;其它化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 方法

**1.3.1 木聚糖酶融合基因 TB 的构建:**设计将 TfxA 的前 31 个氨基酸取代 XYNB 的前 33 个氨基酸。根据基因 TfxA 及 *xynB* 相应的核苷酸序列设计引物如下:

F1 5'-t [gaattc] [ccatg] cgt gac ctc caa cga gac cgg gt-3'  
(含 *EcoR* I 及 *Nco* I 的酶切位点)

R3 5'-cca cga ggt gct gta gtt gcc gcc agg gcc cag ctc c-3'  
F2 5'-ggc ggc aac tac agc acc tcg tgg-3'

R4 5'-cgt c [aagctt] tc agc cgc tga ccg tga tgt tg-3'(含 *Hind* III 酶切位点)

R5 5'-taa t [gcccgc] tca gcc gct gac cgt gat gtt gga-3'  
(含 *Not* I 酶切位点)

其中,引物 F1、R3 用于扩增基因 *TfxA* 中的片段 A,作为融合基因 *tb* 的 5'端序列。引物 F2、R4 用于扩增基因 *xynB* 中的片段 B<sub>1</sub>,作为融合基因 *tb* 的 3'端序列,将 A、B<sub>1</sub> 片段混合,让其互为模板及引物进行初步的扩增获得全长的基因片段作为模板,再以引物 F1、R4 扩增出全长的融合基因 *tb*,同时引入 *Nco* I 和 *Hind* III 的酶切位点,PCR 产物酶切后,连接在 pET22b(+ )载体上。

引物 F2、R5 用于扩增基因 *xynB* 中的片段 B<sub>2</sub>,作为融合基因 *tb* 的 3'端序列,将 A、B<sub>2</sub> 片段混合,让其互为模板及引物进行初步的扩增获得全长的基因片段作为模板,再以引物 F1、R5 扩增出全长的融合基因 *tb*,同时引入 *EcoR* I 和 *Not* I 的酶切位点,PCR 产物酶切后,连接在 pPIC9 载体上。

F2、R3 是反向互补的嵌合引物。

### 1.3.2 重组表达载体的构建:

(1)pET22b(+ )-tb 表达载体:通过 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切位点将融合酶基因 *tb* 克隆在 pET22b(+ )

(+)载体上,与信号肽编码序列形成正确的阅读框架。重组质粒进行酶切鉴定,获得正确的表达载体 pET22k(+)-*tb*。

## (2) pPIC9-*tb* 表达载体:

通过 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切位点将融合酶基因 *tb* 克隆在 pPIC9 载体上,从而将目的基因克隆到 *AOX1* 启动子下游,与信号肽编码序列形成正确的阅读框架。重组质粒进行酶切鉴定,获得重组质粒 pPIC9-*tb*。重组质粒 pPIC9-*xynB* 由本实验室保存。

## 1.4 重组木聚糖酶的表达及纯化

### 1.4.1 大肠杆菌中的诱导表达:

将重组质粒 pET22k(+)-*tb* 电击转化大肠杆菌 BL21,挑取阳性转化子。大肠杆菌的培养及酶的诱导表达方法及酶活性测定方法见文献 [8];表达产物的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 分析见文献 [9]。

### 1.4.2 毕赤酵母中的表达:

将重组质粒 pPIC9-*tb* 用 *Bgl* II 酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母 GS115。挑取阳性转化子。重组酵母的培养、诱导表达和检测方法见参考文献 [10]。重组酵母的发酵,具体方法见 Invitrogen 操作手册。对表达的蛋白做 SDS-PAGE 分析。以重组质粒 pPIC9-*xynB* 转化的重组酵母菌株由本实验室保存。

## 1.5 重组木聚糖酶的纯化

酵母发酵上清液(5000r/min, 15min)经 2 倍体积乙醇沉淀,10000r/min 离心 15min,将沉淀冷冻干燥,磨成粉末,取 1g 粉末以 2mL 柠檬酸缓冲液回溶,以透析袋透析,再经过分子筛纯化(citric acid- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, pH5.7),流速 0.4mL/min)得到电泳纯的目标蛋白。对纯化的蛋白做 SDS-PAGE 分析。亲本 XYNB 与 TB 同样进行纯化。

## 1.6 木聚糖酶活性的测定

采用国际通用的 Somogyi-Nelson 法。酶活单位定义:1 个木聚糖酶活性单位(IU)为以 1% 可溶性木聚糖(4-O-Me-D-glucurono-D-xylan, Sigma From Birchwood)为底物,在最适 pH 和最适温度条件下每分钟分解木聚糖生成  $1\mu\text{mol}$  木糖所需的酶量。

## 1.7 酶学性质的分析与比较

将纯化后的融合酶 TB 与 XYNB(同样经毕赤酵母表达并纯化)进行酶学性质的比较研究。测定方法见参考文献 [10]。

## 1.8 同源建模

对 TB 的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成。

## 2 结果

### 2.1 木聚糖酶融合基因 *tb* 的构建

分别以 *tb* 和 *xynB* 为模板,经 PCR 扩增获得目的基因片段 A、B,其长度分别为 0.13kb 和 0.5kb,经过进一步的 PCR 扩增得到的全长的融合基因为 0.6kb,见图 1。将全长融合基因克隆进表达载体,阳性克隆子经测序得到正确预计的融合基因 *tb*。PCR 扩增获得目的基因片段 A、B 其长度分别为 129bp 和 481bp,PCR 扩增到的全长的融合基因长度为 586bp,与电泳结果一致(图 1)。由此推导出其编码的氨基酸序列(图 2)。

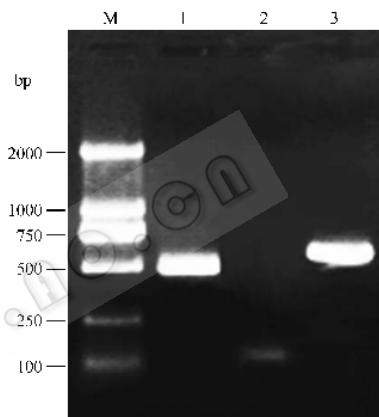


图 1 融合基因 *tb* 片段 A、B 及全长 *tb* 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification of *tb* gene fragments (A and B) and full length gene of *tb*

M: DNA marker; 1: PCR product of fragment A; 2: PCR product of fragment B; 3: PCR product of hybrid gene *tb*.

### 2.2 重组表达载体的构建

构建的大肠杆菌表达载体和毕赤酵母表达载体的示意图见图 3。

### 2.3 重组木聚糖酶的表达及纯化

#### 2.3.1 在大肠杆菌中的表达:

将重组质粒 pET22b(+)-*tb* 电击转化大肠杆菌 BL21,挑取几个阳性转化子进行诱导表达。突变酶在大肠杆菌中得到了表达(图 4),由于一部分表达的蛋白未切掉信号肽,所以有两种分子量不同的表达条带(21kD 和 23kD),该结论由 Western blot 的结果验证,在对应的位置上获得两条杂交条带。大肠杆菌细胞裂解液的酶活性的平均值为 5.2IU/mL,这说明融合酶有正常的木聚糖酶活性。

#### 2.3.2 在毕赤酵母中的表达:

首先在摇床水平上对毕赤酵母重组子进行诱导表达,30°C,0.5% 甲醇诱导 48h 后进行酶活性测定,筛选出高表达菌株用于进一步的发酵罐扩大培养,在摇床水平上表达量最

A	V	T	S	N	E	T	G	Y	H	D	G	Y	F	Y	S	F	W	T	D	
GCC	GTG	ACC	TCC	AAC	GAG	ACC	GGG	TAC	CAC	GAC	GGG	TAC	TTC	TAC	TCG	TTC	TGG	ACC	GAC	
A	P	G	T	V	S	M	E	L	G	P	G	G	N	Y	S	T	S	W	T	N
GCG	CCT	GGA	ACG	GTC	TCT	ATG	GAG	CTG	GGC	CCT	GGC	GGC	AAC	TAC	AGC	ACC	TCG	TGG	ACG	AAC
C	G	N	F	V	A	G	K	G	W	S	N	G	R	R	N	V	Q	Y	S	
TGC	GGG	AAC	TTC	GTC	GCC	GAG	AAG	GGC	TGG	AGC	AAC	GGC	GGA	CGC	AGG	AAC	GTG	CAG	TAC	TCG
G	S	F	Y	P	S	G	N	G	V	L	A	L	Y	G	W	T	S	N	P	L
GGC	AGC	TTC	TAC	CCG	TCC	GGC	AAC	GGC	TAC	CTG	GCG	CTG	TAC	GGG	TGG	ACC	TCG	AAC	CCG	CTC
V	E	Y	Y	I	V	D	N	W	G	N	Y	R	P	T	G	T	Y	K	G	
GTC	GAG	TAC	TAC	ATC	GTC	GAC	AAC	TGG	GGC	AAC	TAC	CGG	CCC	ACC	GGA	ACG	TAC	AAG	GGC	
T	V	T	S	D	G	G	T	Y	D	V	Y	Q	T	T	R	Y	N	A	P	
ACG	GTC	ACC	AGC	GAC	GGC	GGC	ACG	TAC	GAC	GTC	TAC	CAG	ACG	ACG	CGG	TAC	AAC	GCC	CCC	
S	V	E	G	T	K	T	F	N	Q	Y	W	S	V	R	Q	S	R	R	T	
TCC	GTG	GAA	GGC	ACC	AAG	ACC	TTC	AAC	CAG	TAC	TGG	AGC	GTC	CGG	CAG	TCC	AAG	CGG	ACC	
G	G	T	I	T	T	G	N	H	F	D	A	W	A	R	Y	G	M	Q	L	
GGC	GGC	ACC	ATC	ACC	ACC	GGC	AAC	CAC	TTC	GAC	GCC	TGG	GCC	CGC	TAC	GGC	ATG	CAA	CTG	
G	S	F	S	Y	Y	M	I	L	A	T	E	G	Y	Q	S	S	G	S	S	
GGC	AGC	TTC	AGC	TAC	TAC	ATG	ATC	CTC	GCC	ACC	GAG	GGC	TAC	CAG	AGC	AGC	GGC	TCC	TCC	
N	I	T	V	S	G															
AAC	ATC	ACG	GTC	AGC	GGC	TGA														

图 2 TB 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列  
(带边框的氨基酸序列为 XYNB 被 TfxA 的 N 端所替换上的 31 个氨基酸)

Fig. 2 Nucleotide sequence of TB and its deduced amino sequence  
Amino acids framed were from TfxA and the others from XYNB.

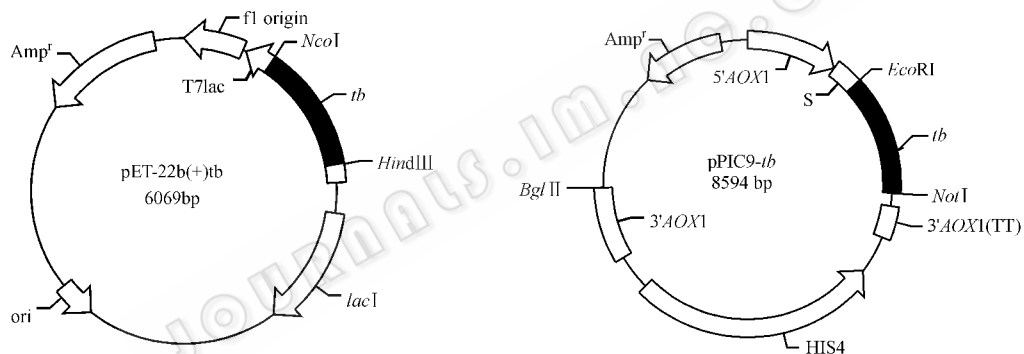


图 3 重组表达质粒 pET-22b(+)-tb 及 pPIC9-tb 的示意图

Fig. 3 Physical map of recombinant expression plasmid pET-22b(+)-tb and pPIC9-tb.

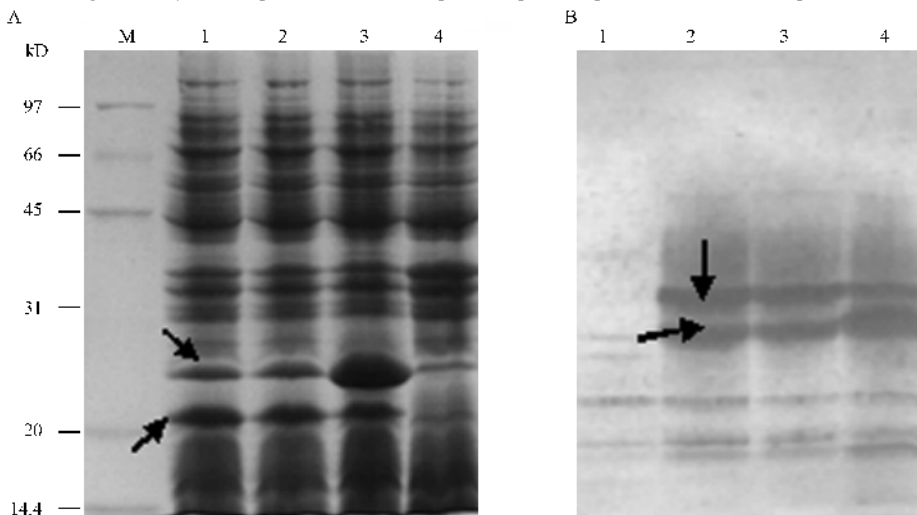


图 4 大肠杆菌表达的木聚糖酶 TB 的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blot analysis of TB expressed in *E. coli* BL21

A: SDS-PAGE; M: protein marker of Low molecular weight; 1~3: three different *E. coli* BL21 recombinants pET22b(+)-tb; 4: *E. coli* BL21 with plasmid pET22b(+); B: Western blot; 1: *E. coli* BL21 with plasmid pET22b(+); 2~4: three different *E. coli* BL21 recombinants pET22b(+)-tb

高的重组子其酶活性达到 42IU/mL。将表达量最高的重组子在发酵罐上培养,随着甲醇诱导时间的延长,发酵上清液中木聚糖酶活力显著增加,酶蛋白不断积累,分别取甲醇诱导 12h,24h,36h,48h,72h,96h,120h 的发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析(图 5)。诱导 120h 后木聚糖酶活性可达 400IU/mL。由于 TB 序列中含有三个潜在的糖基化位点<sup>[11]</sup>(Asn-X-Ser/Thr, X 为任意氨基酸),使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21kD 提高到 31kD,这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致<sup>[10]</sup>。

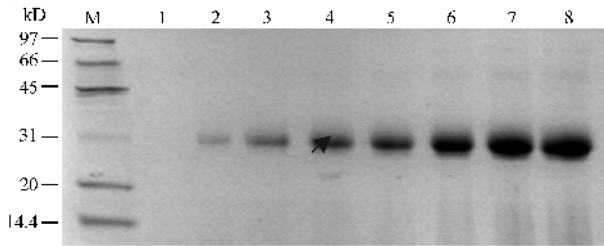


图 5 发酵罐中酵母表达的木聚糖酶 TB 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-GAGE analysis of TB expressed in

*Pichia pastoris* with different induction time

M: low molecular protein marker;

1: the culture supernatant before induction (CK);

2~8: expressed TB after induction of 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h (31kD).

**2.3.3 木聚糖酶 TB 的纯化:**发酵液经过 2 倍体积乙醇沉淀,10000r/min 离心 15min,将沉淀冷冻干燥,磨成粉末,取 1g 粉末以 2mL 柠檬酸缓冲液回溶,上清液的酶活性为 705.5IU/mL,上清液再经透析袋脱盐后,酶活性为 298.39IU/mL,再经过分子筛纯化,得到电泳纯的目标蛋白,酶活性为 151.36IU/mL。最终回收率 21.45%。经纯化后,获得电泳纯的突变酶 TB(图 6),与同样纯化的经毕赤酵母表达的原酶 XYNB<sup>[10]</sup>一起进行酶学性质的比较研究。

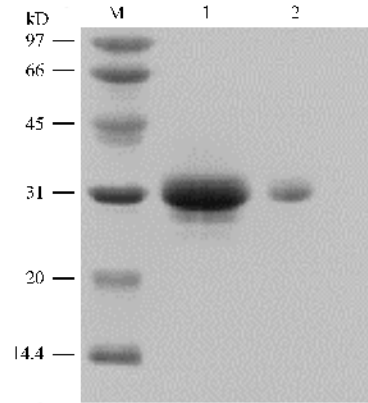


图 6 木聚糖酶 TB 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-GAGE analysis of purified TB

1: crude TB; 2: purified TB.

## 2.5 酶学性质的分析与比较

经过酶学性质的分析与比较,结果表明, TB 的最适 pH 值由 XYNB 的 5.2 提高到 6.0。55℃ 处理 30min 后,相对剩余活力在 50% 以上的 pH 范围从 XYNB 的 4~9 变为 5~9(表 1)。TB 的热稳定性较 XYNB 有很大的提高(图 7),80℃ 分别处理 3min 和 10min, TB 剩余酶活性分别是 72.12% 和 36.73%,而 XYNB 剩余酶活性分别为 12.84% 和 4.32%。在 90℃ 分别处理 1min 和 3min, TB 剩余酶活性为 79.25% 和 33.44%,而 XYNB 剩余酶活性分别为 18.69% 和 5.13%。在热稳定性提高的同时, TB 的最适温度由 XYNB 的 60℃ 变为 70℃(表 1)。

在酶的动力学方面,融合酶 TB 的  $K_m$  值由 XYNB 的 20.87 变成 28.75。 $V_{max}$  较 XYNB 提高了 1 倍,金属离子对 TB 均无影响,而 SDS 对 TB 有轻微的抑制作用。TB 维持了 XYNB 独特的抗胰蛋白酶的特性,而 TB 抗胃蛋白酶的能力则由原来的 95% 下降到 76.45%。TB 的比活性与 XYNB 基本一致。

表 1 木聚糖酶 XYNB 和 TB 的酶学性质比较

Table 1 Comparison of enzymatic properties of XYNB and TB

Properties of enzyme	XYNB	TB
Optimum temperature/°C	60	70
Optimum pH	5.2	6.0
pH stability <sup>1</sup>	4~9	5~9
$K_m$ (g/kg) <sup>2</sup>	20.87	28.75
$V_{max}$ ( $\mu$ mol/mg·min)	4568	9397
Specific activity(IU/mg)	886.89	883.36
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, $Cr^{3+}$ , $Ni^{2+}$ activate slightly	$Zn^{2+}$ , $Mn^{2+}$ inhibit slightly
SDS show no effect on activity	metal ion have no effect on enzymatic activity	SDS inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain about 95% of its activity after treatment by pepsin and trypsin	Retain about 76.45% of its activity after treatment by pepsin; Retain 100% of its activity after treatment by trypsin

1: pH range in which the relative activity was above 50% ;

2: unknown molecular weight of xylan led to the unit of g/kg indicating  $K_m$  value. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

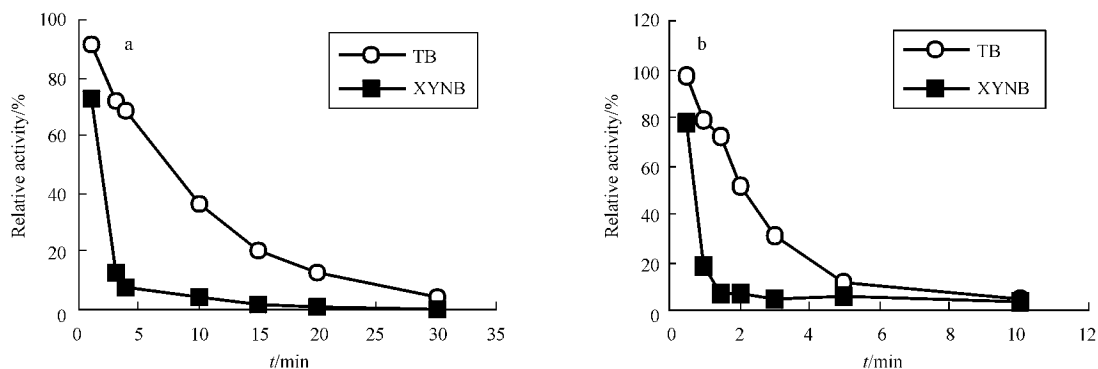


图7 融合酶 TB 和原酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较

Fig. 7 Comparison of thermostability of XYNB and TB

a : thermostability detection after different time of incubation at 80°C ;

b : after different time of incubation at 90°C .

### 3 分析与讨论

来源于 *Thermomonospora fussa* 的木聚糖酶 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的热稳定性在第 11 族木聚糖酶中十分突出,该酶在 75°C 处理 18h,仍能保持 96% 的活性<sup>[12]</sup>。而来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 的热稳定性相对较差,在 70°C 处理 1h,XYNB 剩余酶活性只有 10.28%。木聚糖酶 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 都属于糖基水解酶第 11 家族。通过 BLAST 相似性比较,它们有 81.9% 的相似性,但 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的热稳定性比 XYNB 高。在对 XYNB 和 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的 N 端进行相似性比较时发现,它们 N 端前 33 个氨基酸的相似性只有 48.5%,这说明 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的 N 端可能对它的高热稳定性贡献很大。N 端序列比较的结果见图 8。

进一步的研究发现,T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的 N 端比 XYNB 的 N 端少了两个氨基酸,与 XYNB 相比,TB 的 N 端共有 15 个氨基酸残基发生了改变。其中,V1A、I2V、T4S、F13Y、Y14F、G21A、S24T、N30G 的氨基酸改变属于结构与性质(极性 & 疏水性)相似的氨基酸之间的改变,可能对酶的作用影响不大。而 Q6E、T9Y、N10H、N11D、G22P、T28E、S31P 的氨基酸改变仅从氨基酸的性质上分析,变化是很显著的。下面分别进行分析,从 TB 的二维结构看(图 9),H10、D11 位于 TB 的 β 折叠股 B1 和 B2 之间;P22 位于 TB 的 β 折叠股 B2 和 A2 之间;P31 位于 TB 的 β 折叠股 A2 和 A3 之间。其中,H10、D11 分别为带正电荷和带负电荷的氨基酸,并且空间位置临近,可以形成离子键,提高折叠股 B1 和 B2 的稳定性,从而提高融合酶 TB 的 N 端的热稳定性。同样,P22 和 P31 也位于 β 折叠股的连接处,由于脯氨酸的 N 原子位于吡咯环上,使前一个氨基酸与它形成肽键时(C<sup>α</sup>-N)不能自由转动,

吡咯环还具有疏水性,脯氨酸的这些特性导致它比其它氨基酸的构形熵小,从而降低非折叠区的熵值<sup>[13-15]</sup>,提高它所连接的 β 折叠股的稳定性。

也就是说,与 XYNB 相比,N10H、N11D、G22P、S31P 的变化对提高融合酶 TB 的热稳定性有重要的作用。而且 Q6E、T28E 的变化增加了融合酶 TB 的带电荷氨基酸的数量,使氨基酸相互作用的氢键发生改变,有可能对 TB 的最适 pH 和 pH 稳定性及热稳定性都有一定的影响。

通过同源建模,并结合嗜热木聚糖酶 N 末端芳香族氨基酸疏水作用的结构分析,发现融合酶 TB 的 N 端即来源于 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的一段氨基酸序列,存在着 Y9-F14 芳香族氨基酸的疏水相互作用,我们推测这种作用对稳定木聚糖酶 N 端,提高酶的热稳定性有一定的作用。在对 XYNB 进行单点突变研究时发现<sup>[8]</sup>,T11Y 点突变使突变酶的热稳定性有较大幅度的提高,在 60°C 和 70°C 分别处理 60min 和 10min,突变酶剩余酶活性都在 50% 以上,而原酶 XYNB 剩余酶活性只有 10.28% 和 18.65%。通过对嗜热木聚糖酶 N 末端芳香族氨基酸疏水作用的结构分析表明,T11Y 的点突变使突变酶的 N 端存在着 Y11-Y16 芳香族氨基酸的疏水相互作用,从而提高了 XYNB 的热稳定性。而融合酶 TB 的 N 端天然存在着 Y9-F14 芳香族氨基酸的疏水相互作用,并且从对 XYNB 的热稳定性提高的程度来看,N 端替换的融合酶 TB 比 T11Y 突变酶对提高热稳定性的效果更好,说明除了芳香族氨基酸的疏水相互作用外,还有其他因素如脯氨酸和极性氨基酸的引入,共同影响融合酶 TB 的热稳定性。

总之,以 T<sub>f</sub>x<sub>A</sub> 的 N 端取代 XYNB 的 N 端使融合酶 TB 的疏水性和电负性提高,影响了融合酶的酶

学性质,其具体的机理还需要从蛋白质氨基酸空间位置和相互作用的层面上进行更深入的研究和探讨。

融合木聚糖酶 TB 保持了 XYNB 的高比活性, TB 比亲本 XYNB 的热稳定性提高了 6 倍左右,同时 TB 的 pH 适应范围也较宽,能适应饲料和造纸加工

过程的高温,有很大的应用潜力。

TfxA A VTSN E **TC** YHD **GYFYSFWTDA** P **GVSM** E **L** GP **CG**  
 XYNB ATV **ITTN** Q **TC** TNN **GFYYSFWTDC** G **GSVSM** T **L** NS **GC**

图 8 TfxA 和 XYNB 的 N 端氨基酸的比较

Fig. 8 Comparison of N terminus of TfxA and XYNB

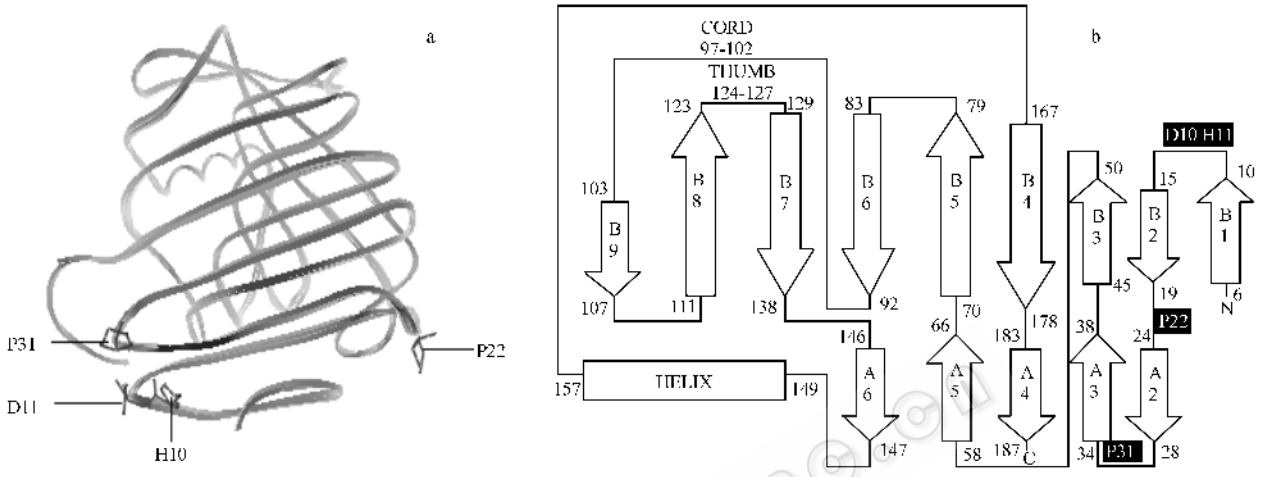


图 9 TB 的分子模型及二级结构

Fig. 9 The molecular model and secondary structures trend of TB

a : The molecular model of TB ; b : The secondary structures trend of TB ;

A2-A6 and B1-B9 ,  $\beta$ -strands ; Helix ,  $\alpha$ -helix ; Cord , cord structure ; Thumb , thumb structure ;B1 ,B2 and A2 is the substituted N-terminal from TfxA ; H10 , D11 ,P22 ,P31 are located between  $\beta$ -strands( shaded ).

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Prade RA. Xylanases : from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev* ,1996 **13** :101 - 131  
 [ 2 ] Liu L , Zhang J , Chen B Shao W. Principle component analysis in F/10 and G/11 xylanase. *Biochem Biophys Res Commun* ,2004 **322** ( 1 ) 277 - 280  
 [ 3 ] Collins T , Gerday C , Feller G. Xylanases , xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* , 2005 **29** ( 1 ) 3 - 23  
 [ 4 ] Huang DF( 黄大昉 ) , Lin M( 林敏 ). *Genic Engineering of Agricultural Microorgnism( 农业微生物基因工程 )* , Beijing : Science Press( 科学出版社 ) , 2001  
 [ 5 ] Subramanian S , Prema P. Biotechnology of microbial xylanases : enzymology , molecular biology , and application. *Crit Rev Biotechnol* , 2002 **22** ( 1 ) 33 - 64  
 [ 6 ] Jiang ZQ( 江正强 ) , Li TL( 李里特 ) , Li Y( 李颖 ). Research progress in the thermostable Xylanase. *China Biotechnology( 中国生物工程杂志 )* , 2003 **23** ( 8 ) 47 - 51  
 [ 7 ] Zhang HL , Yao B , Wang YR *et al.* Characterization , gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. *Chinese Science Bulletin* , 2003 **48** ( 8 ) :761 - 765  
 [ 8 ] Yang HM( 杨浩萌 ) , Yao B( 姚斌 ) , Luo HY( 罗会颖 ) *et al.* Hydrophobic interaction between  $\beta$ -sheet B1 and B2 in xylanase XYNB influencing the enzyme thermostability. *Chinese Journal of*

*Biotechnology( 生物工程学报 )* 2005 **21** ( 3 ) :414 - 419  
 [ 9 ] Sambrook J. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* .2nd ed. New York , Cold Spring Laboratory Press , 1989  
 [ 10 ] He YZ( 何永志 ) , Yao B( 姚斌 ) , Wang YR( 王亚茹 ) *et al.* Overexpression of *streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity and analysis of enzymic properties. *Acta Microbiologica Sinica( 微生物学报 )* , 2004 **44** ( 3 ) 340 - 344  
 [ 11 ] Gu Y( 顾园 ) , Zhu XP( 诸欣平 ) , Wang SH( 王少华 ). Glycosylation of proteins expressed in *Pichia pastaris* . *Chemistry of Life( 生命的化学 )* , 2004 **24** ( 4 ) 353 - 355  
 [ 12 ] Diana I , Elyse DJ , David B *et al.* Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Applied and Environmental Microbiology* , 1994 , **60** ( 3 ) :763 - 770  
 [ 13 ] Matthews BW , Nicholson H , Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfold. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987 , **84** :6663 - 6667  
 [ 14 ] Hardy F , Vriend G , Veltman OR *et al.* Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines. *FEBS Lett* , 1993 , **317** 89 - 92  
 [ 15 ] Watanabe K , Masuda T , Ohashi H *et al* , Multiple proline substitution cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1  $\beta$ -glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline nde. *Eur J Biochem* , 1994 , **220** ( 2 ) 277 - 283