

连接肽对 β -木糖苷酶 HJ14GH43 热适应性的影响

曹丽娟¹, 李娜¹, 刘钰¹, 张蕊^{1,2,3,4}, 黄遵锡^{1,2,3,4}, 周峻沛^{1,2,3,4*}

(¹ 云南师范大学生命科学学院 昆明 650500

² 云南师范大学生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 昆明 650500

³ 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 昆明 650500

⁴ 云南师范大学云南省高校高原特色食品酶重点实验室 昆明 650500)

摘要 为揭示连接肽对 β -木糖苷酶热适应性的影响机制, 本文通过替换 β -木糖苷酶 HJ14GH43 的连接肽序列获得突变子 MutLK10, 利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 对其进行重组异源表达。表达后对 MutLK10 纯酶进行酶学特性和蛋白质结构分析。结果表明: 突变酶 MutLK10 的最适温度为 20 °C, 相比野生酶 HJ14GH43 降低 5 °C。突变酶 MutLK10 在 20 °C 和 10 °C 下处理 60 min 后分别保持约 28% 和 69% 的相对酶活, 而野生酶 HJ14GH43 在 20 °C 和 10 °C 下处理 60 min 后分别保持约 70% 和 88% 的相对酶活。突变酶的最适温度和热稳定性与野生酶相比均降低。野生酶和突变酶的连接肽是位于蛋白质表面的一段无规则卷曲区域。蛋白质结构分析表明: 突变后该区域内的负电势面积增大, 由此带来的是该区域内亲水性的增加。结论: 增大连接肽中的酸性氨基酸比例, 使 β -木糖苷酶通过增加表面负电势面积来竞争水合作用, 从而增加酶与溶剂的相互作用并最终使酶能适应低温环境。本研究结果可为 β -木糖苷酶及其它类型酶的热适应性改性研究提供参考。

关键词 β -木糖苷酶; 连接肽; 热适应性; 低温; 机制

文章编号 1009-7848(2023)06-0081-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.06.010

木聚糖是陆地植物细胞壁中半纤维素的主要成分, 同时也广泛存在于海藻的细胞壁中^[1]。木聚糖分子由 β -1,4-连接(或 β -1,3-连接)的木糖主链和包括 L-阿拉伯呋喃糖、葡萄糖醛酸, O-乙酰基和阿魏酸等在内的不同的取代基组成^[2]。由于木聚糖的复杂性和异质性, 因此其完全水解需要一系列协同作用的水解酶^[2]。其中, β -木糖苷酶(β -xylosidase)是木聚糖水解过程中的关键酶之一, 其主要作用是协同内切木聚糖酶水解木聚糖生成木糖^[3-4]。木糖为自然界中第二丰富的糖, 可被应用于食品、饲料、生物燃料以及化学品生产等领域, 具有良好的应用价值^[5-8]。此外, 木糖在降低血脂、改善肠道菌群以及调节血糖等方面均具有重要意义^[9-11]。广义上, 将包含 β -木糖苷酶在内的能水解木聚糖的一类酶称为木聚糖酶, 近年来不少关于

木聚糖酶的研究聚焦于获得具有低温、耐热、耐盐、耐酸、耐碱、耐乙醇、耐木糖等独特性质的酶^[2, 12-14]。

通常, 连接肽被定义为连接模块化蛋白质中两个相邻结构域的柔性区域^[15]。天然多域蛋白质由通过连接肽区域连接的两个或多个结构域组成^[16]。连接肽不仅是灵活的连接器, 而且已被广泛证明影响蛋白质的表达水平、溶解性和生化特征等性质^[17-23]。例如, Li 等^[20]研究表明连接肽的删除使木聚糖酶 XynAS27 的 pH 值稳定性以及对不溶性底物的活性降低; Srisodsuk 等^[21]研究表明连接肽的缩短和删除降低了外切纤维素酶 I (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase I, CBHI) 的催化活性; Sonan 等^[22]研究表明连接肽的顺序缩短导致纤维素酶 Cel5G 对大分子底物的比活性有规律地降低; Tsutsumi 等^[23]研究表明用长度相等或更长的不带电荷的连接肽替换分子伴侣热休克蛋白 90 (Heat shock protein 90, Hsp90) 中的带负电荷的连接肽, 导致其结构破坏, 从而降低三磷酸腺苷酶 (ATPase) 的活性。

目前, 有研究报道了连接肽对内切木聚糖酶热适应性的影响(表 1), 其中, 连接肽的删除可使

收稿日期: 2022-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960459); 云南省基础研究计划重点项目(202001AS070022); 云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2018-383)

第一作者: 曹丽娟, 女, 硕士

通信作者: 周峻沛 E-mail: junpeizhou@126.com

酶的最适温度和/或热稳定性降低;Liu等^[24]研究表明连接肽的删除使酶在50℃下处理180min后的剩余活性降低约10%;Miao等^[25]研究表明连接肽的删除使酶的最适温度降低5℃,并使酶在60℃下处理360min后的剩余活性降低20%;Li等^[20]研究表明连接肽的删除使酶的最适温度降低5

℃,并使酶在65℃下完全失活的时间由50min减至5min(表1)。此外,Meng等^[26]研究表明将连接肽替换后同样导致内切木聚糖酶的最适温度和热稳定性降低。这些研究表明连接肽对于内切木聚糖酶热适应性的重要性,然而,其对 β -木糖苷酶热适应性的影响机制还不清楚。

表1 连接肽对内切木聚糖酶热适应性的影响

Table 1 Effects of linkers on thermal adaptability of endo-xylanases

来源	内切木聚糖酶	分子结构 ^a	最适温度/℃	热稳定性	参考文献
烟曲霉 Z5	Xyn10AdC	GH10+Linker	90	60℃, 360 min; 80%	[25]
	Xyn10AdLC	GH10	85	60℃, 360 min; 60%	
热解纤维素菌属 F32	XynB	CBM22-1+CBM22-2+linkerA+GH10	75	$T_{1/275}=42.7$ h	[26]
	mXynB	CBM22-1+CBM22-2+linkerB+GH10	70	$T_{1/270}=25$ h	
热纤梭菌	LGH10	Linker+GH10	NR	68℃, 20 min; ca. 100%	[27]
	GH10	GH10	NR	65℃, 20 min; ca. 0%	
	LGH10-CBM22-2	Linker+GH10+CBM22-2	NR	68℃, 20 min; ca. 90%	
	GH10-CBM22-2	GH10+CBM22-2	NR	65℃, 20 min; ca. 0%	
坎皮纳斯类芽孢杆菌 G1-1	XynG1-1CDL	CD+Linker	60	50℃, 180 min; ca. 20%	[24]
	XynG1-1CD	CD	60	50℃, 180 min; ca. 10%	
链霉菌属 S27	XynAS27cdl	GH10+Linker	65	65℃, 60 min; ca. 0%	[20]
	XynAS27cd	GH10	60	65℃, 5 min; ca. 0%	

注:^a:GH10:糖苷水解酶第10家族的催化结构域;CBM22-2:碳水化合物结合模块22-2;CD:木聚糖酶XynG1-1的催化结构域; $T_{1/2}$:剩余酶活力为最高酶活力一半时的处理时间。

本实验室研究人员在前期研究中从芽孢杆菌属菌株HJ14中克隆和表达了一个糖苷水解酶(Glycoside Hydrolase, GH)第43家族的冷活性 β -木糖苷酶HJ14GH43,并解析其晶体结构^[28]。通过基因和蛋白质序列分析,发现该蛋白属于GH43家族中的第11亚家族^[29],拥有该亚家族序列的典型结构域特征,即HJ14GH43由两个结构域组成,包括GH43结构域(K2到A315;Pfam蛋白家族:PF04616)与一个功能未知的DUF1349结构域(V330到E535;PF07081),它们之间通过一个连接肽(P316到T329;PKIEEKVFAPTYHT)相连(图1),且Ontanon等^[30]和本实验室前期的研究均表明,该亚家族序列是双结构域必需酶,突变失去DUF1349域,突变酶不能正常折叠及催化。目前,连接肽对于 β -木糖苷酶HJ14GH43的作用尚不清楚。本研究通过对 β -木糖苷酶HJ14GH43的连接肽序列进行替换获得突变子MutLK10,并对突

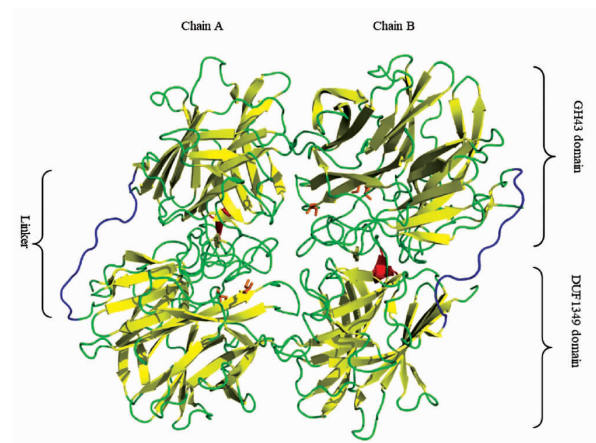


图1 野生酶HJ14GH43的三维结构

Fig.1 3-D structure of wild-type enzyme HJ14GH43

变体MutLK10进行诱导表达、纯化、酶学性质测定和蛋白质结构分析,旨在揭示连接肽对 β -木糖苷酶热适应性的影响机制,从而为该酶及其它类型酶的热适应性改性研究提供理论参考。

1 试验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体和试剂 重组菌株 *BL21 (DE3) /hJ14GH43* 由实验室保存。大肠杆菌 *BL21 (DE3)* 和表达载体 *pEasy-E1* 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 酶类及其它生化试剂 对硝基苯酚 *pNP* 和对硝基苯基- β -D-木糖苷 *pNPX* 均购自 Sigma 公司,其它都为国产分析纯试剂(均可从普通生化试剂公司购买得到)。

1.1.3 培养基 LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,加蒸馏水至 1 000 mL,pH 自然(约为 7)。固体培养基在此基础上加 20 g/L 琼脂。

1.2 方法

1.2.1 野生型 HJ14GH43 连接肽替换序列的分析

通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对已表征过的 GH43 家族第 11 亚家族的 β -木糖苷酶进行搜索。搜获后获得的 β -木糖苷酶与野生型 HJ14GH43 的多序列比对通过 DNAMAN (V6, 中文版)分析获得。

1.2.2 突变酶表达菌株的构建 替换序列由苏州泓迅生物科技股份有限公司进行合成,然后经限制性内切酶 *KpnI* 和 *EcoRI* 酶切后连接到 *pEasy-E1* 载体上。将突变体基因和酶分别命名为 *mutlk10* 和 *MutLK10*。将突变完成后返回的 *pEasy-E1-mutlk10* 冻干质粒在 12 000 r/min 下离心 2 min 后加入适量无菌水。通过热激法将 *pEasy-E1-mutlk10* 转化到大肠杆菌 *BL21 (DE3)* 感受态细胞中,经 PCR 验证后,挑取阳性克隆子送至上海生工公司进行核酸测序验证。

1.2.3 突变酶的表达和纯化 将 30 μ L (0.1%接种量) 含 *mutlk10* 的表达菌株接种于含有 30 μ L 氨苄青霉素(质量浓度为 100 μ g/mL)的 30 mL LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 下过夜培养(12~16 h)。然后,将活化后的菌液以 1%的接种量分别接种于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 2~3 h (OD_{600} 达到 0.6~1.0) 后,加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,于 20 $^{\circ}$ C 继续振荡培养约 20 h。诱导培养结束后,在 4 $^{\circ}$ C 下以 6 500 r/min 离心 8 min 收集菌体,然后以适量的 pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液

悬浮菌体,最后在冰浴环境下超声波破碎菌体。在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min 后获得上清粗酶液。将上清液上样到预先平衡好的 Ni^{2+} -NTA 树脂凝胶柱中,用含不同浓度咪唑(0~500 mmol/L)的试剂梯度纯化重组酶。纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 分析确定纯度和分子质量。

1.2.4 酶的特性分析 采用 *pNP* 法测定纯化的突变酶 *MutLK10* 的活性,具体如下:将 *pNPX* 溶于缓冲液(pH 7.0)中,使其终浓度为 2 mmol/L;反应体系含 50 μ L 适量酶液,450 μ L 的 2 mmol/L 底物;底物在反应温度下预热 5 min 后,加入酶液反应 10 min,然后迅速加入 2 mL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应;待反应溶液冷却至室温后在 405 nm 波长下测定释放出的 *pNP*。1 个单位的 β -木糖苷酶活性(U) 被定义为每分钟分解底物产生 1 μ mol *pNP* 所需的酶量。

pH 6.0~8.5 缓冲液采用柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液,pH 9.0 缓冲液采用甘氨酸/氢氧化钠缓冲液。

最适反应 pH 值测定:在 20 $^{\circ}$ C 条件下,将酶液置于 pH 6.0~9.0 的缓冲液中进行酶促反应,以终浓度为 2 mmol/L 的 *pNPX* 为底物,反应 10 min 后测定酶活力。

pH 稳定性测定:将 *MutLK10* 酶液置于 pH 6.0~9.0 的缓冲液中处理 1 h,然后在 pH 7.0 及 20 $^{\circ}$ C 下进行酶促反应,以未处理的酶液作为对照,以终浓度为 2 mmol/L 的 *pNPX* 为底物,反应 10 min 后测定酶活力。

最适反应温度测定:在 pH 7.0 的缓冲液中,于 0~40 $^{\circ}$ C 下进行酶促反应,以终浓度为 2 mmol/L 的 *pNPX* 为底物,反应 10 min 后测定酶活力。

温度稳定性测定:将酶液分别置于 10 $^{\circ}$ C 和 20 $^{\circ}$ C 处理 0~60 min 后,在 pH 7.0 及 20 $^{\circ}$ C 下进行酶促反应,以未处理的酶液作为对照,以终浓度为 2 mmol/L 的 *pNPX* 为底物,反应 10 min 测定酶活力。

1.2.5 蛋白质结构的比较分析 本实验室研究表明 HJ14GH43 的晶体结构在自然状态下是二聚体^[28],因此,以 β -木糖苷酶 HJ14GH43 的晶体结构(PDB IDS:6IFE) 为模板,采用软件 HOMCOS (HOMology Modeling of Complex Structure; <http://>

//homcos.pdbj.org) 建立突变体 MutLK10 的三维(3-D)结构模型^[31-32]。已有研究表明该软件生成的复杂结构模型更适合多聚体蛋白的结构建模。所建立的模型质量进一步利用 SAVES v6.0(https://saves.mbi.ucla.edu/)中的 ERRAT、拉曼图和 VERIFLY 3D 进行评估;使用 PyMOL 查看蛋白质结构,观察蛋白质表面电势;使用 UCSF Chimera 观察蛋白质的表面亲疏水性^[33]。

2 试验结果

2.1 野生型 HJ14GH43 连接肽序列的替换

通过 NCBI 搜索共找到 10 个已表征酶学性

质的 GH43 家族第 11 亚家族 β -木糖苷酶(表 2)。野生酶 HJ14GH43 与各 β -木糖苷酶的多序列比对结果如图 2 所示。从图中可以看出来自于嗜热脂肪地芽胞杆菌 T-6 的 XynB3 连接肽序列中酸性氨基酸高达 42.9%, 是已统计 GH43 家族第 11 亚家族 β -木糖苷酶中酸性氨基酸含量最高的连接肽。同时, 与统计的其它 10 个 β -木糖苷酶相比, XynB3 具有最高的最适温度, 且报导了在最高温度(60 °C)下的热稳定性(表 2)。此外, 由图 2 可见 XynB3 与 HJ14GH43 连接肽序列的氨基酸数目相同。

表 2 野生酶 HJ14GH43 与其它 GH43 家族第 11 亚家族 β -木糖苷酶的特征

Table 2 Characteristics of wide-type enzyme HJ14GH43 and other subfamily 11 of GH43 β -xylosidases

酶的名称	最适温度/°C	温度稳定性	连接肽中酸性氨基酸比例/%	蛋白序列 登陆号	参考文献
XynB3	65	60 °C, 0.5 h, 100%	42.9	AY690618	[34]
Thxy143A	55	55 °C, 30 h, 47%	7.1	MG827398	[35]
WXyn43	55	45 °C, 1 h, 60%	20.0	KP903368	[36]
BXA43	50	50 °C, $T_{1/2}$ =141 min	26.7	ADC85541	[37]
EcXyl43	40	45 °C, $T_{1/2}$ =5.6 h	7.1	JX569191	[30]
BpX	40	40 °C, 1 h, ca. 100%	7.1	CAA29235.1	[38]
HJ14GH43	25	25 °C, 1 h, ca. 40%	14.3	KY391885	[28]
GbtXyl43A	NR	51.2 °C, $T_{1/2}$ =970 min	20.0	DQ345777	[39]
XylBH43	NR	50 °C, $T_{1/2}$ =540 min	38.5	BAB07402	[40]
BsX	NR	40 °C, 1 h, ca. 100%	21.4	CAB13642.2	[38]
LbX	NR	40 °C, 1 h, ca. 90%	20.0	ABJ65333.1	[38]

注:NR:未报导; $T_{1/2}$:剩余酶活力为最高酶活力一半时的处理时间。

GbtXyl143A	IGRETCLAPIKWTDDGWEIIG.YNGRIDIKMDAGYLPVKEKNIGDEIIEED	316
BXA43	LGRETSIQKVEWTDGWEVTVV.GGHGGQRVVEAECDAIETEAPADHSCQHD	336
EcXyl43	LGRETGIARIEWRDG.WEYVE.GGKHAQLTVKGEQ.VAEQPAAVQGSWRDD	334
WXyn43	LGRETSIQKVEWDEAGWERVV.GGHGGQTFVEAPKDAILTEAPADHSCQHD	336
XylBH43	LGRETAIQKVNWTEDEGLRIEDGGNHPLREVTAED.LPEHPFEKE.PELDD	326
XynB3	LGRETAIQRLEWKDG.WEYVTV.GGNGPSLEIDGES.VEEVSWEKDYDEKDD	333
Thxy143A	LGRETAIQRLEWKDG.WEYVTV.GGNGPSLEIDGES.VEEVSWEKDYDEKDD	341
BpX	LGRETAIQRLEWKDG.WEYVTV.GGNGPSLEIDGES.VEEVSWEKDYDEKDD	332
LbX	LGRETSIQKVEWDDAGWERVV.GGHGGQVEVDAPKDAIETTAPKDHSQHD	336
BsX	LGRETAIQRLEWKDG.WEYVTV.GGNGPSLEIDGES.VEEVSWEKDYDEKDD	332
HJ14GH43	LGRETAIQRLEWKDG.WEYVTV.GGNGPSLEIDGES.VEEVSWEKDYDEKDD	332
Consensus	lgret w w d	

注:GbtXyl143A 来自嗜热嗜油地芽胞杆菌 IT-08^[39];BXA43 来自动物双歧杆菌乳亚种 BB-12^[37];EcXyl43 来自肠杆菌^[30];WXyn43 来自魏斯氏菌 92^[36];XylBH43 来自嗜碱芽胞杆菌 C-125^[40];XynB3 来自嗜热脂肪地芽胞杆菌 T-6^[34];Thxy143A 来自耐盐高温双歧菌 YIM 90462^[35];BpX 来自短小芽胞杆菌^[38];LbX 来自短乳杆菌 ATCC 367^[38];BsX 来自枯草芽胞杆菌 168^[38];黑框内序列为各酶的 Linker 区域;各酶的序列登录号如表 1 所示。

图 2 野生酶 HJ14GH43 与 GH43 家族第 11 亚家族 β -木糖苷酶的部分氨基酸序列比对

Fig.2 Partial amino acid sequences alignment of wild-type enzyme HJ14GH43 and other subfamily 11 of GH43 β -xylosidases

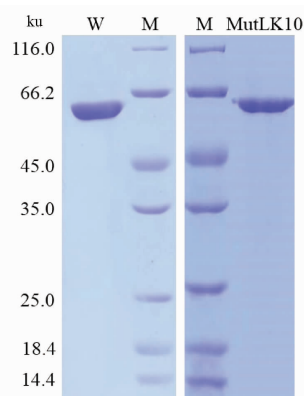
2.2 突变酶的表达和纯化

mutlk10 成功转化, 并成功在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中得到了诱导表达。亲和层析纯化后, 根据 SDS-PAGE 结果, 突变酶 MutLK10 的蛋白质纯度达到电泳纯, 产物为大小约为 61.5 ku 的单一一条带, 与其 535 个氨基酸计算得到的理论分子质量相符, 并和野生酶的分子质量大小相似(图 3)。

2.3 重组酶的生化特性测定

以 *p*NPX 为底物, 野生酶 HJ14GH43 和突变酶 MutLK10 在 pH 6.0~9.0 之间具有活性, 且均在 pH 7.0 下具有最佳活性(图 4a)。但在偏碱性条件下 (pH 7.5~9.0), MutLK10 的相对活性小于 HJ14GH43。pH 对野生酶 HJ14GH43 和突变酶 MutLK10 的稳定性影响试验的结果表明, 二者在 pH 7.0~8.0 的缓冲液中保持稳定, 即在 pH 7.0~8.0 缓冲液中处理 1 h 后均保持 80% 以上的相对酶活(图 4b)。

在 0~40 °C 间测定温度对野生酶 HJ14GH43 和突变酶 MutLK10 活性的影响。由图 4c 可知, 二者在 0~40 °C 间都具有活性, 其中野生酶 HJ14GH43 的最适温度为 25 °C, 突变酶 MutLK10 的最适温度为 20 °C。在 25~40 °C 间 MutLK10 的相对活性小于 HJ14GH43。酶的热稳定性试验表明



注: M: 蛋白质标品; W: 野生酶 HJ14GH43。

图 3 纯化的野生酶 HJ14GH43 和突变酶 MutLK10 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified wild-type enzyme HJ14GH43 and its mutant MutLK10

野生酶 HJ14GH43 在 20 °C 和 10 °C 下处理 60 min 后分别保持约 70% 和 88% 的相对酶活; 突变酶 MutLK10 在 20 °C 和 10 °C 下处理 60 min 后分别保持约 28% 和 69% 的相对酶活(图 4d)。由此可见, 突变酶 MutLK10 的最适温度和热稳定性与野生酶 HJ14GH43 相比均降低。同时表明 MutLK10 是一个典型的低温活性酶。

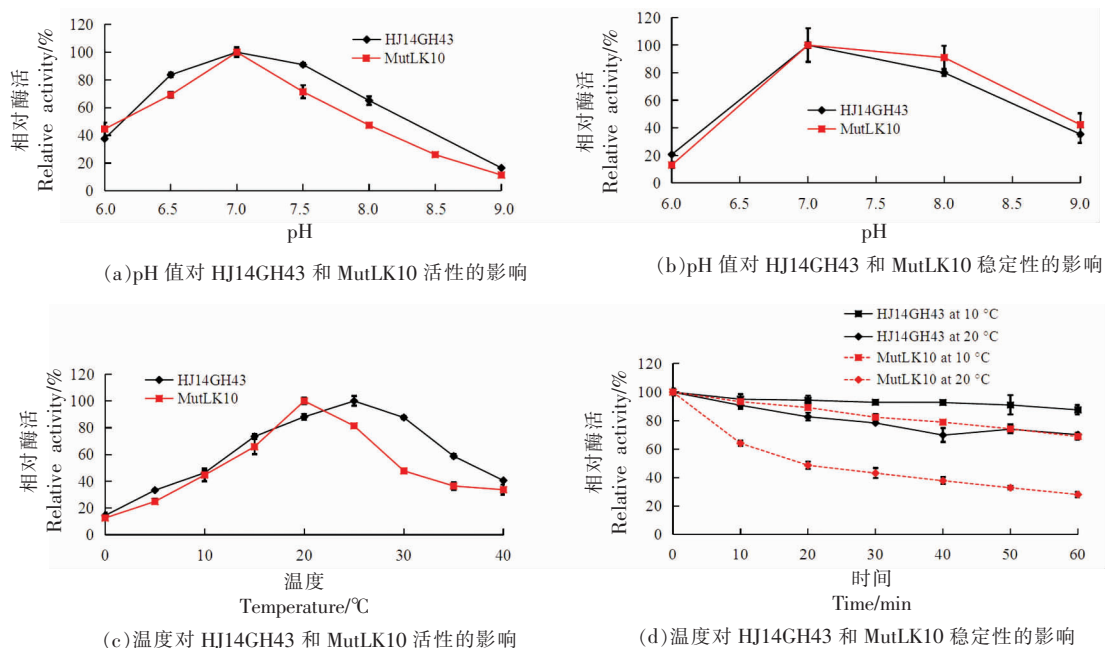


图 4 野生酶 HJ14GH43 及其突变体 MutLK10 的酶学性质

Fig.4 Enzymatic properties of wild-type enzyme HJ14GH43 and its mutant MutLK10

2.4 蛋白质结构的比较分析

以 β -木糖苷酶 HJ14GH43 的晶体结构(PDB IDs:6IFE)为模板构建了 MutLK10 的同源模型。对 MutLK10 同源模型的质量评估显示该模型的 ERRAT 得分为 93.238, 拉氏图显示 99.2% 的残基在允许区内, 且 98.13% 的残基拥有大于 0.2 的

3D/1D 值。综上判断该模型的可信度高。蛋白质突变前后的表面电势分析表明, MutLK10 的表面负电势面积大于野生酶 HJ14GH43(图 5)。蛋白质突变前后的表面亲疏水性分析表明, MutLK10 的表面亲水性面积大于野生酶(图 6)。

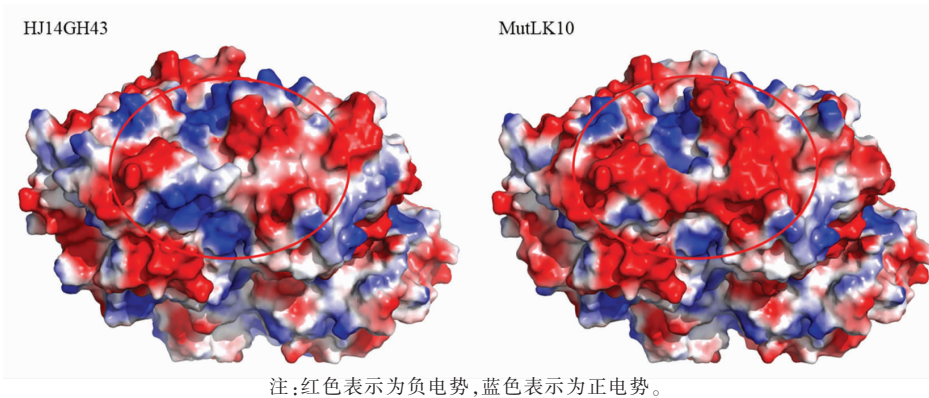


图 5 野生酶 HJ14GH43 及其突变体 MutLK10 的表面电势分布

Fig.5 Charge distribution on the structural surfaces of wild-type enzyme HJ14GH43 and its mutant MutLK10

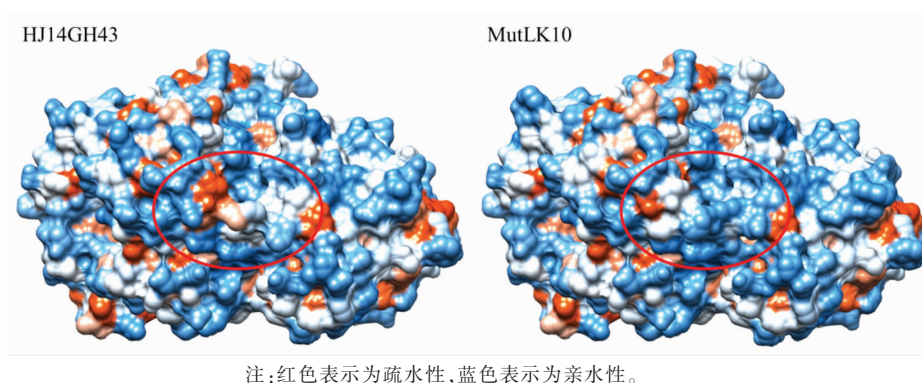


图 6 野生酶 HJ14GH43 及其突变体 MutLK10 的表面亲疏水性

Fig.6 Surface hydrophilicity and hydrophobicity of wild-type enzyme HJ14GH43 and its mutant MutLK10

3 讨论

连接肽对于多结构域酶的组装、表达以及在各种环境下的适应性起重要作用^[26]。目前,连接肽影响木聚糖酶热适应性的机制尚未确定。此外,尚无报导研究 β -木糖苷酶中连接肽对酶热适应性的影响。通过分析 11 个 GH43 家族 β -木糖苷酶的连接肽(包含 HJ14GH43),发现连接肽中酸性氨基酸比例最高的 XynB3 具有最高的最适温度且报导了在最高温度下的热稳定性。Ding 等^[41]的研究发现来自于海洋噬糖菌属模式菌株 2-40^T 的

淀粉酶 SdG5A 在连接肽区域同样具有高比例的酸性氨基酸,然而,该酶是冷适应性淀粉酶;SdG5A 连接肽区域中高比例的酸性氨基酸所带来的静电排斥作用和稳定的水化层驱使 SdG5A 适应低温环境。由此可见,连接肽区域中酸性氨基酸比例对酶热稳定性的影响具有不确定性。本研究通过将 HJ14GH43 的连接肽序列替换成 XynB3 的连接肽序列,揭示了连接肽中的酸性氨基酸比例对 β -木糖苷酶 HJ14GH43 热适应性的影响,即高比例的酸性氨基酸连接肽序列使突变酶 Mut-

LK10 的最适温度和热稳定性均低于野生酶。

先前的研究表明,典型的低温活性酶在低于 30 °C 的温度下显示出最大活性,且在高于 40 °C 的温度下稳定性差^[42]。由此可见,MutLK10 是一个典型的 GH43 家族低温活性 β -木糖苷酶。酶的低温适应性引起了人们极大的关注和兴趣,例如,张明慧等^[43]获得了 GH43 家族低温木糖苷/阿拉伯呋喃糖苷酶 AX543,与 MutLK10 不同的是,AX543 是单结构域的 GH43 家族酶。低温酶在食品、精细化工品、医药等工业中具有重要的应用潜力,对节约能源,降低生产成本,防止微生物污染和防止产品营养价值及风味降低具有重要作用^[44-45],原因在于一方面,低温环境覆盖了 80% 以上的地球生物圈(例如,90% 的海水 ≤ 5 °C),包括永久寒冷的深海、阿尔卑斯山等山脉、极地等^[46],适应低温(低于 25 °C)的酶具有加热成本低和反应环境方便的优点^[47];另一方面,低温活性越高的酶往往具有更高的热敏性,该特性使酶的催化反应更容易得到控制并使酶的使用更具安全性^[44-45,48]。

低温会严重影响酶和周围水的性质和结构,因为随着环境中温度的降低,蛋白质表面周围的水分子变得更有序,从而与蛋白质的结合更少,最终将系统平衡推向展开或变性状态^[49-50]。因此,冷活性酶需要通过一些结构适应性来增加蛋白质表面与溶剂的相互作用,例如增加蛋白质表面的负电势^[51]。不少研究论证了蛋白质表面静电相互作用与酶热适应性之间的关系。例如,Karan 等^[51]表明极端酶可通过增大表面负电势来竞争水合作用,从而增加酶与溶剂的相互作用并使酶在低温下也能保持活性。Sriprang 等^[52]、Turunen 等^[53]的研究表明通过在木聚糖酶的 Ser/Thr 平面引入带正电的精氨酸后,由于精氨酸的胍基促进了电荷间交互作用的进行,因而该酶的热稳定性提高。此外,一个来自于杀鲑异弧菌的冷活性铁超氧化物歧化酶的晶体结构展现了蛋白质表面净负电荷的增加^[54]。在本研究中,用酸性氨基酸含量高的连接肽替换野生酶 HJ14GH43 的连接肽,导致突变体 MutLK10 的连接肽区域负电势面积增加,亲水性面积增加。酸性氨基酸带来的负电势能与盐离子竞争水而发生水合作用,同时,由于酸性氨基酸中的羧基比其它基团更亲水,因而酸性氨基酸具有

较强的水结合能力^[55]。蛋白质表面亲水性的增加促进了酶与溶剂的相互作用并帮助蛋白质形成稳定的水化层^[51],最终使酶能适应低温环境。

4 结论

本研究通过对 β -木糖苷酶 HJ14GH43 中的连接肽进行替换,并对序列替换后所得突变体进行了诱导表达、纯化、酶学性质测定和蛋白质结构分析,从而研究连接肽对 HJ14GH43 热适应性的影响。连接肽序列替换后的突变体 MutLK10 的最适温度和热稳定性与野生酶 HJ14GH43 相比均降低;同时,与野生酶 HJ14GH43 相比,突变酶 MutLK10 连接肽区域的负电势面积增大,亲水性面积增加,其机理为增大连接肽中的酸性氨基酸比例能使 β -木糖苷酶通过增大表面负电势来竞争水合作用,从而增加酶在低温下与溶剂的相互作用,使酶在低温下仍然能形成稳定的水化层,维持酶的活性结构,并最终使酶能适应低温环境。本研究可为理解酶的温度适应性机理和为酶的改性研究提供理论基础,为研究连接肽的作用提供参考。

参 考 文 献

- [1] QESHMI F I, HOMA EI A, FERNANDES P, et al. Xylanases from marine microorganisms: A brief overview on scope, sources, features and potential applications[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2019, 1868(2): 140312.
- [2] CAO L J, ZHANG R, ZHOU J P, et al. Biotechnological aspects of salt-tolerant xylanases: A review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(31): 8610-8624.
- [3] 叶延欣, 宁艳春, 李雪芝, 等. β -木糖苷酶及其在纤维素乙醇生产中的应用研究进展[J]. *生命科学*, 2021, 33(6): 773-780.
YE Y X, NING Y C, LI X Z, et al. Research progress of β -xylosidase and its application in cellulosic ethanol production[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2021, 33(6): 773-780.
- [4] 范园园, 李秀婷, 滕超. 微生物产 β -木糖苷酶的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(12): 116-121.
FAN Y Y, LI X T, TENG C. Research progress on

- β -xylosidases from Microorganism[J]. Food Research and Development, 2013, 34(12): 116-121.
- [5] DASGUPTA D, BANDHU S, ADHIKARI D K, et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review[J]. Microbiological Research, 2017, 197: 9-21.
- [6] HUNTLEY N F, PATIENCE J F. Xylose metabolism in the pig[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e205913.
- [7] QIAN D K, GENG Z Q, SUN T, et al. Caproate production from xylose by mesophilic mixed culture fermentation[J]. Bioresource Technology, 2020, 308: 123318.
- [8] PARK H, JEONG D, SHIN M, et al. Xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae* during conversion of hydrothermally pretreated lignocellulosic biomass to ethanol [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(8): 3245-3252.
- [9] SARMA S M, SINGH D P, SINGH P, et al. Finger millet arabinoxylan protects mice from high-fat diet induced lipid derangements, inflammation, endotoxemia and gut bacterial dysbiosis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106(2): 994-1003.
- [10] LI C, LIU X Z, QIAN T X, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(1): 160-164.
- [11] SHEU W H H, LEE I, CHEN W, et al. Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2008, 54(5): 396-401.
- [12] 林小洪, 叶秀云, 王国增, 等. 产木聚糖酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 115-122.
- LIN X H, YE X Y, WANG G Z, et al. Screening and identification of xylanase-producing microorganisms and study on enzyme properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 115-122.
- [13] LI N, HAN X W, XU S J, et al. Glycoside hydrolase family 39 β -xylosidase of *Sphingomonas* showing salt/ethanol/trypsin tolerance, low-pH/low-temperature activity, and transxylosylation activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(36): 9465-9472.
- [14] 何易, 焦镕虎, 王晨曦, 等. *Leifsonia* sp. ZF2019中一种新型耐木糖 β -木糖苷酶的表达与特征[J/OL]. 微生物学报. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20210446>.
- HE Y, JIAO R H, WANG C X, et al. Expression and characterization of a novel xylose-tolerant β -xylosidase from *Leifsonia* sp. ZF2019[J/OL]. Acta Microbiologica Sinica. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20210446>.
- [15] RUIZ D M, TUROWSKI V R, MURAKAMI M T. Effects of the linker region on the structure and function of modular GH5 cellulases[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 28504.
- [16] 李剑芳, 王春娟, 邬敏辰. 连接肽的设计及在融合蛋白中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(11): 1121-1127.
- LI J F, WANG C J, WU M C. Design of linker peptides and its application in fusion protein [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(11): 1121-1127.
- [17] SAMMOND D W, PAYNE C M, BRUNECKY R, et al. Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: Insights from sequence analysis, biophysical measurements, and molecular simulation[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48615.
- [18] LU P, FENG M G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(4): 579-587.
- [19] AALBERS F S, FRAAIJE M W. Enzyme fusions in biocatalysis: Coupling reactions by pairing enzymes [J]. ChemBioChem, 2019, 20(1): 20-28.
- [20] LI N, SHI P J, YANG P L, et al. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-region-truncated versions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(1): 99-107.
- [21] SRISODSUK M, REINIKAINEN T, PENTTILA M, et al. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(28): 20756-20761.
- [22] SONAN G K, RECEVEUR-BRECHOT V E, DUEZ C, et al. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium[J]. Biochemical Journal, 2007, 407(2): 293-302.

- [23] TSUTSUMIA S, MOLLAPOURA M, PRODROMOUB C, et al. Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(8): 2937–2942.
- [24] LIU Y H, HYANG L, LI W G, et al. Studies on properties of the xylan-binding domain and linker sequence of xylanase XynG1-1 from *Paenibacillus campinasensis* G1-1 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42(12): 1591–1599.
- [25] MIAO Y Z, KONG Y Q, LI P, et al. Effect of CBM1 and linker region on enzymatic properties of a novel thermostable dimeric GH10 xylanase (Xyn10A) from filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* Z5[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 44–53.
- [26] MENG D D, YING Y, CHEN X H, et al. Distinct roles for carbohydrate-binding modules of glycoside hydrolase 10 (GH10) and GH11 xylanases from *Caldicellulosiruptor* sp. strain F32 in thermostability and catalytic efficiency[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 2006–2014.
- [27] DIAS F M V, GOYAL A, GILBERT H J, et al. The N-terminal family 22 carbohydrate-binding module of xylanase 10B of *Clostridium thermocellum* is not a thermostabilizing domain[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238(1): 71–78.
- [28] ZHANG R, LI N, LIU Y, et al. Biochemical and structural properties of a low-temperature-active glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase: Activity and instability at high neutral salt concentrations[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125266.
- [29] MEWIS K, LENFANT N, LOMBARD V, et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: A motivation for detailed enzyme characterization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1686–1692.
- [30] ONTANON O M, GHIO S, DE VILLEGAS R M D, et al. EcXyl43 β -xylosidase: Molecular modeling, activity on natural and artificial substrates, and synergism with endoxylanases for lignocellulose deconstruction[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102: 6959–6971.
- [31] FUKUHARA N, TAKESHI K. HOMCOS: A server to predict interacting protein pairs and interacting sites by homology modeling of complex structures[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(suppl_2): W185–W189.
- [32] KAWABATA T. HOMCOS: An updated server to search and model complex 3D structures[J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2016, 17(4): 83–99.
- [33] PETERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis[J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(13): 1605–1612.
- [34] SHEZIFI D, LEON M, BRAVMAN T, et al. Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 β -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6[J]. Biochemistry, 2005, 44(1): 387–397.
- [35] YIN Y R, XIAN W D, HAN M X, et al. Expression and characterisation of a pH and salt tolerant, thermostable and xylose tolerant recombinant GH43 β -xylosidase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T for promoting hemicellulose degradation[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(12): 339–350.
- [36] FALCK P, LINARES-PASTEN J A, ASLER-CREUTZ P, et al. Characterization of a family 43 β -xylosidase from the xylooligosaccharide utilizing putative probiotic *Weissella* sp. strain 92[J]. Glycobiology, 2015, 26(2): 193–202.
- [37] VIBORG A H, SORENSEN K I, GILAD O, et al. Biochemical and kinetic characterisation of a novel xylooligosaccharide-upregulated GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase (BXA43) from the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12[J]. AMB Express, 2013, 3(1): 56–63.
- [38] JORDAN D B, WAGSCHAL K, GRIGORESCU A A, et al. Highly active β -xylosidases of glycoside hydrolase family 43 operating on natural and artificial substrates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(10): 4415–4428.
- [39] WAGSCHAL K, HENG C, LEE C C, et al. Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 155(1/2/3): 304–313.
- [40] WAGSCHAL K, JORDAN D B, BRAKER J D. Catalytic properties of β -D-xylosidase XylBH43 from *Bacillus halodurans* C-125 and mutant XylBH43-

- W147G [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(3): 366–372.
- [41] DING N, ZHAO B Y, BAN X F, et al. Carbohydrate-binding module and linker allow cold adaptation and salt tolerance of maltopentaose-forming amylase from marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2–40^T [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 708480.
- [42] FELLER G, GERDAY C. Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(3): 200–208.
- [43] 张明慧, 李中媛, 仇海燕, 等. 低温木糖苷/阿拉伯呋喃糖苷酶 AX543 的基因克隆及性质研究[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 215–223.
- ZHANG M H, LI Z Y, QIU H Y, et al. Cloning and characterization of a novel cold-active bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase AX543[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 215–223.
- [44] SIDDIQUI K S. Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1912–1922.
- [45] SARMIENTO F, PERALTA R, BLAMEY J. Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3(148): 148–162.
- [46] CAVICCHIOLI R, CHARLTON T, ERTAN H, et al. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(4): 449–460.
- [47] ZHANG R, HE L M, SHEN J D, et al. Improving low-temperature activity and thermostability of exoinulinase InuAGN25 on the basis of increasing rigidity of the terminus and flexibility of the catalytic domain[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 1233–1244.
- [48] 马莉, 迟乃玉, 张庆芳. 低温木聚糖酶的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012(1): 19–22.
- MA L, CHI N Y, ZHANG Q F. Research progress of cold-adapted xylanase[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(1): 19–22.
- [49] LOPEZ C F, DARST R K, ROSSKY P J. Mechanistic elements of protein cold denaturation[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(19): 5961–5967.
- [50] DIAS C L, ALA-NISSILA T, WONG-EKKABOUT J, et al. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation[J]. *Cryobiology*, 2010, 60(1): 91–99.
- [51] KARAN R, CAPES M D, DASSARMA S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity[J]. *Aquatic Biosystems*, 2012, 8(1): 4–18.
- [52] SRIPRANG R, ASANO K, GOBSUK J, et al. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(4): 454–462.
- [53] TURUNEN O, VUORIO M, FENEL F, et al. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH [J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2002, 15(2): 141–145.
- [54] PEDERSEN H L, WILLASSEN N P, LEIROSB I. The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): Biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*[J]. *Acta Crystallographica*, 2010, 65(2): 84–92.
- [55] ZHOU J P, SONG Z F, ZHANG R, et al. Distinctive molecular and biochemical characteristics of a glycoside hydrolase family 20 β -N-acetylglucosaminidase and salt tolerance[J]. *BMC Biotechnology*, 2017, 17(1): 37–51.

Effects of Linker on the Thermal Adaptability of β -Xylosidase HJ14GH43

Cao Lijuan¹, Li Na¹, Liu Yu¹, Zhang Rui^{1,2,3,4}, Huang Zunxi^{1,2,3,4}, Zhou Junpei^{1,2,3,4*}

¹College of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500

²Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Yunnan Normal University, Kunming 650500

³Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming 650500

⁴Key Laboratory of Yunnan Provincial Education Department for Plateau Characteristic Food Enzymes, Yunnan Normal University, Kunming 650500)

Abstract In this study, the mutant MutLK10 was constructed by replacing the linker of β -xylosidase HJ14GH43 in order to reveal the mechanism of the linker on thermal adaptability of the β -xylosidase. MutLK10 was successfully expressed by *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then, the enzymatic characteristics and 3D structure of MutLK10 were analyzed. The results showed that the optimum temperature of mutant MutLK10 was 20 °C, which was 5 °C lower than that of the wild-type enzyme HJ14GH43. MutLK10 retained approximately 28% and 69% relative activities after being incubated at 20 °C and 10 °C for 60 min, respectively. Whereas HJ14GH43 retained approximately 70% and 88% relative activities after incubation at 20 °C and 10 °C for 60 min, respectively. Thus, MutLK10 had lower optimum temperature and worse thermal stability than HJ14GH43. The linkers of HJ14GH43 and MutLK10 were constructed as coil regions on the surfaces of proteins. Structural analysis showed that the negative potentials of the coil regions increased after the mutation, which led to the increase of hydrophilicity. It indicates that increasing the proportion of acidic amino acids in the linker can help the β -xylosidase compete for hydration by increasing the surface negative electrostatic potentials, that may result in the increase of the interactions between the enzyme and solvents and finally enables the enzyme to adapt to low-temperature environments. This study provides a reference for thermal adaptability modification of β -xylosidases and other industrial enzymes.

Keywords β -xylosidase; linker; thermal adaptability; low temperature; mechanism