

• 工业生物技术 •

基于 foldon 介导的寡聚化以提高阿魏酸酯酶催化效率

张雷, 雷林超, 张光亚, 李夏兰

华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021

张雷, 雷林超, 张光亚, 等. 基于 foldon 介导的寡聚化以提高阿魏酸酯酶催化效率. 生物工程学报, 2019, 35(5): 816–826.
Zhang L, Lei LC, Zhang GY, et al. Oligomerization triggered by foldon to enhance the catalytic efficiency of feruloyl esterase. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 816–826.

摘要: 将 foldon 结构域与阿魏酸酯酶 C-末端进行融合表达并用组氨酸标签对融合蛋白进行纯化。实现基于 foldon 的寡聚化阿魏酸酯酶及单体阿魏酸酯酶在毕赤酵母 GS115 中表达, 并应用目标蛋白与 foldon 结构域融合可自发形成三聚体结构的特性对阿魏酸酯酶进行改造, 以提高阿魏酸酯酶的催化性能。经纯化获得寡聚化及单体阿魏酸酯酶, 寡聚化阿魏酸酯酶表观分子量约为 110 kDa, 单体阿魏酸酯酶表观分子量为 40 kDa; 寡聚化阿魏酸酯酶的最适反应温度和 pH 分别为 50 °C 和 5.0, 而单体阿魏酸酯酶则分别为 50 °C 和 6.0。寡聚化阿魏酸酯酶的底物亲和力 (K_m) 及催化效率 (k_{cat}/K_m) 较单体阿魏酸酯酶分别提高 3.42 倍和 7.57 倍。结果表明, 寡聚化及单体阿魏酸酯酶均成功表达, 且寡聚化阿魏酸酯酶在底物亲和力和催化效率上具有明显优势, 该提高阿魏酸酯酶催化效率的方法简单、高效, 有很好的应用前景。

关键词: 阿魏酸酯酶, 寡聚化, foldon, 催化性能, 酶工程

Oligomerization triggered by foldon to enhance the catalytic efficiency of feruloyl esterase

Lei Zhang, Linchao Lei, Guangya Zhang, and Xialan Li

College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: A new method to express oligomerized feruloyl esterase (FAE) in *Pichia pastoris* GS115 to improve the catalytic efficiency was developed. It was realized by fusing the foldon domain at the C-terminus of FAE, and the fusion protein was purified by histidine tag. Fusion of the feruloyl esterase with the foldon domain resulted spontaneously forming a trimer FAE to improve the catalytic performance. The oligomerized FAE and monomeric FAE were obtained by purification. The apparent molecular weight of the oligomerized FAE was about 110 kDa, while the monomeric FAE about 40 kDa, and the optimum temperature of the oligomerized FAE was 50 °C, which is the same as the monomeric one. The optimal pH of the oligomerized FAE is 5.0, while the optimal pH of the monomer FAE is 6.0. When compared with the monomeric ones, the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the oligomerized FAE increased 7.57-folds. The catalytic constant (k_{cat}) of the oligomerized

Received: November 7, 2018; **Accepted:** January 17, 2019

Supported by: Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01065).

Corresponding author: Xialan Li. Tel: +86-592-6162300; E-mail: xialan@hqu.edu.cn

福建省自然科学基金 (No. 2017J01065) 资助。

网络出版时间: 2019-04-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190415.0938.001.html>

FAE increased 3.42-folds. The oligomerized FAE induced by foldon have advantages in the catalytic performances, which represents a simple and effective enzyme-engineering tool. The method proposed here for improving the catalytic efficiency of FAE would have great potentials for improving the catalytic efficiency of other enzymes.

Keywords: feruloyl esterase, oligomerization, foldon, catalytic efficiency, enzyme engineering

阿魏酸酯酶 (Feruloyl esterase E.C 3.1.1.73, FAE) 是羧酸酯酶的一个亚类, 它能水解植物细胞壁中阿魏酸与多糖之间连接的酯键, 释放阿魏酸^[1-2]。FAE 可以协同木质纤维降解酶, 如木聚糖酶、纤维素酶及木质素酶, 破坏木质纤维的致密网状结构, 促进木质纤维降解^[1-4]。但报道的 FAE 的催化性能有待提高, 需对酶进行改造^[5-7]。以定点突变和定向进化为代表的蛋白质工程技术已经成功地筛选了具有优化特性的酶, 但这些方法在改造酶时仍存在困难, 如突变体库的建立和大量筛选工作^[8]。而通过固定化或化学修饰, 有时也能提高酶的性能, 但存在酶在固定化过程中会引起酶失活、首次固定化成本高、与大分子底物反应较困难等缺点^[9]。

蛋白质的结构决定其功能, 可通过蛋白质工程对蛋白质进行改造以获取蛋白质的新功能^[10]。寡聚化是许多蛋白质自我联合成寡聚体以获得功能优势的一种常用方式^[11]。寡聚化能够为目标酶提供多种功能优势, 如提高热稳定性、pH 耐受性、蛋白质分子结构稳定性及催化性能等^[12-14]。Foldon 是来源于 T4 噬菌体纤维蛋白 C-末端, 由 27 个氨基酸 (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL) 组成, 该结构域由 3 个相同亚基构成, 每个亚基包含 1 个 β -发夹结构^[15]。通过基因融合, 该结构域可与目标酶人工连接以改变其性质。几种工程蛋白的热力学稳定性, 如短胶原纤维^[16]、HIV1 包膜糖蛋白^[17], 均已通过 foldon 结构域的附着而得到增强。由 COMP 和 foldon 诱导形成的寡聚体通常可导致热稳定性的提高^[11,18]。Can 等^[13]将 foldon 与抗冻蛋白进行连接后形成寡聚化同型抗冻蛋白且提高了冰晶表面结合的抗冻蛋白浓度,

使其活力显著增加。本课题组在 FAE 的 C-末端融合 foldon, 从而诱导酶自发形成三聚体, 构成寡聚化阿魏酸酯酶, 并对重组 FAE 的表达和其酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115、载体 pPIC9K 购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性内切酶 (*Sna*B I、*Not* I、*Sac* I)、T4 DNA 连接酶购自美国 Thermo Fisher 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 标准蛋白质 Marker (10–170 kDa)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、蛋白质快速银染试剂盒购自上海碧云天生物技术研究; 阿魏酸甲酯购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯产品。MD 培养基、YPD 种子培养基、BMGY 种子培养基、BMMY 诱导培养基按美国 Invitrogen 公司的毕赤酵母操作表达手册配制。

1.1.3 主要器材

纳米激光粒度仪 (英国 Malvern 仪器公司); 200 目铜网 (中科镜仪有限公司); 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); 超高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司)。

1.2 表达载体的构建

在 UniPort 数据库中筛选酶活较高的 FAEO42807, 该 FAE 是从黑曲霉 *Aspergillus niger*

CBS120.49 中分离得到的^[1]。根据 FAEO42807 的氨基酸序列, 以毕赤酵母标准密码子优化设计 FAE 的基因序列, 并在基因序列 N 端设计 His 标签后, 两端引入 *Sna*B I、*Not* I 酶切位点, 化学合成基因序列 *His-fae*。用 *Sna*B I、*Not* I 分别双酶切成基因序列 *His-fae* 和质粒 pPIC9K, 胶回收双酶切片段后用 T4 DNA 连接酶连接并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。筛选出的阳性克隆子由 Sangon 测序, 测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K/*His-fae*。另, 将 *foldon* 基因与 *fae* 序列的 C-末端直接融合, 用相同方法构建重组质粒, 命名为 pPIC9K/*His-fae-foldon*。基因与蛋白质示意图如图 1 所示。

1.3 重组 FAE 在毕赤酵母中的表达和纯化

重组质粒用 *Sac* I 线性化, 电转化至 *P. pastoris* GS115 感受态后, 涂布于 MD 平板上筛选重组子, 取 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至 YPD 摇瓶中, 过夜培养后提取其基因组 DNA, 利用通用引物 5'AOX、3'AOX 进行 PCR 鉴定。重组质粒的诱导表达参见毕赤酵母操作表达手册。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 粗酶液用镍层析柱进行纯化, 纯化后用 Bradford 法测定蛋白质量浓度, SDS-PAGE 分析纯化后的酶液。

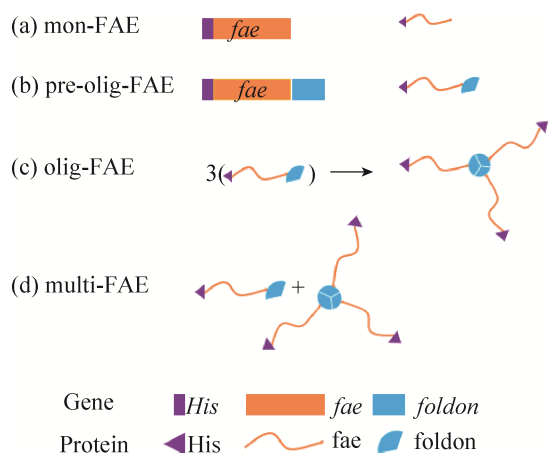


图 1 基因与蛋白质示意图

Fig. 1 A schematic of gene and corresponding protein structures. Olig-FAE is a trimer structure formed by the monomer pre-olig-FAE while protein is expressed; multi-FAE contains both mon-FAE and olig-FAE.

1.4 重组 FAE 酶活力测定

高效液相色谱法测定 FAE 酶活力^[19]。空白对照为煮沸失活的酶液。酶活力单位为在 25 °C、pH 6.0 的条件下 1 min 生成 1 μ mol 阿魏酸所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5 重组 FAE 酶学性质的研究

以下实验所用的酶液, mon-FAE 酶活力为 (251 \pm 7.61) U/L, 比活为 (0.36 \pm 0.011) U/mg, multi-FAE 酶活力 (441 \pm 12.7) U/L, 比活为 (1.63 \pm 0.045) U/mg。

1.5.1 最适反应温度的测定

取 250 μ L 酶液保温 5 min 后, 加入 250 μ L 阿魏酸甲酯溶液 (由 pH 值为 6.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液配制), 在 40–65 °C 中反应 10 min, 测定重组 FAE 的酶活力。以所测的最高酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.5.2 温度稳定性的测定

将酶液置于 30–50 °C 下保温 12 h, 每隔 3 h 取样测定残留酶活力, 以保温 0 h 所测定的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.5.3 最适反应 pH 值的测定

取 250 μ L 酶液于 50 °C 保温 5 min 后, 加入 250 μ L 的阿魏酸甲酯溶液 (0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液调节 pH 值在 3.0–8.0 之间), 50 °C 下反应 10 min, 测定重组 FAE 的酶活力。以所测的最高酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.5.4 pH 值稳定性的测定

将酶液置于 0.2 mol/L、pH 值为 3.0–8.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中, 50 °C 保温 2 h, 取 250 μ L 保温酶液, 向其加入 250 μ L 阿魏酸甲酯溶液, 50 °C 下反应 10 min, 测定重组 FAE 残留酶活力, 以各 pH 值的 0 h 酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.5.5 金属离子对重组 FAE 酶活力的影响

将酶液与含有 10 mmol/L 的各种金属离子

(Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液 (pH 6.0) 混合, 于 50°C 保温 2 h, 测定残留酶活, 以不添加金属离子所测得的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.5.6 动力学常数的测定

米氏常数的测定: 取 8 支试管, 每管都加好 200 g/L 阿魏酸酯甲酯溶液和 0.2 mol/L、pH 6.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液, 在 25°C 下预热 3 min, 用同一管酶液依次加样, 依次在酶作用 1–30 min 时测定酶活力, 然后算出酶活力与反应时间的比值, 在一定时间内比值保持稳定, 则在此时间内酶作用为一级反应, 此时间即可确定为测 K_m 值和 V_{\max} 的反应时间。用不同浓度的底物, 在 0.2 mol/L、pH 6.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲体系中, 25°C 下反应一定时间, 测定酶活, 计算相应的反应速度, 利用米氏方程双倒数法求得 K_m 值及 V_{\max} 。

1.6 重组 FAE 蛋白粒径的测定

重组 FAE 的粒径大小由纳米激光粒度仪测定^[20]。配置的参数: 散射角 173° 、HeNe 激光器 633 nm、输出功率 10 mW, 使用内置温度将样品控制在特定温度 ($25\text{--}65^\circ\text{C}$), 并在进行测定之前将样品在相应温度下稳定 5 min; 粒径大小为样品颗粒大小平均值。

1.7 重组 FAE 透射电子显微镜分析

将 5 μL 适量浓度蛋白质样品滴加到碳支持膜涂覆的 200 目铜网格上并温育 5 min, 过量的蛋白质样品用滤纸进行印记干燥。网格用两个 20 μL 水洗涤并印记干燥, 25 μL 2% 乙酸铀酰滴 30 s, 印记干燥后使用透射电子显微镜在 100 kV 下观察样品, 并使用 CCD 照相机记录电子显微照片。

2 结果与分析

2.1 重组 FAE 转化子的 PCR 鉴定与筛选

分别以 pPIC9K/His-fae 和 pPIC9K/His-fae-foldon 的基因组为模板, 用 5'AOX1 和 3'AOX1

引物进行 PCR 验证, PCR 产物用 1% 的凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示。以 pPIC9K/His-fae 转化子基因组为模板进行 PCR, 泳道 1、2、4、6–8 得到一条约 800 bp 的 His-fae 片段, 显示目的基因 His-fae 已经成功整合到这些转化子基因组中, 以 pPIC9K/His-fae-foldon 转化子基因组为模板进行 PCR, 泳道 11、15–18 得到一条约 900 bp 的 His-fae-foldon 片段, 显示目的基因 His-fae-foldon 已经成功整合到这些转化子基因组中。

2.2 重组 FAE 的表达和纯化

挑取上述阳性转化子, 按照 1.3 进行培养和诱导表达, 测定其酶活力, 挑选实验中产酶活力最高的转化子。取其发酵上清液纯化后进行 SDS-PAGE 分析。对于 pPIC9K/His-fae, 如图 3A 所示, pPIC9K/His-fae 发酵上清液纯化后, 40 kDa 处得到一条清晰条带, 而且几乎没有杂条带, 初步说明 mon-FAE 得到成功表达。图 3A 显示 mon-FAE 的表观相对分子质量明显大于其理论值 (29.97 kDa), 主要原因是 FAE 蛋白序列的 N 端有一个糖基化位点, 而毕赤酵母表达外源蛋白时, 会对其进行糖基化修饰, 从而使相对分子质量增大^[21]。对于 pPIC9K/His-fae-foldon, 如图 3B 所示, pPIC9K/His-fae-foldon 发酵上清液纯化后, SDS-PAGE 结果显示的 pre-olig-FAE 表观相对分子质量明显大于其理论值 (33.04 kDa); olig-FAE 表

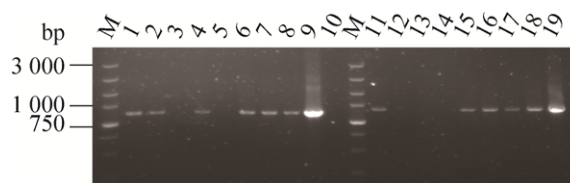


图 2 重组 FAE 转化子的 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map of the PCR analysis of recombinant FAE. Lane M: marker; lane 1–8: pPIC9K/His-fae transformants as template; lane 9: pPIC9K/His-fae plasmid as template; lane 10: sterile water as control; lane 11–18: pPIC9K/His-fae-foldon transformants as template; lane 19: pPIC9K/His-fae-foldon plasmid as template.

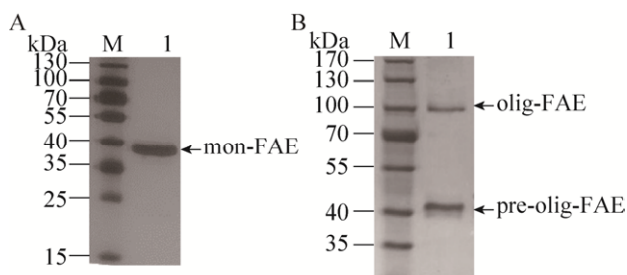


图3 SDS-PAGE 分析产物表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant FAE. (A) pPCI9K/His-fae. (B) pPCI9K/His-fae-foldon.

观相对分子质量明显大于其理论值 99.12 kDa, 其原因与 mon-FAE 表观分子质量大于其理论值原因相同。且理论上, pPCI9K/His-fae-foldon 上清发酵液应仅在三聚体位置即 110 kDa 处出现一条条带, 而 pPCI9K-/His-fae-foldon 发酵上清液在单体 (pre-olig-FAE) 45 kDa 处和三聚体 (olig-FAE) 110 kDa 处均出现条带, 原因可能是由于空间位阻效应, 导致部分 pre-olig-FAE 未寡聚化, 仍以 pre-olig-FAE 单体存在。

比较了 mon-FAE 和 multi-FAE 的酶活力及比活性 (表 1), 发现 multi-FAE 的酶活力和比活力相比 mon-FAE 有小幅度提高。这些结果表明 foldon 在 FAE 的 C-末端融合有利于提高 FAE 的酶活力及比活力。

2.3 FAE 寡聚化过程的研究

文献报道, foldon 结构域与蛋白进行融合表达时, 寡聚化的蛋白极易受到温度的影响, 并在 40 °C 开始发生少量解聚, 当温度上升至 60 °C 以上时, 寡聚化结构蛋白完全解聚, 当温度介于二者之间时, 寡聚蛋白部分解聚, 两种蛋白同时存在^[22], 本课题组也证明了此结果。在本实验过程

表 1 重组酶的酶活性测定

Table 1 Enzyme activity of the recombinant FAE

Recombinant protein	Activity (U/L)	Total protein (mg/L)	Specific activity (U/mg)
Mon-FAE	251±7.61	698±12.8	0.36±0.011
Multi-FAE	441±12.7	271±8.83	1.63±0.045

中, 为考察 olig-FAE 在不同温度条件下的解聚情况, 分别将目标蛋白与蛋白上样缓冲液按 5 : 1 (V/V) 混合并在 25 °C、40 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、100 °C 条件下分别水浴 5 min 后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示。结果表明环境温度为 25 °C 时, 45 kDa 处的蛋白条带为由于空间位阻作用未形成寡聚化结构的 pre-olig-FAE, 且蛋白条带较细; 110 kDa 处为形成寡聚化结构的 olig-FAE, 该温度下, olig-FAE 还未发生解聚。当温度为 40 °C 时, 45 kDa 处的蛋白条带 pre-olig-FAE 相比于 25 °C 时的蛋白条带较粗, 说明 olig-FAE 开始发生部分解聚, 且随着温度的升高, 45 kDa 处的蛋白条带 pre-olig-FAE 逐渐加粗, 说明 olig-FAE 解聚量不断增加。在 60 °C 及以上温度时 110 kDa 处的蛋白条带 olig-FAE 已完全消失, SDS-PAGE 显示仅有一条 45 kDa 的条带, 说明寡聚化酶完全解聚。但实验过程发现, 解聚过程中在 45 kDa 单体位置有 2 条非常靠近的条带 (图 4), 因此, 将经镍柱纯化后的浓度为 1 mg/mL 的酶液送样至上海中科新生命生物科技有限公司进行 MOTIF/TOF 质谱分析, 结果显示仅在 425 174.0 出现一个峰, 故判定图 4 单体位置的两条非常靠近的条带为同一物质。

使用动态光散射 (DLS) 对不同温度时重组 FAE 的粒径进行了测定, 结果显示在 25 °C 时分别在 6.57 d.nm 处以及 52.74 d.nm 处有 2 个峰,

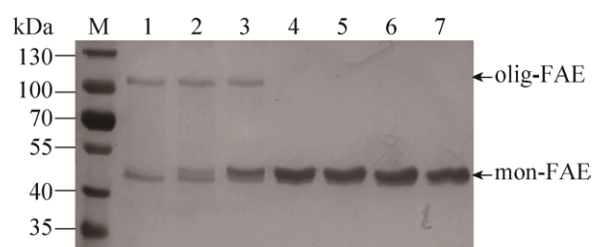


图 4 olig-FAE 随温度变化聚集情况 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of olig-FAE aggregation as temperature change. M: protein molecular weight marker; lane 1: 25 °C; lane 2: 40 °C; lane 3: 55 °C; lane 4: 60 °C; lane 5: 65 °C; lane 6: 70 °C; lane 7: 100 °C.

且随温度的升高 6.57 d.nm 处的粒径出峰值变化不大, 范围在 6.5–8.5 d.nm 之间, 而 52.74 d.nm 处的粒径出峰值会随着温度的变化而逐渐变小, 由于寡聚化结构 foldon 随温度的升高而逐渐解聚, 平均粒径逐渐变小, 所以判断该处为 olig-FAE 出峰处, olig-FAE 随温度变化的粒径结果见图 5。从图中可以看出, 随着温度升高, olig-FAE 的平均粒径逐渐变小, 且温度升高至 65 °C 时, olig-FAE 的平均粒径由 25 °C 时的 52.74 d.nm 降低为 10.62 d.nm, 与 mon-FAE 所测得的平均粒径 (9.54 ± 2.12) d.nm 相近, 证明 65 °C 时 olig-FAE 已全部解聚为单体结构。

本实验还采用透射电子显微镜图像进一步探究在 25 °C 时 olig-FAE 的蛋白结构性质, 为了便于观察 olig-FAE 的蛋白结构, 将样品稀释至 0.15 mg/mL, 电镜结果如图 6 所示。图 6 中显示在负染色液包裹范围中有接近球形形态的颗粒聚集在一起, 形成寡聚化结构。

2.4 重组 FAE 的酶学性质

2.4.1 最适温度及温度稳定性的测定

探究在 40–65 °C 时酶反应的最适温度, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, mon-FAE 与 multi-FAE 最适温度均为 50 °C, 且 50 °C 之前, 两者的酶活

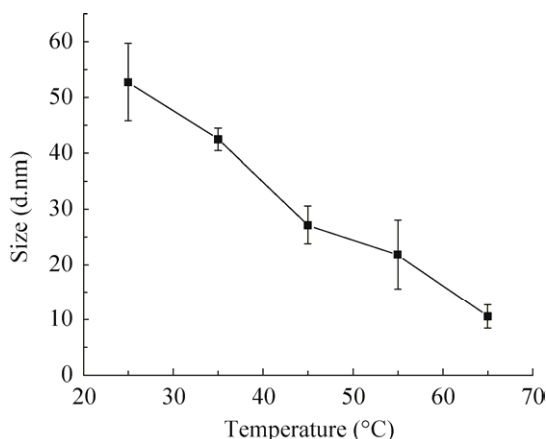


图 5 温度对 olig-FAE 粒径的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the particle size of olig-FAE.

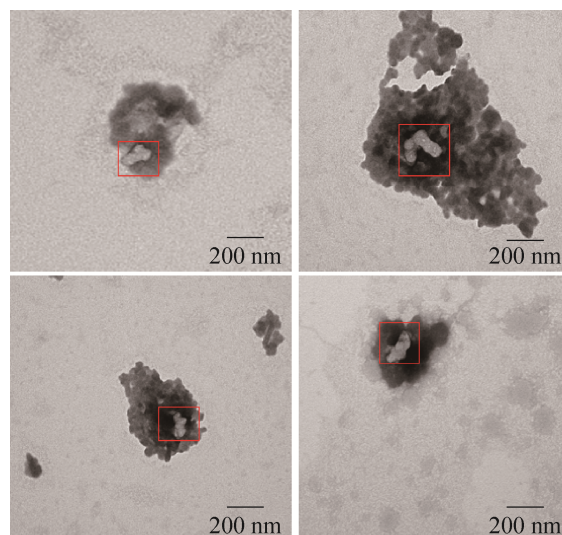


图 6 Olig-FAE 的 TEM 图像

Fig. 6 TEM image of olig-FAE.

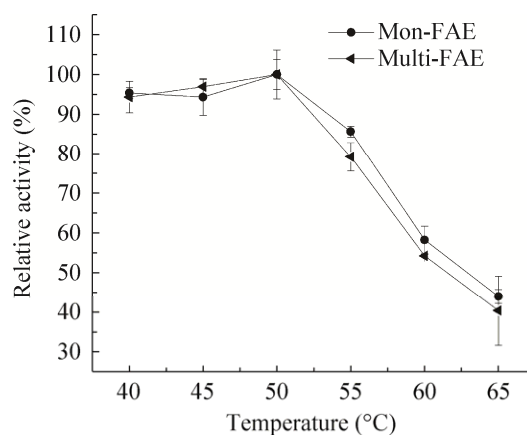


图 7 重组 FAE 的最适温度

Fig. 7 Effect of temperature on the activity of recombinant FAE.

均较高, 相对酶活都在 90% 以上。超过 50 °C 后, 两者的酶活力下降均较快, 可能是随着温度的升高, 酶出现失活现象。

将重组 FAE 在 30–55 °C 保温 0、3、6、9、12 h 后, 测定其残余酶活, 结果如图 8 所示。mon-FAE 及 multi-FAE 在 30–55 °C 温度下, 随着保温时间的延长, 酶活力均逐渐下降。30–40 °C 保温 12 h 后, 酶活力为初始酶的 70% 左右, 且 multi-FAE 与 mon-FAE 酶活力相比较为高一些, 在

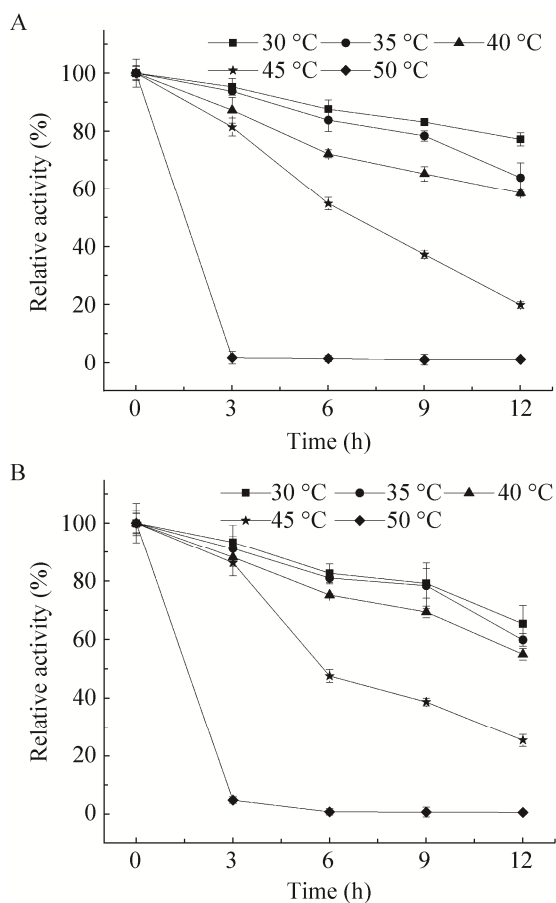


图 8 重组 FAE 的温度稳定性

Fig. 8 Effect of temperature on the stability of recombinant FAE. (A) mon-FAE. (B) multi-FAE.

40 °C 以后, multi-FAE 及 mon-FAE 的酶活力均下降较快, 且在 50 °C 保温 3 h 后, 基本丧失酶活。

2.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性的测定

重组酶的最适 pH 结果如图 9 所示。由图 9 可知, mon-FAE 的最适 pH 值为 6.0; multi-FAE 的最适 pH 值为 5.0。重组酶的 pH 值稳定性结果如图 10 所示。由图 10 可知, pH 值为 3.0–6.0 时, 随着 pH 增大, mon-FAE 的稳定性随之增大, pH 值为 6.0 时, mon-FAE 的 pH 稳定性最高, pH 值大于 6.0 时, mon-FAE 稳定性逐渐下降; pH 值为 3.0–5.0 时, 随着 pH 增大, multi-FAE 的稳定性随之增大, pH 值为 5.0 时, multi-FAE 的 pH 稳定性最高, pH 值大于 5.0 时, multi-FAE 的稳定性逐

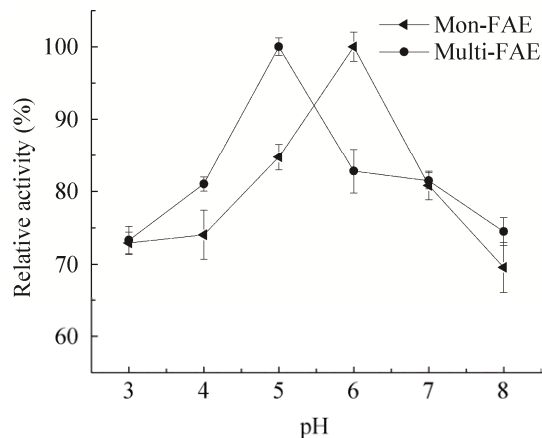


图 9 重组 FAE 的最适 pH

Fig. 9 Effect of pH value on the activity of recombinant FAE.

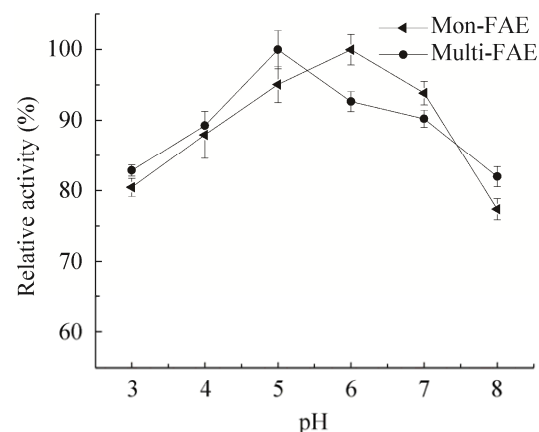


图 10 重组 FAE 的 pH 稳定性

Fig. 10 Effect of pH value on the stability of recombinant FAE.

渐下降。multi-FAE 对 pH 值较敏感, 这可能是由于 pH 值影响了 FAE 的寡聚化程度, 从而影响了酶的稳定性^[23]。

2.4.3 金属离子对重组 FAE 的影响

金属离子对重组酶活力的影响见表 2, 对于 mon-FAE, Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 有促进作用, K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对其有一定的抑制作用, 而 Zn^{2+} 对其有显著的抑制作用。对于 multi-FAE, Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对其有促进作用, K^+ 对其有一定的抑制作用。

表 2 金属离子对重组 FAE 的影响

Table 2 Influences of metal ions chemicals on the activity of the FAE

Metal ion (10 mmol/L)	Mon-FAE relatively activity (%)	Multi-FAE relatively activity (%)
Control	100±1.73	100±0.91
Mn ²⁺	103±1.22	105±0.51
Mg ²⁺	103±3.27	107±2.96
Zn ²⁺	77.6±1.76	107±4.21
K ⁺	95.1±1.47	94.5±0.42
Ca ²⁺	91.7±2.31	103±1.98
Fe ³⁺	92.4±5.13	116±4.21
Cu ²⁺	90.1±5.14	105±1.71

2.4.4 动力学常数的测定

由于 olig-FAE 随温度升高会逐渐解聚为 pre-olig-FAE, 故在 25 °C 测定动力学常数, 见表 3。其中 multi-FAE 的 K_m (1.03±0.02) 与 mon-FAE (4.55±0.07) 相比较小, 说明 multi-FAE 的底物亲和力和较 mon-FAE 有所提高, 且提高倍数为 3.42 倍; multi-FAE 的 k_{cat}/K_m (3.94±1.12) 与 mon-FAE (0.46±0.063) 相比较小, 说明 multi-FAE 的催化效率较 mon-FAE 有明显提高, 且提高倍数为 7.57 倍; 同时, multi-FAE 的 k_{cat} 、 V_{max} 较 mon-FAE 均有所提高。其他研究人员的报道也存在类似的结果, 例如, Yang 等^[24]将寡肽与碱性淀粉酶的 N-末端融合, AmyK-p1 的比活性和催化常数 (k_{cat}) 分别增加 4.1 倍和 3.5 倍, 他们认为提高催化效率和比活性的主要原因是由肽的活性部位周围诱导更大的灵活性, 同时寡聚化酶与底物的“邻近效应”,

表 4 分子工程改造对 FAE 性质的影响

Table 4 The effect of molecular engineering on the properties of FAE

Molecular engineering methods	K_m	k_{cat}/K_m	References
DNA shuffling and site-directed mutagenesis	–	Increase 12.8-folds	[25]
Site-directed mutagenesis	Decrease 0.62-folds	Increase 10-folds	[26]
Directed evolution	Decrease 0.39-folds	Increase 1.9-folds	[27]
Random mutagenesis	Decrease 0.73-folds	Increase 1.05-folds	[28]
Introduce an extra disulfide bridge	Increase 1.65-folds	Increase 0.58-folds	[29]
Immobilization	Similarly	Decrease 10-folds (k_{cat}) (SiO ₂) Increase 1.23-folds (k_{cat}) (Fe ₃ O ₄)	[30–31]
Protein oligomerization	Decrease 3.42-folds	Increase 7.57-folds	This paper

表 3 重组 FAE 动力学常数的测定

Table 3 Determination of kinetic parameters of recombinant FAE

	Mon-FAE	Multi-FAE
V_{max} (mmol/(mL·s))	3.45±0.14	5.79±0.37
K_m (mg/mL)	4.55±0.07	1.03±0.02
k_{cat} (s ⁻¹)	2.28±2.14	4.35±0.97
k_{cat}/K_m (mg/(mL·s))	0.46±0.63	3.94±1.12

使酶的活性中心部位更集中, 其底物浓度也大大高于溶液中的底物浓度, 从而提高其催化效率。

3 讨论

阿魏酸酯酶可在工农业、食品制造、医药等领域都发挥巨大的作用。为了商业应用, 已有很多提高 FAE 酶催化性能的报道, 并与本文研究结果相比, 结果见表 4。

文献[25]报道应用 DNA 改组策略和定向突变后, 催化效率提高 12.8 倍。文献[26]报道应用 PoPMuSiC 算法预测氨基酸取代的折叠自由能变化, 通过定点诱变取代 4 个氨基酸, 双突变体 D93G/S187F 显示出 k_{cat}/K_m 增加了 9 倍。文献[28]报道进行两轮随机诱变获得热稳定突变体 M6, M6 的 k_{cat}/K_m 值提高 1.9 倍。文献[29]报道使用 MODIP 和 DbD 两种计算工具来预测蛋白质中可能存在的用于热稳定性改善的二硫键, 引入额外的二硫桥对 FAE 实施改造, 并使用分子动力学模拟来设计额外的二硫桥, 选择一个残基对

A126-N152 突变为半胱氨酸。突变型 AuFaeA 的最适温度提高了 6 °C, 半衰期在 55 °C 和 60 °C 分别提高 12.5 倍和 10 倍, 催化效率 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) 与野生型 AuFaeA 相似。文献[30]报道利用介孔二氧化硅材料作为固定支持物, 通过物理吸附将 FAE 固定在介孔二氧化硅上, 并通过改变支持孔径、固定缓冲液和 pH 来优化固定条件, 实现最大负载和最大活性, 在 10 次酯交换反应后, 保留了其 20% 以上的活性, K_{m} 不受固定化的影响, 但是 k_{cat} 减少了 10 倍。值得一提的是本文报道的基于 foldon 引导的寡聚化 FAE 25 °C 半衰期提高 55.5%, K_{m} 减小了 3.42 倍, 催化效率提高了 7.57 倍。文献中这些方法虽在不同程度上提高了酶活性, 但是定点诱变需要对酶结构和功能之间的关系有清楚的了解^[32], 定向进化需要一种简单而有效的高通量筛选方法^[33], 化学修饰可能通过改变活性位点中的活性构象或必需残基而引起酶活性的意外丧失^[34]。

本文的方法条件温和, 操作简单, 并不需要从突变文库筛选目标酶。与 mon-FAE 相比, multi-FAE 底物亲和力以及催化效率显著提高, 这可能是由于寡聚化结构域 foldon 具有高固定浓度从而减少焓相互作用, 加速了催化效率^[16], 且寡聚化酶分子的局部浓度增加, 也加速了活性位点和底物的接触^[35]。但是很遗憾, 因为空间位阻作用, pre-olig-FAE 未完全形成寡聚化, pre-olig-FAE 与 olig-FAE 中都含有 His 标签, 且两者的相对分子质量相差仅仅 66 kDa, 表达量也有限, 本实验室目前还无法将 olig-FAE 纯化, 但 multi-FAE 因含有寡聚化的 olig-FAE, 与 mon-FAE 相比, 酶催化效率已有很大的提高。本课题组前期也将 foldon 结构域与分子量较小且结构简单的木聚糖酶和地衣多糖酶分别在原核表达系统进行融合表达, 酶的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 分别提高了 4.2 倍和 3.0 倍^[36]。此次, 本课题组将 foldon 结构域与分子量较大且

结构相对复杂的 FAE 在真核表达系统融合表达, 结果表明, 目标酶催化效率有很大提高, 进一步表明该方法有望成为一个提高酶催化性能的通用且高效的方法, 其操作简单, 无需事先详细了解酶的 3D 结构, 具有良好的应用前景, 值得深入研究。

4 结论

mon-FAE 以及 pre-olig-FAE 在 *P. pastoris* GS115 中成功表达, 且含有由 foldon 引发寡聚化 FAE 的 multi-FAE 较 mon-FAE 的比活、底物亲和力以及催化效率显著提高。与 mon-FAE 相比, multi-FAE 的最适温度及温度稳定性未受到太大影响。综上所述, foldon 结构域可提高 FAE 催化性能, 是一种改造酶的简单高效方法。

REFERENCES

- [1] Faulds CB, Williamson G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*, 1994, 140(4): 779–787.
- [2] de Vries R, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(4): 497–522.
- [3] Faulds CB, Mandalari G, LoCurto R, et al. Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(5): 644–650.
- [4] Kroon PA, Faulds CB, Williamson G. Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 23(3): 255–262.
- [5] Chen YH, Li H, Zhang GY, et al. Expression of feruloyl esterase O42807 in *Pichia pastoris* GS115. *J*

- Huaqiao Univ: Nat Sci, 2016, 37(2): 224–229 (in Chinese).
- 陈云华, 李慧, 张光亚, 等. 阿魏酸酯酶 O42807 在毕赤酵母 GS115 中的表达. 华侨大学学报: 自然科学版, 2016, 37(2): 224–229.
- [6] Li B, Cai GL, Zhu DW, et al. Codon optimization of feruloyl esterase gene of *Aspergillus niger* and its high expression in *Pichia pastoris*. Microbiology China, 2017, 44(5): 1065–1073 (in Chinese).
- 李兵, 蔡国林, 朱德伟, 等. 黑曲霉阿魏酸酯酶基因密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1065–1073.
- [7] Zhang SB, Zhai HC, Wang L, et al. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. Protein Expr Purif, 2013, 92(1): 36–40.
- [8] Sun JT. Construction of Thermostable β -1,3-1,4-glucanase and its Enzymatic Properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
- 孙军涛. 耐热 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的构建及其酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [9] Liu T. Improving stability of enzyme through the use of extremophiles. J Chem Ind Eng, 2009, 30(6): 26–29 (in Chinese).
- 刘涛, 利用嗜极微生物提高酶的稳定性. 能源化工, 2009, 30(6): 26–29.
- [10] Lutz S. Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and design. Curr Opin Biotechnol, 2010, 21(6): 734–743.
- [11] Papanikolopoulou K, Forge V, Goeltz P, et al. Formation of highly stable chimeric trimers by fusion of an adenovirus fiber shaft fragment with the foldon domain of bacteriophage t4 fibrin. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8991–8998.
- [12] Yang HQ, Li JH, Shin HD, et al. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(1): 23–29.
- [13] Can Ö, Holland NB. Utilizing avidity to improve antifreeze protein activity: a type III antifreeze protein trimer exhibits increased thermal hysteresis activity. Biochemistry, 2013, 52(48): 8745–8752.
- [14] Engel J, Kammerer RA. What are oligomerization domains good for? Matrix Biol, 2000, 19(4): 283–288.
- [15] Tao YZ, Strelkov SV, Mesyanzhinov VV, et al. Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. Structure, 1997, 5(6): 789–798.
- [16] Stetefeld J, Frank S, Jenny M, et al. Collagen stabilization at atomic level: crystal structure of designed (GlyProPro)₁₀ foldon. Structure, 2003, 11(3): 339–346.
- [17] Sissoëff L, Mousli M, England P, et al. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. J General Virol, 2005, 86: 2543–2552.
- [18] Malashkevich VN, Kammerer RA, Efimov VP, et al. The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel. Science, 1996, 274(5288): 761–765.
- [19] Li XL, Fan YM, Fang BS. Purification and characterization of ferulic acid esterase from *Penicillium citrinum*. Microbiology China, 2010, 50(8): 1058–1064 (in Chinese).
- 李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质. 微生物学报, 2010, 50(8): 1058–1064.
- [20] Li CC, Zhang GY. The fusions of elastin-like polypeptides and xylanase self-assembled into insoluble active xylanase particles. J Biotechnol, 2014, 177: 60–66.
- [21] Juge N, Williamson G, Puigserver A, et al. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Res, 2002, 1(2): 127–132.

- [22] Bhardwaj A, Walker-Kopp N, Wilkens S, et al. Foldon-guided self-assembly of ultra-stable protein fibers. *Protein Sci*, 2010, 17(9): 1475–1485.
- [23] Fang Y, Ou SY, Zhang N. Preparation and enzymatic properties of ferulic acid esterase. *J Jinan Univ: Nat Scie Med Ed*, 2012, 33(5): 481–485 (in Chinese).
方园, 欧仕益, 张宁. 阿魏酸酯酶的制备及其酶学性质. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2012, 33(5): 481–485.
- [24] Yang HQ, Lu XY, Liu L, et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α -Amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(9): 3049–3058.
- [25] Li JJ, Pei XQ, Zhang SB, et al. Improving the thermostability of feruloyl esterase by DNA shuffling and site-directed mutagenesis. *Process Biochem*, 2015, 50(11): 1783–1787.
- [26] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 2093–2096.
- [27] Cao LC, Chen R, Xie W, et al. Enhancing the thermostability of feruloyl esterase EstF27 by directed evolution and the underlying structural basis. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(37): 8225–8233.
- [28] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 2012, 117: 140–147.
- [29] Yin X, Hu D, Li JF, et al. Contribution of disulfide bridges to the thermostability of a Type A feruloyl esterase from *Aspergillus usamii*. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0126864.
- [30] Bonzom C, Schild L, Gustafsson H, et al. Feruloyl esterase immobilization in mesoporous silica particles and characterization in hydrolysis and transesterification. *BMC Biochem*, 2018, 19(1): 1.
- [31] He FM, Zhang S, Liu XL. Immobilization of feruloyl esterases on magnetic nanoparticles and its potential in production of ferulic acid. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120(3): 330–334.
- [32] Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, et al. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol*, 2012, 115: 48–57.
- [33] Dalby PA. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(4): 473–480.
- [34] Pešić M, Božić N, López C, et al. Chemical modification of chloroperoxidase for enhanced stability and activity. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1472–1479.
- [35] Luo TZ, Kiick K. Noncovalent modulation of the inverse temperature transition and self-assembly of elastin-*b*-collagen-like peptide bioconjugates. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(49): 15362–15365.
- [36] Wang XZ, Ge HH, Zhang DD, et al. Oligomerization triggered by foldon: a simple method to enhance the catalytic efficiency of lichenase and xylanase. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 57.

(本文责编 郝丽芳)