

β -甘露聚糖酶 Man5A 和木聚糖酶 Tlxyn11B 的融合表达

孔海洋, 蒋肖, 王苑, 黄火清, 罗会颖

中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

孔海洋, 蒋肖, 王苑, 等. β -甘露聚糖酶 Man5A 和木聚糖酶 Tlxyn11B 的融合表达. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1849-1858.
Kong HY, Jiang X, Wang Y, et al. Fusion expression of β -mannanase Man5A and xylanase Tlxyn11B in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1849-1858.

摘要: 甘露聚糖酶和木聚糖酶是主要的半纤维素降解酶, 在食品、饲料、纺织、造纸等工业应用广泛且通常搭配使用。文中将蓝状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 来源的性质优良的甘露聚糖酶编码基因 *man5A* 的 CBM (Carbohydrate-binding module) 编码区去除, 留下连接区和催化区, 并将木聚糖酶基因 *Tlxyn11B* 成熟区编码序列与 *man5A* 的连接区进行融合, 形成 *Tlxyn11B-linker-man5A* 融合基因, 并在毕赤酵母中成功表达, 获得了融合蛋白 Tlxyn11B-Man5A。Tlxyn11B、不含 CBM 区的 Man5A 和 Tlxyn11B-Man5A 的理论分子量分别为 21.6 kDa、41.0 kDa、62.6 kDa。对纯化后的融合蛋白进行了性质分析, 融合蛋白同时具有高的木聚糖酶和甘露聚糖酶活性。融合后的木聚糖酶的最适温度为 70 °C, 较单独表达时提高了 5 °C。甘露聚糖酶的最适温度为 90 °C, 与融合前一致。融合后的木聚糖酶热稳定性明显提高, 60 °C 处理 1 h 剩余 48% 的酶活力, 单独表达的木聚糖酶 60 °C 处理 20 min 仅剩余 20% 的酶活力。融合后的木聚糖酶和甘露聚糖酶的最适 pH 分别为 4.0 和 5.0, 较单独表达时分别提高了 0.5 和 1.0 个单位, 融合后酶的作用 pH 范围有所拓宽。融合前后的蛋白均具有较好的 pH 稳定性。融合后木聚糖酶和甘露聚糖酶的比活分别为 1 784.3 U/mg 和 1 639.6 U/mg, 较单独表达时比活 (8 300 U/mg 和 1 979 U/mg) 降低, 与融合酶分子量增大相关。融合后的木聚糖酶和甘露聚糖酶的 K_m 值分别为 1.2 mg/mL 和 1.7 mg/mL, V_{max} 分别为 2 000.0 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和 2 831.6 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。综合其性质特点, 融合木聚糖酶和甘露聚糖酶在饲料、食品等工业生产中有较大应用潜力, 并为酶的性能改良提供了新的思路。

关键词: 甘露聚糖酶, 木聚糖酶, 融合表达, 毕赤酵母, 性质分析

Fusion expression of β -mannanase Man5A and xylanase Tlxyn11B in *Pichia pastoris*

Haiyang Kong, Xiao Jiang, Yuan Wang, Huoqing Huang, and Huiying Luo

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

Abstract: Mannanase and xylanase, the main hemicellulolytic enzymes, are widely used in food, feed, textile and papermaking industries, and usually they are used in combination. Mannanase Man5A from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 consist of the carbohydrate binding module (CBM), linker region and catalytic domain. The CBM coding region of

Received: February 4, 2020; **Accepted:** April 27, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31601976).

Corresponding author: Huiying Luo. Tel: +86-10-82106065; E-mail: luohuiying@caas.cn

国家自然科学基金 (No. 31601976) 资助。

网络出版时间: 2020-05-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200508.1702.005.html>

Man5A was removed and fused to C-terminal of the xylanase gene *Tlxyn11B*. The fusion gene *Tlxyn11B-linker-man5A* was successfully expressed in *Pichia pastoris* and the fusion protein Tlxyn11B-Man5A was purified and characterized. The theoretical molecular weights of Tlxyn11B, Man5A without CBM region, and Tlxyn11B-Man5A are 21.6 kDa, 41.0 kDa, and 62.6 kDa, respectively. The fusion protein had high xylanase and mannanase activities. The optimal temperature of the fused xylanase is 70 °C, which is 5 °C higher than Tlxyn11B-w (xylanase before fusion). The fused mannanase exhibited maximal activity at 90 °C, which is similar to Man5A-w (mannanase before fusion). More than 48% of xylanase activity of Tlxyn11B-Man5A was residual after the condition of 60 °C with 1 h, which is significantly higher than Tlxyn11B-w (only 20% of activity was left at 60 °C for 20 minutes). The optimal pHs of Tlxyn11B-Man5A for xylanase and mannanase activity are 4.0 and 5.0, respectively, which are 0.5 and 1.0 units higher than those of Tlxyn11B-w and Man5A-w. The pH range of fused enzymes got wider and the pH stability is improved. The specific activities of xylanase and mannanase of Tlxyn11B-Man5A are 1 784.3 U/mg and 1 639.6 U/mg, respectively, which is lower than those of Tlxyn11B and Man5A (8 300.0 U/mg and 1 979.0 U/mg). It may be due to of the high molecular weight of fusion enzyme. The K_m and V_{max} of the fused xylanase and mannanase are 1.2 mg/mL and 1.7 mg/mL, 2 000.0 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ and 2 831.6 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. Tlxyn11B and Man5A were successfully fusion expressed in *P. pastoris*, and the good properties of fusion of xylanase and mannanase make it has great application potential in animal feed, food and other industrial production, and it provided new ideas for the improvement of enzyme performance.

Keywords: β -mannanase, xylanase, fusion expression, *Pichia pastoris*, characterization

半纤维素这一概念于 1891 年由 Schulze 提出, 表示植物中能够用 2%–20% 的 NaOH 溶出的酸性多糖, 通常占植物干重的 15%–30%^[1], 硬质木材和禾本科植物中半纤维素的主要成分为木聚糖^[2], 而植物的种子和果实中半纤维素主要成分为甘露聚糖^[3]。木聚糖酶、甘露聚糖酶在半纤维素的生物转化过程中发挥重要作用^[4]。在半纤维素的水解中甘露聚糖酶和木聚糖酶通常联合使用^[3], 且两种酶在降解半纤维素方面存在协同效果^[5]。木聚糖酶 (Endo-1,4- β -xylanase, EC 3.2.1.8) 能够作用于含有 β -1,4 木糖苷键的木聚糖的主链并将其降解为木二糖及木二糖以上的寡聚和少量木糖^[6]。主要分布在糖苷水解酶 (Glycoside hydrolase, GH) 第 5、7、8、10、11 和 43 家族^[7], 其中 GH10 和 GH11 家族研究最多, GH10 家族木聚糖酶采用 (β/α)₈ 桶状结构, 而 GH11 家族木聚糖酶为 β -果冻卷结构, 它们均以双保留机制对底物进行降解(催化氨基酸为两个谷氨酸)。 β -甘露聚糖酶 (β -1, 4-mannanase, EC 3.2.1.78) 能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露聚糖, 主要分布在糖苷水解酶 GH5 和 GH26 家族^[8-10], 两个家族序列相似性通常不足 20%, 但它们均为规则的 TIM 桶结

构且采用相同的双保留机制(催化氨基酸通常为位于第 4 个和第 7 个 β -折叠片上的谷氨酸)^[11-12], 此外在 GH113 和 GH134 等家族甘露聚糖酶也有少数分布。糖苷水解酶除了含有一个成熟的催化结构域, 通常还含有一个碳水化合物结合结构域, 目前根据氨基酸序列, 结合特异性和结构被分为 86 个家族 (CAZy 数据库: www.cazy.org), 它们之间通常借助一个较短的连接区进行连接, CBM 通常与底物的水解和酶的稳定性相关, 已有报道的甘露聚糖酶中含有的 CBM 结构域分布在 CBM1、2、27、35 等家族中, 通常由 β 折叠片构成三明治结构^[13-16]。

有的糖苷水解酶具有双功能或多功能, 但天然存在的多功能酶普遍存在活性低、耐酸碱及高温能力差等特点^[17-20]。蛋白质融合技术作为一种具有简化生产工艺、节约生产成本、改善酶学性质等优点的基因工程技术, 近年来在蛋白的表达、纯化、性质改良、获得双功能或多功能蛋白、功能特异性的多功能抗体和蛋白的表面展示等方面均有应用^[21]。在植物生物质的酶解方面蛋白质融合也得到了广泛的应用, Elleuche 等将耐寒基因与木聚糖酶基因进行融合, 获得的酶的耐低温能力大幅提升^[22]。Lu 等融合了葡聚糖酶和木聚糖

酶,极大改善了融合酶的催化效率^[23]。张献伟等通过将黑曲霉来源的木聚糖酶和甘露聚糖酶借助连接肽进行融合并在猪肾细胞 (pK15) 中进行表达,融合酶中的木聚糖酶和甘露聚糖酶的活性分别比单独表达时提高了 54.0% 和 104.4%^[24]。Adlakha 等把从昆虫肠道中获得的木聚糖酶与纤维素酶融合表达,融合酶较亲本酶活性也都有一定提高^[25]。

蓝状菌 *T. leycettanus* JCM12802 是一株耐热真菌,最适生长温度为 40 °C,目前已经从该菌株克隆获得了大量的生物质降解酶资源,且多数具有耐高温的特性^[26],本实验室先前从该菌株中克隆获得了一个 GH5 家族甘露聚糖酶 Man5A,其最适温度为 90 °C,且在 80 °C 条件下稳定,同时获得了一个 GH11 家族木聚糖酶 Tlxyn11B,最适温度为 65 °C,比活高达 8 300.0 U/mg,但其热稳定性较差。本研究将木聚糖酶基因 *Tlxyn11B* 成熟蛋白编码区序列与去除 CBM 区的甘露糖酶基因 *man5A* 通过甘露糖酶连接区相融合,并在毕赤酵母当中进行表达和性质测定,最终融合酶同时具有较高的甘露聚糖酶和木聚糖酶活性,木聚糖酶的热稳定性得到了明显的提升。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

带有木聚糖酶基因的质粒 pPIC9-*Tlxyn11B* 和带有甘露聚糖酶基因的质粒 pPIC9-*man5A* 均由本实验室保存^[27-28]。质粒 pEASY-T3 和宿主菌大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司,用于目的基因的克隆。质粒 pPIC9 和表达宿主毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen,用于表达载体的构建和外源基因的表达。

1.1.2 试剂和试剂盒

限制性内切酶购自 TaKaRa 有限公司;重组

酶和 DNA 纯化试剂盒购自南京诺唯赞生物公司;质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;底物角豆胶和桦木木聚糖购自 Sigma-Aldrich;蛋白 Marker 购自 Genestar 生物公司;DNA 高保真聚合酶 FastPfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要培养基及培养条件

实验中所用的培养基有 LB (Luria-Bertani) 液体培养基和固体培养基、YPD (Yeast extract peptone dextrose medium) 液体培养基和固体培养基、MD (Minimal dextrose) 固体培养基、BMGY (Buffered glycerol-complex medium) 培养基、BMMY (Buffered methanol-complex medium) 培养基。其详细制备方法可参照文献[19]。

1.2 甘露聚糖酶和木聚糖酶融合基因的获得

以带有木聚糖酶 Tlxyn11B 编码基因 *Tlxyn11B* 的质粒 pPIC9-*Tlxyn11B* 为模板,以 xyn11-F1 和 xyn11-R1 为引物进行 PCR 扩增,获得木聚糖酶成熟区编码基因 *Tlxyn11B*;以质粒 pPIC9-*man5A* 为模板,以 man-F1 和 man-R1 为引物进行 PCR 扩增,获得去除了 CBM 区的甘露聚糖酶基因 *man5A*。PCR 反应程序为:95 °C 保温 5 min;95 °C 保温 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 保温 10 min。引物序列见表 1,下划线部分代表限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I,其中 man-F1 和 xyn11-R1 含有 15 bp 的同源序列以便于后续通过重叠延伸 PCR 进行木聚糖酶与甘露聚糖酶基因的融合。

上述 PCR 扩增产物进行凝胶电泳并分别回收目标条带,以回收条带混合物为模板,以 xyn11-F1 和 man-R1 为引物进行 PCR 扩增,反应条件同上。PCR 扩增产物连接 pEASY-T3 热激转化到 Trans1-T1 感受态细胞,并涂布氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基平板,37 °C 过夜培养后进行菌落 PCR 验证,并挑选阳性转化子进行测序验证。

表 1 构建木聚糖酶-甘露聚糖酶融合基因的引物序列
Table 1 Primer sequences for constructing xylanase-mannanase fusion gene

Primers	Sequences (5'-3')
man-F1	ATTACTGTTTCCACCCAAACGACCACGACC ACTCTG
man-R1	ATGCGGCCGCTCACTGAACTGGCTAATAT
xyn11-F1	<u>TAGAATTC</u> GCTCCTAGCGAGCTCTCCAAAC
xyn11-R1	GGTCGTTTGGGTGGAAACAGTAATGGAAG AA

The underline represents the restriction enzyme cleavage site.

1.3 融合表达质粒 pPIC9-*Tlxyn11B-man5A* 的构建、转化与阳性克隆筛选

测序正确的克隆进行质粒提取经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后回收基因片段, 连入同样经 *EcoR* I 和 *Not* I 处理的 pPIC9 载体, 转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态, 挑选阳性克隆并测序验证。获得重组载体 pPIC9-*Tlxyn11B-man5A* 用于毕赤酵母的转化。

重组载体 pPIC9-*Tlxyn11B-man5A* 用限制性内切酶 *Bgl* II 线性化处理, 经凝胶电泳纯化后回收线性化产物, 利用电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 用 1 mol/L 的山梨醇重悬, 30 °C 静置孵育 1 h 使细胞复苏, 然后涂布于组氨酸缺陷型 MD 平板, 30 °C 恒温箱内倒置培养 2-3 d 至长出肉眼可见的单菌落, 随机用牙签挑选 48 个克隆子后点种到标有数字 1-100 的 MD 和 MM 平板上 30 °C 恒温箱内倒置培养 1-2 d, 用牙签挑取克隆接种于有相应标号的含有 3 mL BMGY 培养基的 15 mL 酵母管中, 30 °C、220 r/min 培养 48 h 后离心去除上清液, 菌体用 1 mL BMMY 培养基重悬, 诱导培养 48 h 后离心收集上清液进行酶活测定, 筛选出高活性的转化子。

1.4 重组酶的获得和纯化

筛选获得的活性高的转化子进行摇瓶培养。将阳性转化子在 YPD 培养基活化后按 1% 接种量接种于 300 mL BMGY 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 48 h, 4 500 r/min 离心 5 min 弃上清, 菌体重悬于 150 mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY

液体培养基继续培养 48 h, 期间每隔 12 h 补加 0.5% 的甲醇。培养结束后离心收集上清液, 经截留分子量 10 kDa 的膜包浓缩, 用 10 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 6.5) 进行过夜透析以去除多余的盐分。透析处理后的酶液加载到经过平衡的 HiTrap QXL 阴离子交换层析柱中, 并用 10 mmol/L 的 pH 6.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液的配制的 1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 收集相应的峰所对应的蛋白并进行酶活性的测定和 SDS-PAGE 分析。

1.5 酶活力的测定

木聚糖酶及甘露聚糖酶的酶活性测定均采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法, 具体参照 Miller 等^[29]的方法并有所改进。具体反应体系为: 100 μL 适当稀释的酶液, 900 μL 质量体积比为 1% 的榉木木聚糖 (用于木聚糖酶酶活的测定) 或 0.5% 角豆胶 (用于甘露聚糖酶酶活的测定) 的柠檬酸-磷酸氢二钠溶液, 恒温反应 10 min 后加入 1.5 mL DNS 终止反应, 沸水浴中煮沸 5 min 后立即置于冷水中冷却, 取 250 μL 反应终止液于 540 nm 下测定吸光值, 并根据相应的标准曲线计算出酶活力。木聚糖酶活力在 pH 4.0、70 °C 条件下测定, 甘露聚糖酶活力在 pH 5.0、90 °C 条件下测定。酶活定义为: 在上述条件下, 每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个单位 (U)。

1.6 酶学性质分析

最适温度及热稳定性的测定: 将纯化后的融合酶进行适当稀释, 在 30 °C-95 °C 温度条件下及 pH 4.0 或 pH 5.0 的条件下分别测定木聚糖酶和甘露聚糖酶的酶活, 以确定融合酶中木聚糖酶和甘露聚糖酶的最适温度。将稀释酶液 (100 ng/μL) 分别在 60 °C、70 °C、80 °C 三个不同温度下处理 2、5、8、10、20、30、60 min 后立即置于冰上, 之后稀释合适的倍数并在最适条件下测定处理过的酶液的剩余酶活。以未经处理的酶的酶活力为 100%, 分别计算不同温度条件、处理不同时

间后样品的剩余酶活以测定酶在不同温度下的稳定性。

最适 pH 及 pH 稳定性的测定: 分别在甘露聚糖酶和木聚糖酶的最适温度条件下测定不同 pH (1.0–12.0) 条件下的酶活力来确定最适 pH; 将酶用不同 pH 的缓冲液进行稀释, 37 °C 恒温孵育 1 h, 在最适条件下测定剩余酶活力, 并以未处理酶液的酶活力为 100%, 计算不同 pH 处理下的相对剩余酶活以测定酶在不同 pH 下的稳定性。

动力学常数的测定: 分别以浓度范围为 0.1–10.0 mg/mL 的榉木木聚糖和 0.5–5.0 mg/mL 的角豆胶为底物, 在 pH 4.0、70 °C 条件下测定木聚糖酶活性, 在 pH 5.0、90 °C 条件下测定甘露聚糖酶活性, 反应时间均为 5 min, 利用双倒数法作图并计算得到 K_m 及 V_{max} 的值。

金属离子及化学试剂对酶活性的影响测定: 将 5 mmol/L 的不同的金属离子和化学试剂添加到酶促反应体系中, 以不添加任何离子和化学试剂作为对照, 在酶的最适条件下测定它们对酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 重组载体的构建与融合蛋白的表达与纯化

通过 PCR 将 594 bp 的木聚糖酶成熟区编码基因 *Tlxyn11B* 和 1 131 bp 的甘露聚糖酶基因 *man5A* (不含 N 端 CBM 区) 进行拼接, 获得 1 725 bp 的融合基因 *Tlxyn11B-linker-man5A*, 融合基因编码的蛋白理论分子量为 62.6 kDa, 理论等电点为 4.82。融合基因 *Tlxyn11B-linker-man5A* 在毕赤酵母 GS115 中实现了分泌表达, 获得融合蛋白 Tlxyn11B-Man5A。其表观分子量约为 70 kDa, 较理论分子量稍大 (图 1), 该融合酶有 2 个可能的 N 糖基化位点, 在毕赤酵母中表达可能发生了糖基化而造成表观分子量大于理论分子量。

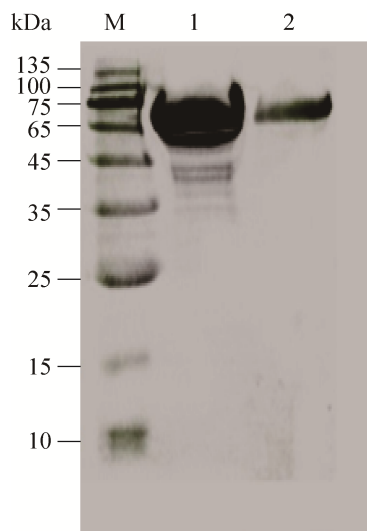


图 1 融合蛋白 Tlxyn11B-Man5A 的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of fusion protein Tlxyn11B-Man5A. Lane M: the standard molecule weight; lane 1: concentrated Tlxyn11B-Man5A; lane 2: purified Tlxyn11B-Man5A.

2.2 融合酶的酶学性质

2.2.1 融合酶的最适 pH 及 pH 稳定性

在 pH 1.0–8.0 范围内测定甘露聚糖酶和木聚糖酶的最适 pH, 结果显示融合酶的木聚糖酶的最适 pH (图 2A) 为 4.0, 在 pH 3.0–5.0 范围内能够维持 60% 以上的酶活力。融合酶中的甘露聚糖酶的最适 pH (图 2B) 为 5.0, 在 pH 3.0–5.5 范围内甘露聚糖酶的相对酶活力维持在 50% 以上。在 pH 1.0–12.0 范围内测定融合酶的 pH 稳定性, 结果显示木聚糖酶在 pH 2.0–9.0 时稳定, pH 2.0 时剩余酶活仍达 90% (图 2C)。甘露聚糖酶 (图 2D) 在 pH 2.0–9.0 范围内, 剩余酶活力能够维持在 60% 以上 (图中 Tlxyn11B-W 和 TlxynB 分别代表融合前后的木聚糖酶, Man5A-W 和 Man5A 分别代表融合前后的甘露聚糖酶)。

2.2.2 融合酶的最适温度及温度稳定性

分别在 pH 4.0 和 pH 5.0 条件下测定融合酶的木聚糖酶和甘露聚糖酶在不同温度 (30–95 °C)

的酶活力,结果显示(图 3A-B)融合酶中木聚糖酶和甘露聚糖酶分别在 70 °C 和 90 °C 时具有最高酶活力。甘露聚糖酶在 80-95 °C 范围内维持在 50% 以上酶活力。木聚糖酶在低于 70 °C 时酶活随温度升高而升高,70 °C 以上酶活急剧下降。在最适 pH 4.0 的条件下将酶液分别在 60 °C、70 °C 条件下处理不同时间测定木聚糖酶的热稳定性,结果显示(图 3C),60 °C 处理 1 h 还剩余 48% 的酶活力,70 °C 处理 2 min 还剩 60% 的酶活力,70 °C 处理 5 min 还剩 23% 的酶活力。在最适 pH 5.0 的条件下将酶液分别在 70 °C、80 °C 条件下处理不同的时间测定甘露聚糖酶的温度稳定性,结果表明(图 3D),70 °C 处理 2 min 还剩余 77.5% 的酶活,80 °C 处理 2 min 还剩余 71.26% 的酶活。

2.2.3 融合酶的动力学参数测定

分别在甘露聚糖酶和木聚糖酶的最适条件下以角豆胶和榉木木聚糖为底物进行测定,经 Michaelis-Menten 模型计算出融合酶中甘露聚糖酶和木聚糖酶的动力学参数(表 2),最终得到融合酶的甘露聚糖酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 1.7 mg/mL、2 831.6 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,木聚糖酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 1.2 mg/mL、2 000.0 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

2.2.4 金属离子及化学试剂对酶活性的影响

如表 3 所示,融合前后金属离子和化学试剂对酶的活性的影响基本无变化,对于甘露聚糖酶 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、SDS 能够抑制酶活,而其他离子和化学试剂对酶活几乎没影响。对于木聚糖酶 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、SDS 能够抑制酶活,其余离子和化学试剂对其无明显影响。

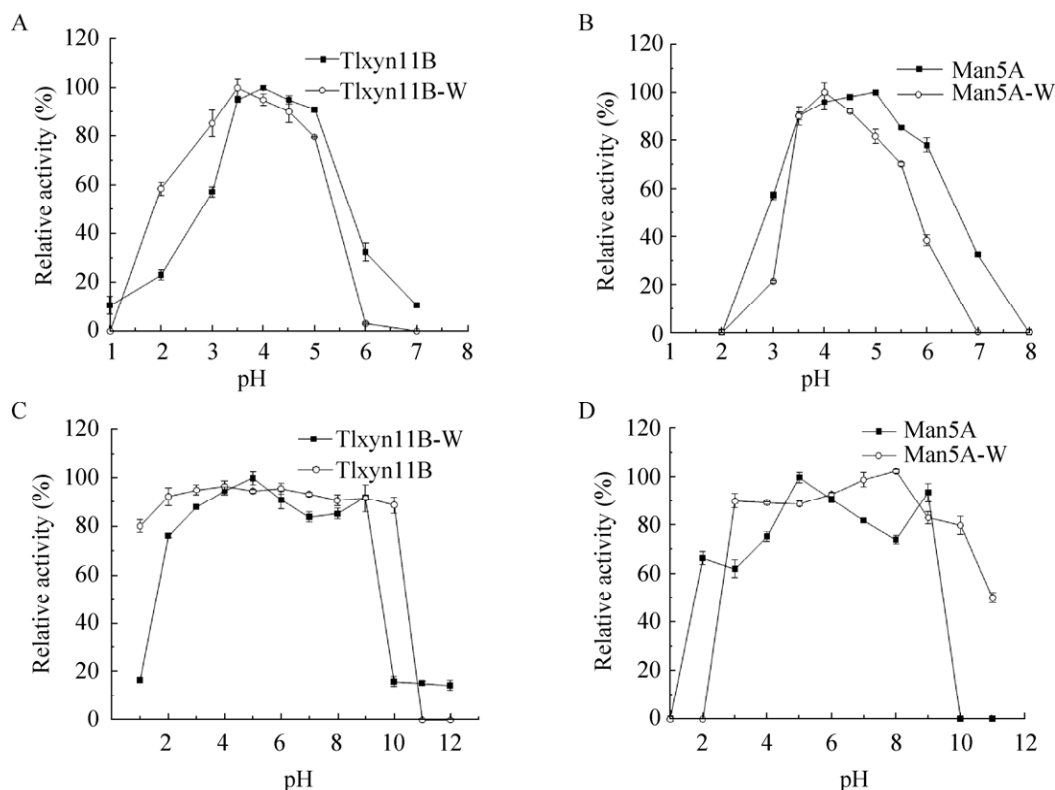


图 2 融合前后木聚糖酶和甘露聚糖酶的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 2 Optimum pH and pH stability of xylanase and mannanase before and after fusion. (A) Effect of pH on the activities of xylanase Tlxyn11B-W and Tlxyn11B. (B) Effect of pH on the activities of mannanase Man5A-W and Man5A. (C) pH stabilities of xylanase Tlxyn11B-W and Tlxyn11B. (D) pH stabilities of mannanase Man5A-W and Man5A.

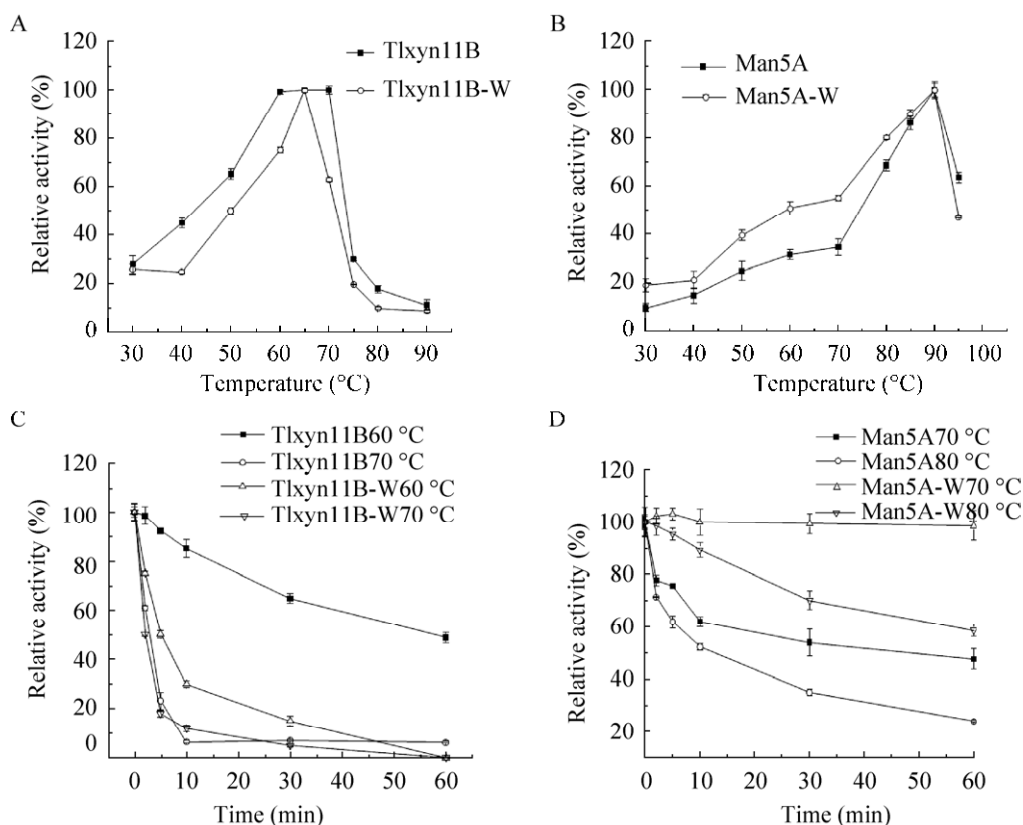


图 3 融合前后木聚糖酶和甘露聚糖酶的最适温度及热稳定性

Fig. 3 Optimum temperature and thermostability of xylanase and mannanase before and after fusion. (A) Effect of temperature on the activities of xylanase Tlxyn11B-W and Tlxyn11B. (B) Effect of temperature on the activities of mannanase Man5A-W and Man5A. (C) Thermostability of xylanase Tlxyn11B-W and Tlxyn11B. (D) Thermostability of mannanase Man5A-W and Man5A.

表 2 木聚糖酶和甘露聚糖酶融合前后的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters before and after fusion of xylanase and mannanase

	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	K_m (mg/mL)	K_{cat}/K_m (s/(mL·mg))	U (U/mg)
Tlxyn11B	2 000.0	1.2	1 805.6	1 784.3
Tlxyn11B-W	12 800.0	3.3	1 426.0	8 300.0
Man5A	2 831.6	1.7	2 921.3	1 639.6
Man5A-W	3 200.0	2.0	2 400.0	1 979.0

3 讨论

研究通过甘露聚糖酶自身的连接区将木聚糖酶和甘露聚糖酶相连,从而实现了融合表达,获得了具有高活性的木聚糖酶和甘露聚糖酶的双功能融合蛋白,为半纤维素的降解及饲料和食品中的应用提供了便利。基于蛋白质融合来获得多功能酶的研究不乏报道^[30-31],但融合设计并非都能

成功,如涉及纤维素酶-木聚糖酶的研究中,与淀粉酶 C 末端融合的葡聚糖酶失去活性^[32]。融合酶的种类、来源、结构、融合顺序、连接肽的长短和种类对融合酶的性质都可能重要的影响^[24,32-33]。多数糖苷水解酶从结构上来看其 N 端和 C 端相距较近并发生相互作用,任意一端的变动都可能影响酶的整体结构进而影响酶学性质。本研究中甘露

表 3 不同金属离子和化学试剂对融合前后甘露聚糖酶和木聚糖酶活性的影响

Table 3 Effects of different metal ions and chemical reagents on mannanase and xylanase activities before and after fusion

Chemical	Man5A-W Relative activity (%)	Man5A Relative activity (%)	Tlxyn11B-W Relative activity (%)	Tlxyn11B Relative activity (%)
Control	100.0±1.9	100.0±3.2	100.0±1.7	100.0±0.5
Cr ³⁺	57.8±5.6	68.1±1.3	101.8±5.9	100.7±3.1
Zn ²⁺	105.7±2.8	102.5±2.1	99.9±1.2	97.7±2.2
Mg ²⁺	121.4±2.0	110.2±3.4	106.9±4.0	100.6±5.6
Na ²⁺	119.6±0.4	112.5±2.6	107.5±12.3	98.6±6.3
Pb ²⁺	92.7±3.7	85.3±4.1	86.5±2.3	89.3±1.8
Ni ²⁺	94.9±1.0	100.3±1.9	107.8±0.4	94.1±6.5
Cu ²⁺	68.7±0.6	80.5±2.4	85.6±8.6	80.6±3.1
K ⁺	117.0±2.2	100.6±4.8	112.8±1.7	108.8±4.0
Fe ³⁺	50.7±1.7	65.5±5.3	54.7±1.3	66.4±6.2
Mn ²⁺	91.5±2.0	100.3±2.5	96.3±3.2	90.1±2.9
EDTA	120.9±1.0	105.4±6.1	113.3±8.9	97.2±3.6
SDS	20.8±1.0	10.3±0.2	33.1±5.6	18.6±1.2
Ca ²⁺	99.4±1.1	110.2±5.3	109.3±0.9	90.8±1.5

聚糖酶 Man5A 的 CBM 区属于 CBM1 家族, 主要是由 β 折叠片构成的三明治结构, 而木聚糖酶 Tlxyn11B 从三维结构上来看同样主要是由 β 折叠片构成, 在结构上与 CBM1 有一定的相似度, 从而保证了酶结构功能的正常, 该项工作为融合酶的选择提供了一定的指导。

甘露聚糖酶 Man5A 有非常好的热稳定性^[27], 而木聚糖酶 Tlxyn11B 热稳定性相对较差。当将 Man5A 的 CBM 替换为木聚糖酶 Tlxyn11B 进行融合时, 使木聚糖酶的热稳定性明显提高^[28], 而甘露聚糖酶热稳定性有所降低, 但优于去掉 CBM 的 Man5A (Man5A Δ CBM) 热稳定性^[27]。Wang 等报道 Man5A 在 80 °C 处理 60 min 后, 仍然保留 50% 的酶活力, 而 Man5A-CBM 在 80 °C 处理 30 min 后完全失活。Tlxyn11B-Man5A 的稳定性处于 Man5A 和 Man5A-CBM 之间, 可见 CBM 在甘露聚糖酶 Man5A 热稳定性的维持中发挥重要的作用, 且与 CBM 的结构相关。木聚糖酶 Tlxyn11B 热稳提高的机制尚不明确, 推测与连接区对木聚糖

酶的保护相关。同时, 我们发现木聚糖酶 Tlxyn11B 作用的 pH 范围在融合表达后也得到了拓宽。而融合前后木聚糖酶和甘露聚糖酶对不同金属离子和化学试剂的抗性没有明显区别, Cu²⁺、Fe³⁺、SDS 能够同时抑制两种酶的活性, 此外 Cr³⁺对甘露聚糖酶, Pb²⁺对木聚糖酶也有部分抑制作用, 说明融合表达并不影响两种酶对金属离子和化学试剂的抗性。动力学参数方面, 融合后甘露聚糖酶和木聚糖酶的 K_m 值均降低, 说明融合后有利于酶与底物的结合, 从融合后 K_{cat}/K_m 值均增加来看, 融合后两种酶的催化效率也都有提高。这类通过蛋白质融合改变酶的活力和热稳定性的研究, 目前大多认为是连接肽的种类和长短影响了融合后蛋白单个结构域及各结构域间相互作用^[23,34]。

综上, 通过不同活性酶编码基因的融合表达, 我们获得了一个同时具有高的甘露聚糖酶和木聚糖酶的双功能蛋白, 并提高了木聚糖酶的热稳定性。这为后续的应用提供了便利、节约了成本, 也为酶性能的改良提供了思路。

REFERENCES

- [1] Beukes N, Pletschke BI. Effect of lime pre-treatment on the synergistic hydrolysis of sugarcane bagasse by hemicellulases. *Bioresour Technol*, 2010, 101(12): 4472–4478.
- [2] Yamamoto M, Iakovlev M, Bankar S, et al. Enzymatic hydrolysis of hardwood and softwood harvest residue fibers released by sulfur dioxide-ethanol-water fractionation. *Bioresour Technol*, 2014, 167: 530–538.
- [3] Várnai A, Huikko L, Pere J, et al. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresour Technol*, 2011, 102(19): 9096–9104.
- [4] Soni H, Ganaie MA, Pranaw K, et al. Design-of-experiment strategy for the production of mannanase biocatalysts using plam karnel cake and its application to degrade locust bean and guar gum. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2015, 4(2): 229–234.
- [5] Benech RO, Li XM, Patton D, et al. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo- β -1,4-mannanase. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41(6/7): 740–747.
- [6] Chen CC, Luo HY, Han X, et al. Structural perspectives of an engineered β -1,4-xylanase with enhanced thermostability. *J Biotechnol*, 2014, 189: 175–182.
- [7] Pollet A, Delcour JA, Courtin CM. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol*, 2010, 30(3): 176–191.
- [8] Luo HY, Wang YR, Wang H, et al. A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(3): 453–461.
- [9] Couturier M, Roussel A, Rosengren A, et al. Structural and biochemical analyses of glycoside hydrolase families 5 and 26 β -(1,4)-mannanases from *Podospora anserina* reveal differences upon manno-oligosaccharide catalysis. *J Biol Chem*, 2013, 288(20): 14624–14635.
- [10] Li JF, Wei XH, Tang CD, et al. Directed modification of the *Aspergillus usamii* β -mannanase to improve its substrate affinity by in silico design and site-directed mutagenesis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(4): 693–700.
- [11] Hilge M, Gloor SM, Rypniewski W, et al. High-resolution native and complex structures of thermostable β -mannanase from *Thermomonospora fusca*-Substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure*, 1998, 6(11): 1433–1444.
- [12] Zhang YL, Ju JS, Peng H, et al. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31551–31558.
- [13] Ghosh A, Verma AK, Gautam S, et al. Structure and functional investigation of ligand binding by a family 35 carbohydrate binding module (CrCBM35) of β -mannanase of family 26 glycoside hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry (Mosc)*, 2014, 79(7): 672–686.
- [14] Von Freiesleben P, Spodsberg N, Stenbæk A, et al. Boosting of enzymatic softwood saccharification by fungal GH5 and GH26 endomannanases. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 194.
- [15] Dos Santos CR, Paiva JH, Meza AN, et al. Molecular insights into substrate specificity and thermal stability of a bacterial GH5-CBM27 endo-1,4- β -D-mannanase. *J Struct Biol*, 2012, 177(2): 469–476.
- [16] Tanaka M, Umemoto Y, Okamura H, et al. Cloning and characterization of a beta-1,4-mannanase 5C possessing a family 27 carbohydrate-binding module from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(1): 109–116.
- [17] Cao H, Sun LC, Huang Y, et al. Structural insights into the dual-substrate recognition and catalytic mechanisms of a bifunctional acetyl ester-xyloside hydrolase from *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*. *ACS Catal*, 2019, 9(3): 1739–1747.
- [18] Wang K, Cao RT, Wang ML, et al. A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 48.

- [19] Li XL, Tu T, Yao B, et al. A novel bifunctional xylanase/cellulase TcXyn10A from *Thermoascus crustaceus* JCM12803. *Chin J Biotech*, 2018, 34(12): 1996–2006 (in Chinese).
李晓丽, 涂涛, 姚斌, 等. 嗜热子囊菌 JCM12803 来源的双功能木聚糖/纤维素酶. *生物工程学报*, 2018, 34(12): 1996–2006.
- [20] Mosina NL, Schubert WD, Cowan DA. Characterization and homology modelling of a novel multi-modular and multi-functional *Paenibacillus mucilaginosus* glycoside hydrolase. *Extremophiles*, 2019, 23(6): 681–686.
- [21] Nie CM, Ning XY, Zhang YH, et al. improvement of lactase secretion level by fusion expression with tag in *Pichia pastoris*. *J Agric Sci Technol*, 2012, 14(5): 71–77 (in Chinese).
聂春明, 宁晓彦, 张宇宏, 等. 应用融合标签技术提高乳糖酶在毕赤酵母中的分泌表达. *中国农业科技导报*, 2012, 14(5): 71–77.
- [22] Elleuche S, Piascheck H, Antranikian G. Fusion of the OsmC domain from esterase EstO confers thermostability to the cold-active xylanase Xyn8 from *Pseudoalteromonas arctica*. *Extremophiles*, 2011, 15(2): 311–317.
- [23] Lu P, Feng MG. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(4): 579–587.
- [24] Zhang XW, Zhang GG, Wu ZF, et al. Peptide linkers optimized recombinant enzyme gene of XynB-ManA and its co-expression in pK15 cells. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(22): 4774–4783 (in Chinese).
张献伟, 张冠冠, 吴珍芳, 等. 木聚糖酶-甘露聚糖酶融合酶基因 linker 优化及其在猪肾 pK15 细胞中共表达. *中国农业科学*, 2013, 46(22): 4774–4783.
- [25] Adlakha N, Rajagopal R, Kumar S, et al. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(14): 4859–4866.
- [26] Guo YJ, Tu T, Qiu J, et al. Characterization and structure of a novel thermostable glucoamylase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802. *Chin J Biotech*, 2019, 35(4): 616–625 (in Chinese).
郭玉杰, 涂涛, 邱锦, 等. 篮状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 来源的高温葡萄糖淀粉酶性质与结构. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 616–625.
- [27] Wang CH, Luo HY, Niu CF, et al. Biochemical characterization of a thermophilic β -mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(3): 1217–1228.
- [28] Wang XY, Ma R, Xie XM, et al. Thermostability improvement of a *Talaromyces leycettanus* xylanase by rational protein engineering. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15287.
- [29] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426–428.
- [30] Lu P, Feng MG, Li WF, et al. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced β -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 261(2): 224–230.
- [31] Shibuya I, Tamura G, Shima H, et al. Construction of an α -amylase/glucoamylase fusion gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(6): 884–889.
- [32] Hong SY, Lee JS, Cho KM, et al. Assembling a novel bifunctional cellulase-xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(22): 1857–1862.
- [33] Lu P. Construction, optimization and characterization of bifunctional β -glucanase and β -glucanase-phytase fusions[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008 (in Chinese).
陆平. 双功能 β -葡聚糖酶-木聚糖酶与 β -葡聚糖酶-植酸酶融合酶的优化构建及其酶学特性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [34] Qiao JY, Cao YH. In-fusion expression and characterization of β -xylanase and β -1,3-1,4-glucanase in *Pichia pastoris*. *Biologia*, 2012, 67(4): 649–653.

(本文责编 陈宏宇)