

引用格式:

徐龙威, 雍婕, 周海燕. 一种新型糖苷水解酶的异源表达及酶学性质研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(6): 650–658.

XU L W, YONG J, ZHOU H Y. Heterologous expression and enzymatic properties of a novel glycoside hydrolase[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(6): 650–658.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



一种新型糖苷水解酶的异源表达及酶学性质研究

徐龙威, 雍婕, 周海燕*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 为得到 MtGH6 最优的表达宿主, 构建了质粒 pET21a-MtGH6、pBES-MtGH6、pPICZαA-MtGH6, 以大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285 及毕赤酵母 GS115 为工程菌, 对 MtGH6 进行异源表达及分离纯化, 并对表达 MtGH6 的 3 个宿主菌的生长状况、产酶量、纯化回收率、酶活力等参数进行比较分析。结果表明: 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 在生长稳定后, OD 值维持在 1.5, 而毕赤酵母 GS115 生长稳定后, OD 值维持在 2.0; 毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 为 77 mg/L, 纯化回收率为 15.40%, 产酶量和纯化回收率均高于大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的 MtGH6; 由毕赤酵母 GS115 表达的 MtGH6 的酶活力为 15.60 U/mg, 由大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 表达的 MtGH6 分别为 7.45、10.06 U/mg, 说明毕赤酵母 GS115 是 MtGH6 的最优表达宿主; 对其分泌的 MtGH6 的酶学性质展开研究, 结果表明在降解微晶纤维素的反应中, 该酶最适 pH 为 8.0, 最适温度为 60 °C, 添加 0.5 mmol/L Mn²⁺ 可使其活性提高, 表明 MtGH6 在生物燃料生产中可能具有良好的应用前景。

关键词: 糖苷水解酶; 异源表达; 宿主菌; 酶学性质

中图分类号: Q556⁺.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)06-0650-09

Heterologous expression and enzymatic properties of a novel glycoside hydrolase

XU Longwei, YONG Jie, ZHOU Haiyan*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In order to obtain the optimal expression host of MtGH6, we used plasmid pET21a-MtGH6, pBES-MtGH6 and pPICZαA-MtGH6 to express the MtGH6 by use of *Escherichia coli* BL21, *Bacillus subtilis* RIK1285 and *Pichia pastoris* GS115. The growth status, enzyme production, purification efficiency and enzyme activity of the three host bacteria expressing MtGH6 were compared and analyzed. The results showed that the OD value of *Escherichia coli* BL21 and *Bacillus subtilis* RIK1285 remained at 1.5 after stable growth, while that of *Pichia pastoris* GS115 remained at 2.0 after stable growth. MtGH6 produced by *Pichia pastoris* GS115 was 77 mg/L, and the purification recovery was 15.40%. The enzyme production and purification recovery were higher than those produced by *Escherichia coli* BL21 and *Bacillus subtilis* RIK1285. The enzyme activity of MtGH6 expressed by *Pichia pastoris* GS115 was 15.60 U/mg, and the activity of MtGH6 expressed by *Escherichia coli* BL21 and *Bacillus subtilis* RIK1285 was 7.45 U/mg and 10.06 U/mg, respectively, indicating that *Pichia Pastoris* GS115 was the optimal host for MtGH6 expression. The enzyme properties of MtGH6 secreted by *Pichia Pastoris* GS115 were studied. The results showed that the optimum pH and temperature of this enzyme were 8.0 and 60 °C, and the addition of 0.5 mmol/L Mn²⁺ could increase its activity, indicating that MTGH6

收稿日期: 2022-03-08

修回日期: 2022-11-24

基金项目: 湖南农业大学“双一流”建设工程(SYL201802002)

作者简介: 徐龙威(1997—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究, xlwhnau1101@163.com; *通信作者, 周海燕, 博士, 教授, 主要从事蛋白质工程、微生态研究, sws001@163.com

had a good application prospect in the production of biofuels.

Keywords: glucoside hydrolase; heterologous expression; host bacteria; enzymatic property

农业的快速发展产生了大量的农业废弃物,如玉米纤维、玉米秸秆、甘蔗渣、稻壳等^[1]。木质纤维素作为植物细胞壁的主要成分(占生物量的 50%左右)在农业废弃物中占有较大的比重^[2];因此,如何回收木质纤维素,值得社会的广泛关注。木质纤维素通过预处理可以得到纤维素,而纤维素可进一步通过酸法、碱法、酶法转化为糖类^[3];糖经过发酵可最终转化为生物乙醇,故木质纤维素的回收利用可用于生物质的能源开发^[4];而生物酶法相较于酸法和碱法对于环境污染的破坏最小,是值得提倡的处理方法^[5]。

在采用酶法预处理木质纤维素的研究中,存在 2 种类型的纤维素酶系统:一种是厌氧细菌(如热梭状芽孢杆菌)中被称为纤维素体的酶复合体,它由一种非酶支架蛋白组成,与各种酶亚基结合,协同降解纤维素和半纤维素,是一种复合纤维素酶系统^[6];另一种是由丝状真菌和好氧细菌中的胞外纤维素酶组成的非复合纤维素酶系统,也可协同降解纤维素^[7],常用于工业。

通过理性及非理性蛋白质设计技术挖掘并开发具有工业应用潜力的新型纤维素酶一直是研究

的热点^[8]。选取合适的宿主菌进行蛋白异源表达非常重要。本研究中,以 MtGH6 为目标蛋白,在大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母 3 种不同宿主菌中对 MtGH6 进行异源表达,比较分析不同宿主在表达 MtGH6 时的生长状况、产酶量、纯化回收率、酶活力等参数,以确定此异源蛋白的最优表达宿主,旨在为纤维素酶 MtGH6 的工业化应用提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

pET21a-MtGH6、pBES-MtGH6 的质粒和枯草芽孢杆菌 RIK1285 由中国科学院微生物研究所吴边组惠赠;质粒 pPICZαA-MtGH6、大肠埃希菌 Top10、大肠埃希菌 BL21、毕赤酵母 GS115 由湖南农业大学生物工程研究所提供;LB 培养基为大肠埃希菌培养基;含有 3 种氨基酸(色氨酸、蛋氨酸、赖氨酸)的 TB 培养基为枯草芽孢杆菌培养基;YPD 培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基为常用毕赤酵母培养基。基因克隆所用引物见表 1。

表 1 PCR 所用引物

Table 1 Primers for PCR

引物名称	序列(5'-3')
pET21a-MtGH6-F	AGAAGGAGATATACATATGGGTTGTGAAGTGGATT
pET21a-MtGH6-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGT
pBES-MtGH6-F	GGCAGCACATCCTCTGCCAGATGGGCTGCGAAGT
pBES-MtGH6-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTCAACCGCG
pPICZαA-MtGH6-F	GGCTGAAGCTGAATTCATGGGTTGTGAAGTGG
pPICZαA-MtGH6-R	GGCTCGAGGTACCCTCGAGTTCCACC

1.2 方法

1.2.1 目标酶基因在宿主菌中的转化与鉴定

1) 携带质粒 pET21a-MtGH6 的大肠埃希菌 BL21 的转化与鉴定。将质粒 pET21a-MtGH6 转入 Top10 商业感受态细胞中进行克隆,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板中过夜培养,筛选阳性克隆,用试剂盒提取质粒后,导入大肠埃希菌 BL21 中。引物 pET21a-MtGH6-F 及 pET21a-MtGH6-R 用于菌落 PCR 验证。

2) 携带质粒 pBES-MtGH6 的枯草芽孢杆菌 RIK1285 的转化与鉴定。采用平板划线法活化枯草芽孢杆菌 RIK1285,挑取单克隆至 2 mL 1×MC 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 5 h,将 400 μL 的培养基放入新的 EP 管中,加入 5 μL 的质粒 pBES-MtGH6,在 37 °C、220 r/min 条件下培养 2 h,5000g 离心,收集沉淀,留 100 μL 混匀菌体,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板中,得到携带质粒 pBES-MtGH6 的枯草芽孢杆菌 RIK1285。引物

pBES-MtGH6-F 及 pBES-MtGH6-R 用于菌落 PCR 验证。

3) 携带质粒 pPICZ α A-MtGH6 的毕赤酵母 GS115 的转化与鉴定。通过引物 pPICZ α A-F 和 pPICZ α A-R 克隆载体 pPICZ α A, 再经引物 pPICZ α A-MtGH6-F 和 pPICZ α A-MtGH6-R 克隆 MtGH6 编码基因, 回收获得的基因片段, 使用 *Eco*RI 及 *Kpn*I 酶切回收的基因片段, 将酶切产物连接后得到重组质粒 pPICZ α A-MtGH6, 再转入 Top10 感受态细胞中。使用含有博来霉素的 LB 平板筛选阳性克隆并测序。检测无误后, 将质粒 pPICZ α A-MtGH6 导入毕赤酵母细胞中。引物 pPICZ α A-F 和 pPICZ α A-R 用于菌落 PCR 验证。

1.2.2 MtGH6 粗酶的表达及分析

1) MtGH6 粗酶在大肠埃希菌中的表达及分析。将携带表达载体 pET21a-MtGH6 的大肠埃希菌 BL21(DE3)接种于 LB 培养基(含 50 μ g/mL 氨苄青霉素)中, 运用生长曲线仪测量其生长曲线, 37 $^{\circ}$ C 下培养至 OD₆₀₀ 约 0.8。此时, 加入 0.5 mmol/L 的异丙基硫代- β -D 半乳糖苷(IPTG), 30 $^{\circ}$ C 下孵育 48 h, 诱导 MtGH6 的表达。离心(8000g、10 min、4 $^{\circ}$ C)后收集细胞, 在含有 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)、500 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑的缓冲液中冰冻超声裂解细胞。通过离心(14 000g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C)和过滤(0.22 μ m Filter, Millex), 除去沉淀物, 得到细胞提取液, 收集上清液, 得到粗酶。使用 Bradford 法测量其蛋白浓度, 计算其产酶量。

2) MtGH6 粗酶在枯草芽孢 RIK1285 中的表达及分析。将携带表达载体 pBES-MtGH6 的枯草芽孢杆菌 RIK1285 接种于含有色氨酸、蛋氨酸、赖氨酸及卡那霉素的 TB 培养基中, 运用生长曲线仪测量其生长曲线; 30 $^{\circ}$ C 下孵育 48 h, 180 r/min 离心, 收集上清液, 往上清液中添加无水 CaCl₂ 至 10 g/L, 沉淀磷酸盐, 调 pH 至 7.5, 离心(6500g、20 min、4 $^{\circ}$ C)后收集上清液, 缓慢加入硫酸铵至饱和度达 100%, 离心回收沉淀, 80%丙酮 3 次洗涤沉淀, Tris-HCl 缓冲液(pH 7.9)重悬沉淀, 0.22 μ m 滤膜过滤, 得到粗酶。采用 Bradford 法测量其蛋白浓度, 计算其产酶量。

3) MtGH6 粗酶在毕赤酵母 GS115 中的表达及分析。将携带 pPICZ α A-MtGH6 质粒的毕赤酵母

GS115 接种于 5 mL YPD 培养基, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 12 h, 取 1 mL 培养液转至 50 mL BMGY 培养基; 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 24 h, 离心收集菌体, 转接于含 1.5%甲醇的 50 mL BMMY 培养基, 运用生长曲线仪测量其生长曲线, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 再培养 84 h 后离心分离菌泥与上清液; 在上清液中缓慢加入硫酸铵至饱和度达 100%, 离心收集沉淀后对沉淀物进行透析。收集透析袋内的液体, 0.22 μ m 滤膜过滤, 得到粗酶。采用 Bradford 法测量其蛋白浓度, 计算其产酶量。

1.2.3 重组蛋白 MtGH6 的纯化

将 MtGH6 粗酶添加至含有镍离子填料的层析柱中(His Tagged Protein Purification Kit, 康为世纪), 用 50 mL 结合缓冲液 A(含有 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)、500 mmol/L NaCl、40 mmol/L 咪唑)洗涤, 以 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)、500 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑作为洗脱缓冲液。选取质量分数为 15%的蛋白胶, 采用 SDS-PAGE 法鉴定纯化效果, Bradford 法测量其蛋白浓度, 计算 MtGH6 的回收率。

1.2.4 不同宿主菌生产的 MtGH6 的酶活性比较

在含有 10 mg/mL 微晶纤维素的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.9)中加入 0.1 mL 的 MtGH6, 60 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min 后, 加入 1.5 倍体积的 DNS 试剂终止反应, 混合物煮沸 5 min 后测量 OD₅₄₀。纤维素外切酶活性的单位(U)定义为以微晶纤维素为底物, 每分钟释放 1 μ mol 还原糖的酶的量。

1.2.5 MtGH6 的酶学性质研究

1) pH 和温度对 MtGH6 的影响。为研究温度对酶活力的影响, 在 20~90 $^{\circ}$ C 的温度范围内以 10 $^{\circ}$ C 为 1 个温度梯度, 测定 MtGH6 在不同温度下的酶活力。为研究 pH 对 MtGH6 酶活性的影响, 配置了 4 种不同 pH 值的反应底物缓冲液: pH 4.0~6.0 的柠檬酸盐缓冲液、pH 6.0~8.0 的磷酸盐缓冲液、pH 7.0~9.0 的 Tris-HCl 缓冲液、pH 8.0~10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。在不同 pH 值的反应体系下, 分别测定 MtGH6 的酶活性。

2) 金属离子对 MtGH6 的影响。在反应溶液中分别加入 0.5 mmol/L 的 MgCl₂、CaCl₂、MnCl₂、FeCl₃、CoCl₂、ZnCl₂、BaCl₂, 研究不同金属离子对 MtGH6 活性的影响, 以未添加金属离子的样品

为对照,测定其相对酶活力。

3) MtGH6 的动力学分析。在最适反应条件下,测定不同质量浓度微晶纤维素(2~16 mg/mL)对酶催化效率的影响,以此来计算动力学参数。

1.3 数据分析

采用英国 UVItec 的凝胶成像系统拍摄核酸及蛋白电泳图;采用芬兰百奥斯科林公司的生长曲线仪 FP-1100-C 记录大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 的生物量变化;采用赛默飞世尔科技公司的多功能酶标仪 Varioskan LUX 计算酶浓度及还原糖的变化;采用

Origin 2018 64Bit 进行数据分析;采用 Office 2019 绘图。

2 结果与分析

2.1 MtGH6 在 BL21、RIK1285、GS115 中的转化与鉴定结果

质粒 pET21a-MtGH6、pBES-MtGH6、pPICZαA-MtGH6 的各个转录元件见图 1。运用 NCBI 网站中的 Blast 功能进行多序列比对,比对结果符合理论设计,分别导入 BL21、RIK1285、GS115 中,菌落 PCR 结果(图 2)显示成功导入。

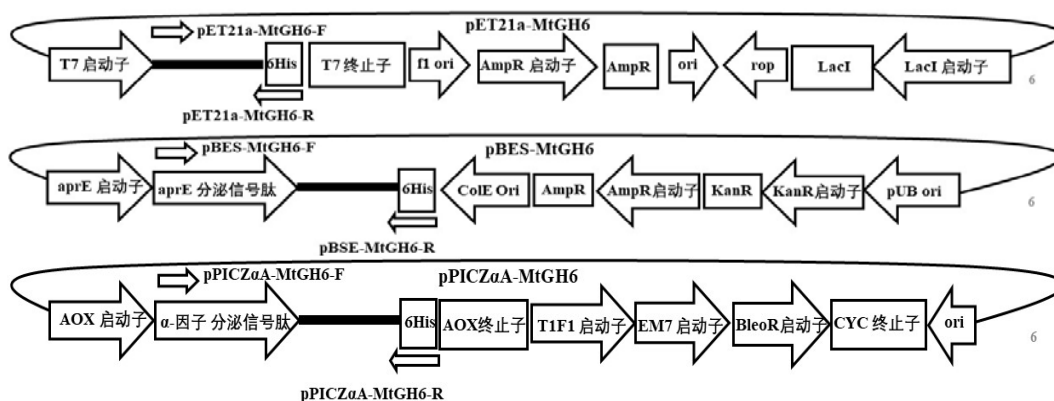
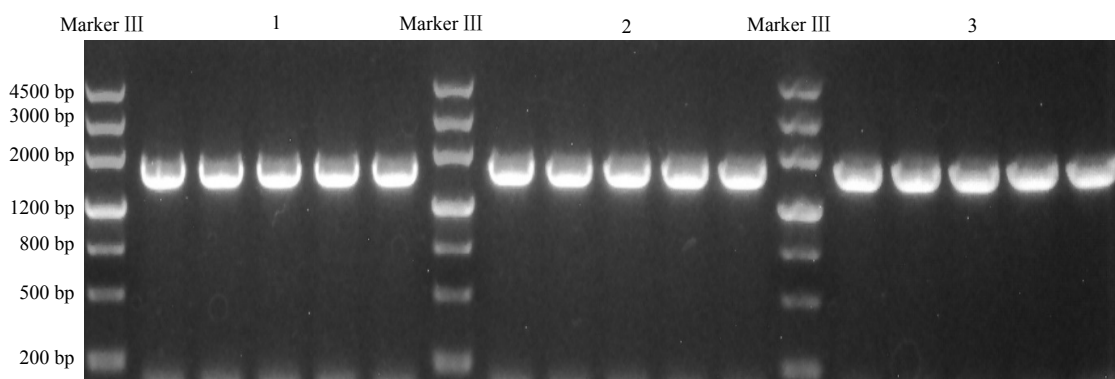


图 1 pET21a-MtGH6、pBES-MtGH6 及 pPICZαA-MtGH6 的质粒图谱

Fig.1 Plasmid profile of pET21a-MtGH6, pBES-MtGH6 and pPICZαA-MtGH6



1 携带重组质粒 pET21a-MtGH6 的大肠埃希菌 BL21 菌落 PCR 结果; 2 携带重组质粒 pBES-MtGH6 的枯草芽孢杆菌 RIK1285 菌落 PCR 结果; 3 重组质粒 pPICZαA-MtGH6 的毕赤酵母 GS115 的菌落 PCR 结果。

图 2 菌落 PCR 鉴定结果

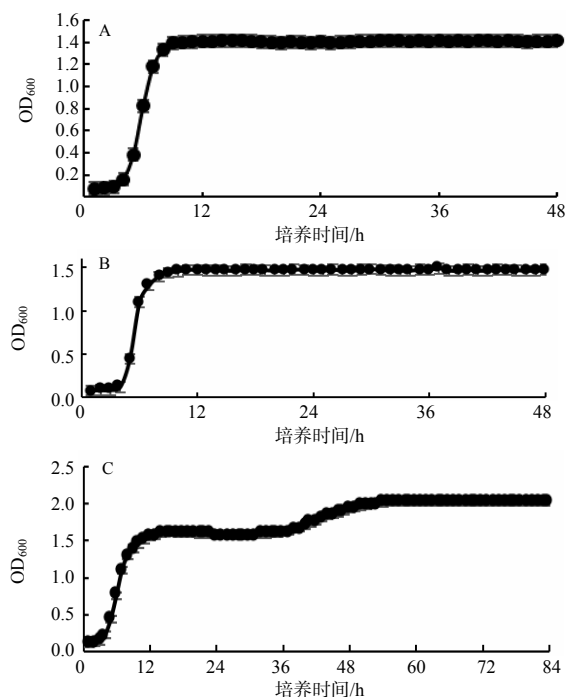
Fig.2 Colony PCR identification results

2.2 重组蛋白 MtGH6 在大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 的表达

2.2.1 大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 的生物量变化

使用生长曲线测序仪测得大肠埃希菌 BL21、

枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 的生长曲线。从生长曲线(图 3)可以看出,大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285 在 4 h 后开始进入对数生长期,而后生物量维持稳定,OD₆₀₀ 均为 1.5;毕赤酵母在接种 40 h 后生物量又开始增加,再经过 10 h 后保持不变,OD₆₀₀ 为 2.0。



A 大肠埃希菌 BL21 的生长曲线; B 枯草芽孢杆菌 RIK1285 的生长曲线; C 毕赤酵母 GS115 的生长曲线。

图3 不同表达宿主的生长曲线

Fig.3 Growth curves of different expression hosts

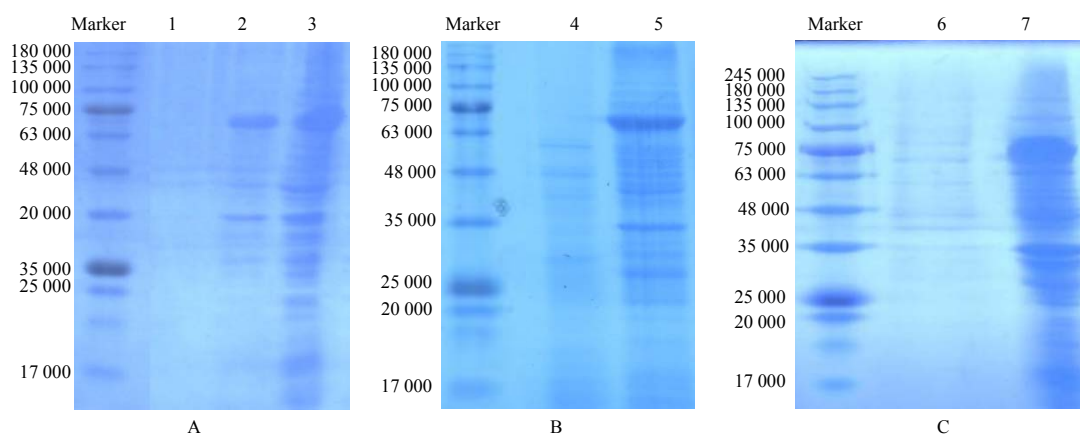
2.2.2 大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 粗酶的鉴定

使用大肠埃希菌 BL21 表达 MtGH6, 其启动子为 T7 强启动子, Lac 乳糖操纵子元件添加诱导

剂 IPTG 后可诱导蛋白的表达; 超声法破碎后, 离心得到粗酶, 采用 Bradford 法测其浓度为 2.70 mg/mL, 体积为 20 mL, 总产酶量为 54 mg。SDS-PAGE 验证后发现, 培养基上清液中无蛋白表达, 而菌泥破碎后的上清液及沉淀中均有蛋白表达(图 4-A)。究其原因, 可能是破碎不够彻底, 仍有部分蛋白存在于菌泥中; 也有可能是蛋白质的错误折叠导致包涵体的形成。

以枯草芽孢杆菌 RIK1285 为表达宿主, 收集上清液, 盐析、洗涤后测得粗酶的质量浓度为 1.53 mg/mL, 体积为 20 mL, 总产酶量为 30.6 mg。枯草芽孢杆菌 RIK1285 菌泥及上清盐析液的 SDS-PAGE 结果(图 4-B)表明 MtGH6 只存在于上清中。究其原因可能是添加了信号肽 aprE, 使枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的蛋白向培养基中分泌。

毕赤酵母 GS115 表达 MtGH6 时, 其启动子为 AOX1, 在甲醇的诱导下, 生成了大量的 MtGH6, 将收集的上清液盐析并透析后, 测得 MtGH6 的粗酶质量浓度为 2.76 mg/mL, 体积为 20 mL, 总产酶量为 55.2 mg。从毕赤酵母 GS115 菌泥及培养基上清盐析液的 SDS-PAGE 结果(图 4-C)可以看出, MtGH6 以可溶的形式大量存在于上清中。究其原因可能是 α 因子信号肽使目标酶分泌于培养基中。



泳道 1 为大肠埃希菌 BL21 的培养基上清; 泳道 2 为大肠埃希菌的破碎后沉淀; 泳道 3 为大肠埃希菌 BL21 破碎后的上清; 泳道 4 为枯草芽孢杆菌 RIK1285 的菌泥; 泳道 5 为枯草芽孢杆菌 RIK1285 上清的盐析液; 泳道 6 为毕赤酵母 GS115 的菌泥; 泳道 7 为毕赤酵母 GS115 上清盐析后的透析液。

图4 重组蛋白 MtGH6 粗酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis results of crude enzyme of recombinant protein MtGH6

2.3 由大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 纯酶鉴定

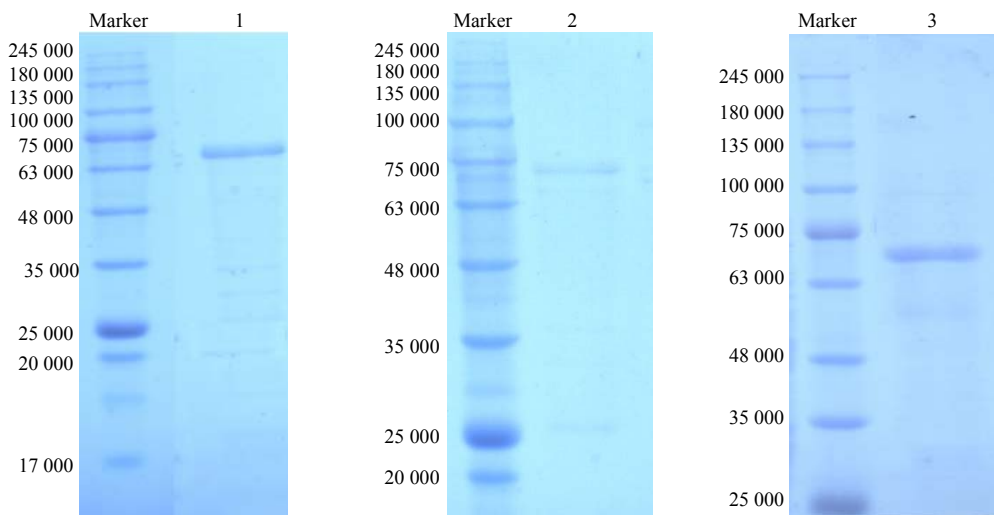
从表 2 可以看出, 毕赤酵母 GS115 生产的

MtGH6 为 77 mg/L, 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的 MtGH6 分别为 56、32 mg/L; 毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 回收率为 15.40%, 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌

RIK1285 生产的 MtGH6 回收率分别为 10.37%和 10.45%。可见，毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 的产量和纯化效率都较高。将得到的纯酶采用 SDS-PAGE 法鉴定，测得 MtGH6 的表观相对分子质量为 68 000 (图 5)，与理论值相符。

表 2 MtGH6 的纯化参数

Table 2 Purification parameters of MtGH6			
宿主菌	粗酶液/ (mg·L ⁻¹)	纯化的 MtGH6/ (mg·L ⁻¹)	回收率/%
大肠埃希菌 BL21	540	56	10.37
枯草芽孢杆菌 RIK1285	306	32	10.45
毕赤酵母 GS115	552	77	15.40



泳道 1 为大肠埃希菌 BL21 表达的 MtGH6 亲和层析分离结果；泳道 2 为枯草芽孢杆菌 RIK1285 表达的 MtGH6 亲和层析分离结果；泳道 3 为毕赤酵母 GS115 表达的 MtGH6 亲和层析分离结果。

图 5 重组蛋白 MtGH6 被亲和层析分离后的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.5 Polyacrylamide gel electrophoresis results of recombinant protein MtGH6 separated by affinity chromatography

2.4 由大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285、毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 酶活性比较

由于不同表达系统对于 MtGH6 的修饰及翻译过程不同，MtGH6 在不同宿主中表达的酶活性也不一样。比较(图 6)发现，毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 降解微晶纤维素的酶活力最大，为 15.60 U/mg，高于枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的 MtGH6 的酶活力(10.06 U/mg)及大肠埃希菌 BL21 生产的 MtGH6 的酶活力(7.45 U/mg)。不同宿主表达的 MtGH6 酶活力方差分析结果(表 3)显示，*P* 值为 5.80×10^{-6} ，检验统计量 *F* 大于检验临界值 *F*_{crit}。

说明 3 种单因素存在显著性差异，毕赤酵母 GS115 为 MtGH6 最优的表达宿主。

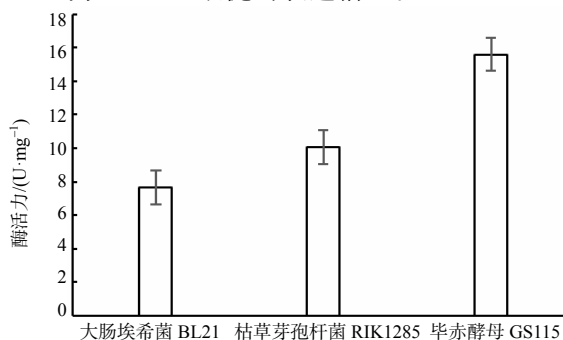


图 6 不同宿主菌表达的 MtGH6 的酶活力

Fig.6 MtGH6 enzyme activity expressed by different host bacteria

表 3 来源于不同宿主的 MtGH6 酶活力的方差分析结果

Table 3 Variance analysis of MtGH6 enzyme activity from different hosts						
差异来源	SS	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i> _{crit}
组间	106.028 9	2	53.014 4	163.928 5	5.80E-06	5.143 253
组内	1.940 4	6	0.323 4			
总计	107.969 3	8				

2.5 MtGH6 的酶学性质分析

MtGH6 在不同温度下的催化速率如图 7 所示。从图 7 可以看出, 其表观最适温度为 60 °C, 在较宽的温度范围(50~70 °C)下, 相对酶活性仍高于 60%。

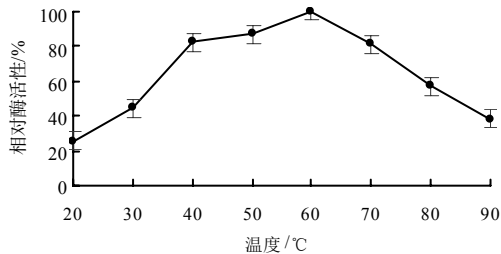


图 7 不同温度下 MtGH6 的酶活性

Fig.7 Enzyme activity of MtGH6 at different temperatures

从图 8 可以看出, 在酸性环境下, MtGH6 的酶活性较弱, 随着 pH 值的下降, 其酶活性也逐渐减小; 其在 pH 6~10 范围内有着较好的稳定性和较高的酶活性, 在 pH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液中 MtGH6 的酶活性最高。

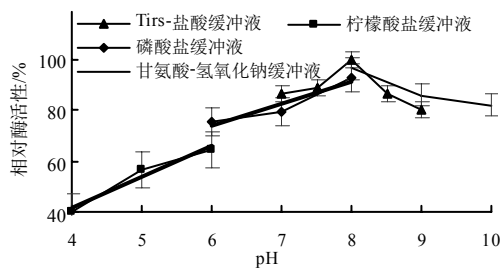


图 8 不同 pH 条件下 MtGH6 的酶活性

Fig.8 Enzyme activity of MtGH6 at different pH

酶残基与二价金属离子之间的配合可能会引起蛋白质结构的改变, 对催化速率或其他性质产生影响。从图 9 可以看出, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活性的影响并不显著。0.5 mmol/L 的 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 对反应有明显的抑制作用; 0.5 mmol/L 的 Co^{2+} 对

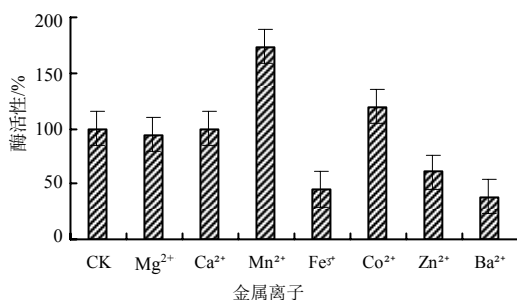


图 9 不同金属离子条件下 MtGH6 的酶活性

Fig.9 Enzymatic activity of MtGH6 with the addition of different metal ions

反应速率有轻微的促进作用; 添加 Mn^{2+} 后, 酶活性显著提高。表明金属离子在酶促反应时, 可作为激活剂, 促进酶更好地作用于底物。

依据不同底物浓度下 MtGH6 的酶活力, 测定其动力学常数, 结果如图 10 所示。在 0.5 mmol/L Mn^{2+} 存在下, MtGH6 的米氏常数 K_m 和转化数 k_{cat} 分别为 (7.83 ± 3.70) mg/mL、 (72.01 ± 29.01) /s。基于这些参数, 测定 k_{cat}/K_m 值为 (14.10 ± 10.37) mL/(mg·s)。同时, 在没有 Mn^{2+} 的情况下, K_m 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值为 (7.78 ± 3.08) mg/mL、 (37.49 ± 11.77) /s 和 (6.43 ± 4.06) mL/(mg·s), 推测 Mn^{2+} 能通过提高催化效率而不是底物亲和力来增加 MtGH6 的酶活力。

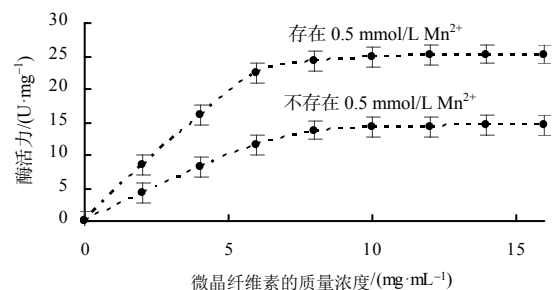


图 10 MtGH6 在不同底物浓度下的比活力

Fig.10 Specific activity of MtGH6 at different substrate concentrations

3 结论与讨论

在现代生物技术高速发展的背景下, 纤维素酶由于能水解 β -1, 4 糖苷键, 能将纤维素高分子材料变为小分子糖类, 在实际生产及生活中具有重要作用。分子生物学的出现使得利用异源宿主进行蛋白质和蛋白质复合体的过度表达成为可能。大肠埃希菌具有极快的生长动力学, 可以获得高细胞密度, 且培养基和试剂价格低廉, 表达构建体的转化简单^[9]。枯草芽孢杆菌能够利用各种信号肽非特异性地分泌重组蛋白, 与革兰阴性菌宿主相比优势明显^[10]。毕赤酵母可以生长到非常高的细胞密度, 具有可用且受严格调控的强启动子, 因而被广泛用于生物制药和工业酶的生产^[11]。

本研究中, 以糖苷水解酶 MtGH6 为研究对象, 构建了质粒 pET21a-MtGH6、pBES-MtGH6、pPICZ α A-MtGH6, 选取大肠埃希菌 BL21、枯草芽孢杆菌 RIK1285 及毕赤酵母 GS115 作为工程菌对 MtGH6 进行了异源表达及分离纯化, 并对表达

MtGH6 的 3 个宿主菌的生长状况、产酶量、纯化回收率、酶活力等参数进行了比较分析。

生物量方面, 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 在生长稳定后, OD 值维持在 1.5, 而毕赤酵母 GS115 生长稳定后, OD 值维持在 2.0, 表明毕赤酵母 GS115 的生长状况更好, 更有利于产酶。造成此现象的原因可能是 BMMY 培养基较 LB 培养基及 TB 培养基营养成分更丰富。

产酶量方面, 毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 为 77 mg/L, 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的 MtGH6 分别为 56、32 mg/L, 产酶量因选用启动子不同而有所差异。研究^[12]表明, 枯草杆菌表达系统虽可成功表达一些异源基因, 但存在蛋白质产量低的缺点, 限制了其应用潜力, 本研究结果也验证了这一现象。大肠埃希菌 BL21 和毕赤酵母 GS115 采用的是强启动子 T7 启动子和 AOX1 启动子, 所以产酶量高于枯草芽孢杆菌 RIK1285; 而大肠埃希菌 BL21 是一种致病细菌, 含有内毒素(脂多糖), 易形成包涵体^[13], 作为表达宿主有其局限性, 从 SDS-PAGE 结果可看出其在沉淀损失了许多: 因此, 从产量及蛋白损失情况看, 毕赤酵母 GS115 表达 MtGH6 具有显著优势。

纯化回收率方面, 毕赤酵母 GS115 生产的 MtGH6 回收率为 15.40%, 大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 生产的 MtGH6 回收率分别为 10.37% 和 10.45%, 说明毕赤酵母生产的蛋白中 MtGH6 所占比重更高, 诱导效果更好。

酶活力方面, 由毕赤酵母 GS115 表达的 MtGH6 的酶活力为 15.60 U/mg, 由大肠埃希菌 BL21 及枯草芽孢杆菌 RIK1285 表达的 MtGH6 分别为 7.45、10.06 U/mg, 说明毕赤酵母 GS115 是 MtGH6 的最优表达宿主。究其原因可能是毕赤酵母表达系统具有独特的翻译后修饰功能, 由其分泌的重组蛋白 MtGH6 相较于其他 2 种表达系统的酶活力更高。

近年来, 国内外不断有新型的纤维素酶被挖掘与研究。ISLAM 等^[14]筛选到芽孢杆菌、芽孢杆菌、气单胞菌, 测得所产的纤维素酶的最适温度皆为 40 °C, 最适 pH 值为 7。杨丽娜等^[15]从腐烂秸秆与腐殖质土壤样品中分离出的纤维素降解菌

芽孢杆菌属(*Bacillus*)微生物 NP29 所产纤维素酶的反应最适 pH 为 4.5, 最佳反应温度为 65 °C; 杨力权等^[16]从稻草堆肥中筛选得到一株产高温纤维素酶的木霉属菌株 M1, 其所产纤维素酶的最适反应 pH 为 4.4, 最适反应温度为 75 °C。本研究中, 由毕赤酵母 GS115 表达的 MtGH6, 其降解微晶纤维素的最适 pH 为 8.0, 相较于上述纤维素酶, 其在较宽的 pH 范围(pH 6~10)内维持着较高的酶活性。

碱法是木质纤维素的预处理方法之一^[17]。杨俊换等^[18]在油茶籽壳发酵产羧甲基纤维素酶的优化实验中, 使用了碱法来对油茶籽壳进行预处理。MtGH6 在碱性环境中的高活性, 使其能够减少原材料经碱法预处理后的中和成本。本研究中, MtGH6 作用于微晶纤维素的最适温度为 60 °C, 且在 50~70 °C 温度范围内稳定性较高。在大规模微生物发酵产酶过程中, 通常使用蒸汽法对原材料进行灭菌, 而 MtGH6 适应于高温环境, 能大大减少原材料的冷却成本。此外, 在工业发酵产酶过程中, 常需要添加微量元素, 以调节微生物代谢活动。本研究结果表明, 添加 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 能增强 MtGH6 的酶活力, 而 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对 MtGH6 的酶活力无干扰, Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 及 Ba^{2+} 对 MtGH6 的酶活力有明显的抑制作用: 因此, 如需大规模发酵生产 MtGH6, 应避免 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 及 Ba^{2+} 的添加。

综上所述, 由毕赤酵母 GS115 表达的 MtGH6 具备优良的耐热性, 在较宽的 pH 范围内维持着较高的酶活性, 添加 Mn^{2+} 能显著提高 MtGH6 的酶活力, 推测 MtGH6 在生物燃料生产中可能具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] CHANG C C, LI R D. Agricultural waste[J]. Water Environment Research, 2019, 91: 1150-1167.
- [2] FATMA S, HAMEED A, NOMAN M, et al. Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future[J]. Protein and Peptide Letters, 2018, 25(2): 148-163.
- [3] KUCHARSKA K, RYBARCZYK P, HOŁOWACZ I, et al. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes[J]. Molecules, 2018, 23(11): 2937.
- [4] SRIVASTAVA N, RATHOUR R, JHA S, et al. Microbial beta glucosidase enzymes: recent advances in

- biomass conversation for biofuels application[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(6): 220.
- [5] CAPOLUPO L, FARACO V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9451–9467.
- [6] BOMBLE Y J, BECKHAM G T, MATTHEWS J F, et al. Modeling the self-assembly of the cellulosome enzyme complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(7): 5614–5623.
- [7] ENGER M D, SLEEPER B P. Multiple cellulase system from *Streptomyces antibioticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1965, 89(1): 23–27.
- [8] TUAN L Q A. Rational protein design for enhancing thermal stability of industrial enzymes[J]. *Engineering and Technology*, 2020, 8(1): 3–17.
- [9] FERNÁNDEZ F J, VEGA M C. Choose a suitable expression host: a survey of available protein production platforms[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 896: 15–24.
- [10] GU Y, XU X H, WU Y K, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 109–121.
- [11] TÜRKANÖĞLU ÖZÇELİK A, YILMAZ S, INAN M. *Pichia pastoris* promoters[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J.), 2019, 1923: 97–112.
- [12] LI W F, ZHOU X X, LU P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(8): 605–610.
- [13] BHATWA A, WANG W, HASSAN Y I, et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 630551.
- [14] ISLAM F, ROY N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses[J]. *BMC Research Notes*, 2018, 11(1): 445.
- [15] 杨丽娜, 杨明明, 龚月生. 产耐热性纤维素酶菌株的分离·鉴定及其酶学性质研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(14): 8103–8105.
- [16] 杨力权, 周连广, 陈贵元, 等. 一株产高温纤维素酶菌株的筛选、鉴定及其酶学性质研究[J]. *中国饲料*, 2019(11): 40–44.
- [17] 何士成, 彭太兵, 孙曼钰, 等. 碱处理中温度对不同底物特性木质纤维素结构及酶解的影响[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(21): 292–296.
- [18] 杨俊换, 郭华, 欧阳晶. 用响应面法优化油茶籽壳发酵产羧甲基纤维素酶的条件[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 40(4): 416–420.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正