

木聚糖酶 *EvXyn11*^{TS} 耐热性与其 N 端二硫键的相关性分析

闵柔¹, 李剑芳², 高树娟¹, 张慧敏², 吴静³, 邬敏辰^{3*}

江南大学,¹药学院,²食品学院,³无锡医学院, 无锡 214122

摘要: 【目的】以糖苷水解酶 11 家族耐热木聚糖酶 *EvXyn11*^{TS} 为研究对象, 定点突变其编码基因 *Syxyn11*, 揭示 *EvXyn11*^{TS} 耐热性与其 N 端二硫键的相关性。【方法】对不同来源的、与 *EvXyn11*^{TS} 一级结构相似度较高的若干 11 家族木聚糖酶进行多序列同源比对, 发现只有耐热的 *EvXyn11*^{TS} 在其 N 端存在一个二硫键 (Cys⁵ – Cys³²); 运用分子动力学模拟预测该 N 端二硫键存在与否对木聚糖酶热稳定性的影响。以人工合成的 *Syxyn11* 为母本, 采用 PCR 技术将其编码 Cys⁵ 的密码子 TGT 突变为编码 Thr⁵ 的 ACT, 构建去除了 N 端二硫键的突变酶 (*EvXyn11*^M) 的编码基因 *Syxyn11*^M; 分别将 *Syxyn11* 和 *Syxyn11*^M 在毕赤酵母 GS115 中进行表达, 并分析表达产物 *EvXyn11*^{TS} 和 *EvXyn11*^M 的温度和 pH 特性。【结果】酶学性质研究结果表明: *EvXyn11*^M 的最适温度 T_{opt} 由突变前的 85°C 降至 70°C; *EvXyn11*^{TS} 在 90°C 的半衰期 $t_{1/2}^{90}$ 为 32 min, 而 *EvXyn11*^M 在 70°C 的半衰期 $t_{1/2}^{70}$ 仅为 8.0 min。【结论】运用分子动力学模拟预测了 N 端二硫键对 *EvXyn11*^{TS} 耐热性的重要作用, 并通过定点突变验证之, 为其它与耐热 *EvXyn11*^{TS} 一级结构相似的、11 家族常温高比活性木聚糖酶的耐热性改造提供了新的技术策略。

关键词: 木聚糖酶, 耐热性, N 端二硫键, 分子动力学模拟, 定点突变

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 04-0346-08

内切 β -1, 4-D-木聚糖酶通常简称为木聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 8), 能从木聚糖分子主链的内部随机切割 β -1, 4 糖苷键, 产生带有或无侧链基团的寡聚木糖。基于一级结构的同源性比对和疏水簇分析, 绝大多数木聚糖酶归属糖苷水解酶 (GH) 10 和 11 家族^[1]。与其它 GH 家族不同, 11 家族只含有木聚糖酶, 具有高底物特异性、低分子量 (< 30 kDa) 和碱性等电点等特征, 空间结构主要由 β -折叠股形成的两个 β -折叠片和一个 α -螺旋所构成的单一催化结构域, 呈右手半握形状^[2]。

由于生物酶催化具有极高的效率、高度的特异

性和对环境友好等优点, 其已逐渐取代化学催化应用于工业生产过程中^[3]。木聚糖酶是木聚糖降解酶系中最重要的酶, 广泛应用于造纸、饲料、食品、能源及功能性寡聚木糖生产等诸多工业领域^[4]。不同的应用领域需要对应特性的木聚糖酶, 如纸浆漂白和饲料加工等过程中要求酶同时具备高催化活性和耐高温的特性, 但天然酶通常难以达到这些要求。因此, 如何提高耐热酶的比活性或高比活性酶的热稳定性已成为广泛关注的热点。目前主要由两种途径获得耐热酶: 一是从嗜热微生物中筛选天然耐热酶, 二是对常温高比活性酶进行耐热性改造^[5]。就

基金项目: 国家自然科学基金 (31101229)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85329042; E-mail: biowmc@126.com

作者简介: 闵柔 (1986-), 女, 四川内江人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: minrou.jiangnan@163.com

收稿日期: 2012-11-20; 修回日期: 2013-01-17

11 家族木聚糖酶而言, 利用定点突变构建二硫键以提高常温木聚糖酶耐热性的报道较多, 如 Turunen 等人^[6] 和 Jeong 等人^[7] 分别将来源于里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 和嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的 11 家族木聚糖酶 α -螺旋区和 β -折叠层 A7 上特定的氨基酸突变为半胱氨酸以形成二硫键, 突变酶的热稳定性均得到了显著提高。Paës 等^[8] 的研究结果表明多个二硫键的协同作用能进一步提高 11 家族木聚糖酶的热稳定性。

EvXyn11^{TS} 是迄今为止发现的 11 家族中极少数耐热木聚糖酶之一, 其由 Dumon 等人从自然界中一株未命名菌株中提取, 经改造后获得^[9], 作者所在实验室合成了其编码基因 *Syxy11*, 并构建了重组质粒 pUCm-T-*Syxy11*。本研究利用分子动力学模拟手段预测了 *EvXyn11^{TS}* 耐热性与其 N 端二硫键的相关性, 并通过定点突变证实了该预测。鉴于某些 11 家族常温高比活性木聚糖酶的一级结构与耐热 *EvXyn11^{TS}* 的有较高的相似性^[10], 因此本研究结果将为这些酶的耐热性改造提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和基因: 大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 和 DH5 α 、毕赤酵母 (*P. pastoris*) GS115 和表达质粒 pPIC9K 均为本实验室保藏; 克隆质粒 pUCm-T simple 试剂盒购自上海 Sangon 公司; 经毕赤酵母偏爱密码子优化设计的耐热木聚糖酶编码基因 *Syxy11* (GenBank accession no. JX459567) 委托大连 TaKaRa 公司合成; 重组质粒 pUCm-T-*Syxy11* 由本实验室构建和保存。

1.1.2 主要试剂和培养基: 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和蛋白质 Marker 均购自大连 TaKaRa 公司; EZ-40 Spin Column DNA Gel Extraction Kit、酵母粉、蛋白胨、Geneticin G418、酵母基础氮源 (YNB) 和 D-生物素均购自上海 Sangon 公司; 桦木木聚糖、D-木糖和考马斯亮蓝 R-250 为 Sigma 公司产品; Carboxymethyl Cellulose CM-52 弱阳离子交换树脂为 Whatman 公司产品; 其它化学试剂均为国产或进口分析纯。LB、MD、YPD、YPD-G418、BMCY 和 BMMY 培养基的配制参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen

公司) 操作手册。

1.2 木聚糖酶一级结构的同源比对

以耐热木聚糖酶 *EvXyn11^{TS}* 为模板, 在 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中运用 BLAST 服务器搜寻与 *EvXyn11^{TS}* 一级结构相似度最高的若干 11 家族木聚糖酶序列; 再利用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/ClustalW>) 在线程序和 DNAMAN 6.0 软件对这些酶进行多序列同源比对, 寻找 *EvXyn11^{TS}* 与其它木聚糖酶在一级结构上尤其在 N 端区域内所存在的主要差异。

1.3 同源建模和分子动力学模拟

以耐热 *EvXyn11^{TS}* 晶体结构 (PDB: 2VUL) 作为空间结构建模模板, 运用 SWISS-MODEL 在线程序 (<http://swiss-model.expasy.org/on-line>) 对突变酶 *EvXyn11^M* 进行同源建模。

RMSD 值是指在高温下某一时刻的蛋白构象与初始构象之间所有原子的根均方偏差值, 是衡量蛋白构象是否稳定的重要指标。RMSD 值越小, 则蛋白分子中各个原子在高温下的运动幅度越小, 其稳定性越高^[11]。Gromacs 是一款分子动力学的模拟软件, 具有较为广泛的功能, 在分子动力学模拟过程中可用于分子能量最小化、构象分析等。本研究利用 GROMACS 4.0 程序包 (<http://www.gromacs.org/>)^[12] 在高温下分别对 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 结构进行分子动力学 (Molecular dynamics, MD) 模拟, 依据根均方偏差 (Root Mean Square Deviation, RMSD) 值预测 N 端二硫键 (Cys⁵ - Cys³²) 存在与否对木聚糖酶耐热性的影响。本研究采用的 MD 模拟体系设定为: 温度 500 K, 力场 GROMOS 96, 溶质分子被 1.5 nm 的 SPC/E 水分子层包裹。MD 模拟前, 分别对受约束和去约束的溶质分子体系进行两次能量优化, 即先采用最陡下降法优化 800 步, 再采用共轭梯度法优化 1200 步。MD 模拟分两步进行: 首先在 300 K 对受约束溶质分子进行模拟 100 ps; 再对去约束溶质分子模拟 10 ns, 此阶段温度从 300 K 逐步升高至 500 K。MD 模拟结束后, 利用 GROMACS 4.0 中的 g_rms 软件计算 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 的 RMSD 值。

1.4 重组质粒 pUCm-T-*Syxy11^M* 的构建

设计将木聚糖酶 *EvXyn11^{TS}* 氨基酸序列中的 Cys⁵ 突变为 Thr⁵, 以去除其 N 端二硫键。根据人工合成的 *Syxy11* 核苷酸序列 (GenBank accession no.

JX459567) 设计一对 PCR 突变引物, 分别为 CMT-F: 5'-GAATTCAACGCTCAAACCT ACTCTTACCTCTC CAC-3' (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点, 加框部分为突变密码子) 和 CMT-R: 5'-GCGGCCGCTTAACT AACAGTAATGTCAGA-3' (下划线部分为 *Not* I 酶切位点, 斜体部分为终止密码子), 由上海 Sangon 公司合成。以质粒 pUCm-T-*Syxy*n11 为模板、CMT-F 和 CMT-R 为引物, PCR 扩增突变酶编码基因 *Syxy*n11^M。该 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析、割胶回收、与 pUCm-T 连接, 获重组质粒 pUCm-T-*Syxy*n11^M, 转化 *E. coli* JM109, 蓝白斑筛选阳性转化子, 送上海 Sangon 公司测序, 测序结果与预期一致。

1.5 木聚糖酶基因的诱导表达

用 *Eco*R I 和 *Not* I 分别双酶切重组质粒 pUCm-T-*Syxy*n11 和 pUCm-T-*Syxy*n11^M, 割胶回收目的基因条带, 与经同样双酶切的 pPIC9K 连接, 获重组表达质粒 pPIC9K-*Syxy*n11 和 pPIC9K-*Syxy*n11^M, 转化 *E. coli* DH5 α 。测序正确的这两种重组质粒分别用 *Sal* I 线性化, 电转化 *P. pastoris* GS115, 具体操作参照基因脉冲仪 (Bio-Rad 公司) 说明书。重组毕赤酵母的鉴定、多拷贝筛选参照 Multi-Copy Pichia Expression Kit 操作手册, 其诱导表达及表达产物 SDS-PAGE 分析参见文献 [13-14]。

1.6 重组木聚糖酶的分离纯化

重组毕赤酵母经 1.0% (V/V) 甲醇诱导 96 h, 离心保留上清液, 用 45% - 75% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀, 离心收集沉淀, 溶于适量 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 5.5), 经透析、超滤浓缩 (超滤膜的截留分子量为 10 kDa, Millipore 公司), 上样 CM-Cellulose CM-52 弱阳离子交换柱 (1.6 cm \times 20 cm) 进行纯化。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[15], 以牛血清白蛋白为标准。

1.7 木聚糖酶活性的测定

木聚糖酶活性测定参见文献 [16], 并略作修改。2.4 mL 0.5% (W/V) 桦木木聚糖溶液 (pH 6.0) 中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 65 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 加入 2.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中显色 7 min, 分光光度计测定 OD₅₄₀。1 个酶活性单位 (U) 定义为每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量。

1.8 酶学性质的分析

1.8.1 温度对酶活性的影响: 在不同温度

(55 $^{\circ}$ C - 90 $^{\circ}$ C) 下, 按 1.8 方法测定 *EvXyn*11^{TS} 和 *EvXyn*11^M 活性。最适温度 T_{opt} 定义为最高酶活性 (以相对活性 100% 计) 所对应的温度。将酶液置于不同温度下保温 0 - 60 min, 按 1.8 方法测定残余酶活性, 未处理酶液 (0 min) 的酶活性以 100% 计。酶的半衰期 $t_{1/2}$ 定义为残余酶活性为 50% 时的保温时间。

1.8.2 pH 对酶活性的影响: 用不同 pH 值 (pH 4.0 - pH 8.0)、50 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制 0.5% (W/V) 木聚糖溶液, 按 1.8 方法测定 *EvXyn*11^{TS} 和 *EvXyn*11^M 活性。最适 pH 定义为最高酶活性所对应的 pH 值。将酶液在不同 pH 值 (柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液: pH 3.5 - pH 8.0; 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液: pH 8.5 - pH 10.0)、40 $^{\circ}$ C 保温 60 min, 按 1.8 方法测定残余酶活性。酶的 pH 稳定性定义为残余酶活性在 85% 以上的 pH 范围。

2 结果

2.1 木聚糖酶一级结构的分析

将耐热 *EvXyn*11^{TS} 序列分别与 11 家族其它木聚糖酶序列进行同源比对, 发现其与来源于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*, Aor)^[16]、黑曲霉 (*Aspergillus niger*, Ani)^[17]、宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*, Aus)^[18] 和里氏木霉 (*Trichoderma reesei*, Tre)^[6] 的木聚糖酶同源性较高, 分别为 64.4%、62.4%、62.4% 和 54.9%。在 *E. coli* 中表达的耐热木聚糖酶 *EvXyn*11^{TS} 的最适温度为 75 $^{\circ}$ C, 在 80 $^{\circ}$ C 处理 15 min 保留全部酶活性^[9]; 而其余木聚糖酶的最适温度为 50 $^{\circ}$ C - 55 $^{\circ}$ C, 在 45 $^{\circ}$ C - 50 $^{\circ}$ C 稳定。利用 ClustalW 在线程序对这些酶的一级结构进行多序列同源比对, 结果见图 1。由图 1 可见, 它们在 N 端区域内的同源性相对较低, 且仅有耐热 *EvXyn*11^{TS} 在其 N 端存在一个二硫键, 由第 5 位和第 32 位的半胱氨酸 (Cys⁵ - Cys³²) 形成, 已被其测定的晶体结构 (PDB: 2VUL) 所证实。

2.2 木聚糖酶的分子动力学模拟

应用 GROMACS 4.0 分别对 *EvXyn*11^{TS} 和 *EvXyn*11^M 进行 MD 模拟, 并利用 g_rms 软件计算其 RMSD 值。将得到的 RMSD 值导入 Excel 作图, 同时应用 Origin8 软件分析 RMSD 值的分布, 结果见图 2。从图 2-A 可知, 与 *EvXyn*11^M 相比, *EvXyn*11^{TS} 到

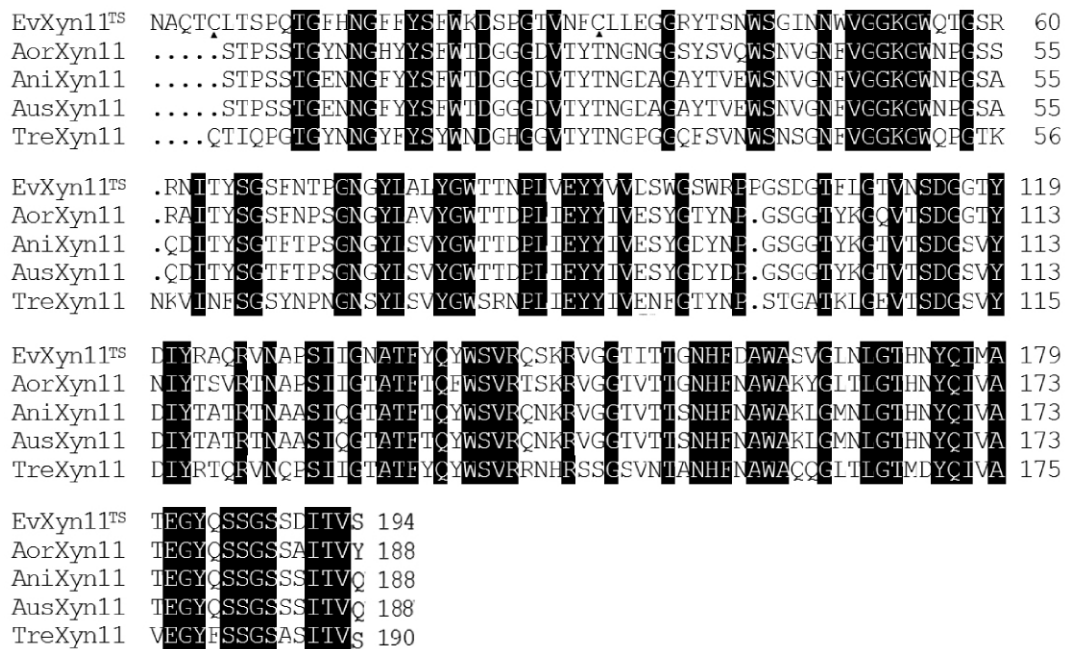


图 1. 5 种不同来源 11 家族木聚糖酶的多序列同源比对

Figure 1. Multiple homology alignment of primary structures among five family 11 xylanases from different organisms. The aligned xylanase sequences are as follows: *EvXyn11^{TS}*. Synthetic construct xylanase (ACB87631); *AorXyn11*. *A. oryzae* xylanase A (AFA51067); *AniXyn11*. *A. niger* xylanase A (XP_001388522); *AusXyn11*. *A. usamii* xylanase A (AEJ87263); *TreXyn11*. *T. reesei* xylanase II (CAA49293). Two triangles (▲) indicate the site of disulfide bridge.

达平衡阶段后其总体 RMSD 值较低且波动较小。由图 2-B 可知, 在 MD 模拟过程中, *EvXyn11^{TS}* 的 RMSD 值集中在 0.58 Å, 而 *EvXyn11^M* 的 RMSD 值则主要分布在 0.71 Å 左右, 较 *EvXyn11^{TS}* 的值提高了 22.4%, 这表明 *EvXyn11^{TS}* 分子去除 N 端二硫键后, 其刚性明显降低。由于酶蛋白刚性与热稳定性之间有一定的相关性^[19], 由此推测 N 端二硫键是耐热 *EvXyn11^{TS}* 高热稳定性的重要因素之一。

2.3 重组木聚糖酶的表达和纯化

挑选在 YPD-G418 (4.0 mg/mL) 平板上生长良好的、分别整合有酶基因 *Syxyn11* 和 *Syxyn11^M* 的毕赤酵母 GS115 单菌落转化子接种至 30 mL BMGY 培养基, 30℃、220 r/min 培养至 $OD_{600} = 2 - 4$, 离心, 将细胞重悬至 30 mL BMMY 培养基, 30℃ 诱导培养 96 h, 期间每隔 24 h 添加 1.0% (V/V) 甲醇。取培养上清液按 1.8 方法测定酶活性, 分别得到表达最高 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 活性 (36.8 U/mL 和 34.5 U/mL) 的重组毕赤酵母, 命名为 GSEvX4-11 和 GSEvX^M4-8。

将 GSEvX4-11 和 GSEvX^M4-8 菌株诱导培养上清液分别进行 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀、透析、超滤和

CM-Cellulose CM-52 阳离子交换柱纯化, 并对纯化样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 3。纯化的目的蛋白 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 均在 31 kDa 处 (表观分子量) 显示单一条带, 且大于理论分子量 21.24 kDa。经 NetNGlyc 在线程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测, 在 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 的一级结构中均含有 3 个潜在的 N-糖基化位点, 使得这两种酶在毕赤酵母表达过程中分别发生糖基化作用, 提高了它们的表观分子量。按 1.8 方法测得纯化的 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 比活性分别为 363.2 U/mg 和 344.4 U/mg。

2.4 重组木聚糖酶的酶学性质

分别测定了 *EvXyn11^{TS}* 和 *EvXyn11^M* 的最适温度 T_{opt} , 结果见如图 4。由图 4 可知, *EvXyn11^M* 的 T_{opt} 为 70℃, 较 *EvXyn11^{TS}* 的 T_{opt} (85℃) 下降了 15℃。由此得出结论: *EvXyn11^{TS}* N 端二硫键的去除显著降低了其最适温度 T_{opt} 。

两种木聚糖酶热稳定性的测定结果见图 5。由图 5-A 可知, *EvXyn11^{TS}* 具有很好的热稳定性, 80℃ 处理 60 min 保留全部酶活性; 在 90℃ 的半衰期 $t_{1/2}^{90}$ 长达 32 min, 保温 60 min 保留 25% 酶活性。由图 5-B

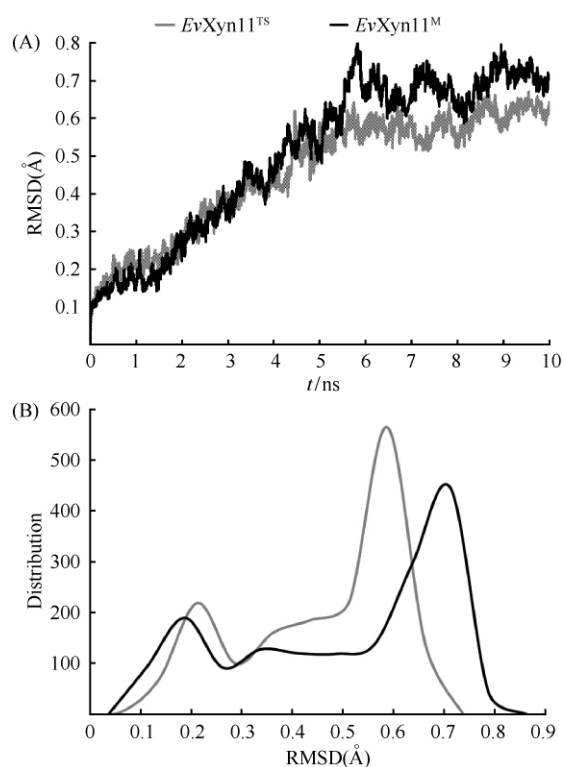


图2. *EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*分子动力学轨迹及其RMSD值分析

Figure 2. MD trajectories of *EvXyn11^{TS}* and *EvXyn11^M* and analysis of their RMSD values.

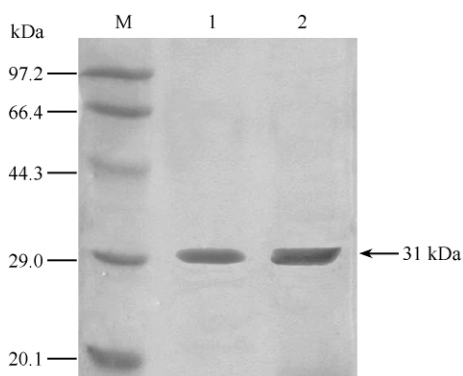


图3. 纯化的*EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*的SDS-PAGE分析
Figure 3. SDS-PAGE analysis of the purified *EvXyn11^{TS}* and *EvXyn11^M* expressed in *P. pastoris* GS115, respectively. M, Protein marker; Lane 1, The purified *EvXyn11^{TS}*; Lane 2, The purified *EvXyn11^M*.

可见,将*EvXyn11^M*在50℃、60℃处理60 min,其残余酶活性分别为98%和50%;在70℃的半衰期 $t_{1/2}^{70}$ 仅为8.0 min,保温40 min酶活性几乎完全丧失。*EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*热稳定性的测定和分析结果表明,N端二硫键的存在对*EvXyn11^{TS}*的高热稳定性起到了关键的作用。

*EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*的最适pH均为6.5,当pH < 5.5或pH > 7.5时,酶活性下降较快;该两种酶在pH 4.0 - 9.5范围内稳定。分析结果表明,*EvXyn11^{TS}*突变前后的pH特性保持一致。

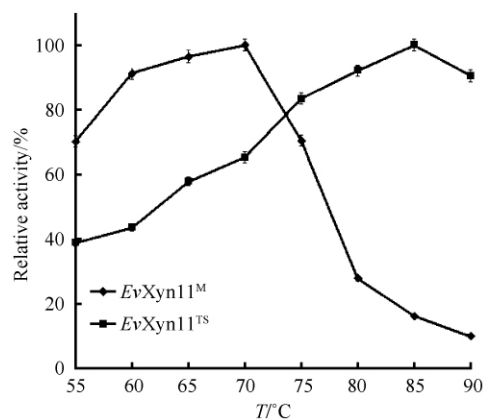


图4. 木聚糖酶*EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*的最适温度
Figure 4. The temperature optima of xylanases *EvXyn11^{TS}* and *EvXyn11^M*.

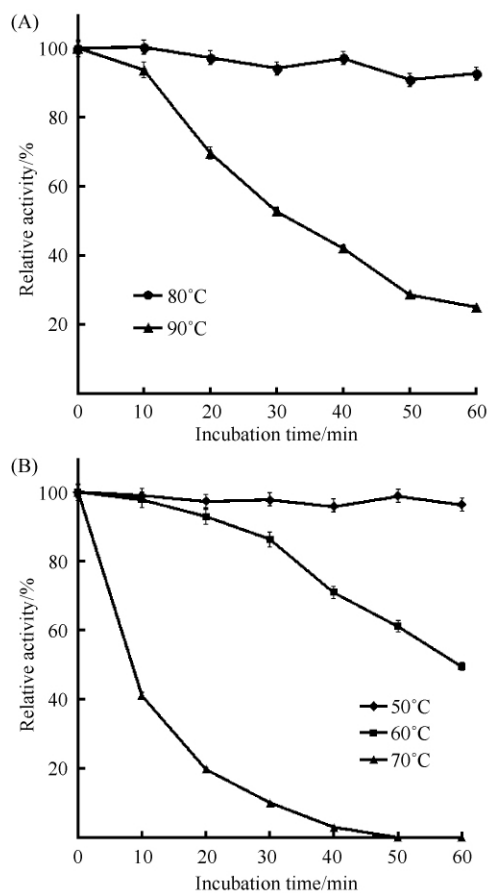


图5. 木聚糖酶*EvXyn11^{TS}*和*EvXyn11^M*的热稳定性
Figure 5. The thermostabilities of xylanases *EvXyn11^{TS}* (A) and *EvXyn11^M* (B).

3 讨论

为探究耐热木聚糖酶 *EvXyn11^{TS}* 的热稳定性机理, 本研究通过对不同来源和耐热性的、一级结构相似度高的 5 种 11 家族木聚糖酶的多序列同源比对, 发现它们在 N 端区域内的同源性较低, 且仅有耐热 *EvXyn11^{TS}* 在其 N 端存在一个二硫键 (Cys⁵ - Cys³²), 其后运用 MD 模拟预测该 N 端二硫键存在与否对木聚糖酶热稳定性的影响。蛋白质热稳定的 MD 模拟结果通常以 RMSD 值评价。在 500 K 高温下的 MD 模拟结果显示, *EvXyn11^M* 的 RMSD 值较 *EvXyn11* 的值提高了 22.4%, 表明去除二硫键后, 其刚性明显降低。为验证 MD 模拟的计算结果, 以人工合成的、耐热木聚糖酶 *EvXyn11^{TS}* 的编码基因 *Syxy11* 为母本, 采用 PCR 技术将其编码 Cys⁵ 的密码子 TGT 突变为编码 Thr⁵ 的 ACT, 构建去除了 N 端二硫键的突变酶 *EvXyn11^M* 的编码基因 *Syxy11^M*, 随后分别将 *Syxy11* 和 *Syxy11^M* 在 *P. pastoris* GS115 中进行表达, 并分析表达产物的温度特性。结果证实, *EvXyn11^{TS}* N 端二硫键的缺失显著降低了其最适温度和热稳定性。Matsumura 等^[20] 认为二硫键的作用主要是通过降低蛋白去折叠状态的熵值来提高蛋白结构的稳定性; Kumar 等人^[21] 的研究结果表明在 *Paecilomyces varioti* 木聚糖酶序列中构建二硫键 (Cys¹¹⁰ - Cys¹⁵⁴), 使 Cys¹¹⁰ 和 Cys¹⁵⁴ 的 α 位碳原子之间的距离缩短了 0.5 Å。

目前, 许多工业生产过程中需要耐热性高的酶。采用生物信息学预测与实验验证相结合的方案分析和改造酶的耐热性, 可减少实验的工作量, 并已获得了许多成功的案例^[22]。如 Reetz 等人^[23] 为提高 *B. subtilis* 脂肪酶的热稳定性, 对其晶体结构进行 B-factor 分析, 将 B-factor 值最高的 10 个残基作为靶标进行饱和突变, 最后得到一个理想的多位点突变酶, 其变性温度 T_m 比野生型提高了 50°C 左右。本研究采用将酶蛋白的一级结构同源比对、同源建模及分子动力学模拟三种生物信息学方法相结合的方案, 并结合定点突变实验手段, 分析了 *EvXyn11^{TS}* 的耐热性机理。该研究结果也为其它与 *EvXyn11^{TS}* 一级结构相似的、11 家族常温高比活性木聚糖酶的耐热性

改造奠定了基础。

参考文献

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29 (1): 3-23.
- [2] Pastor FIJ, Gallardo Ó, Sanz-Aparicio J, Díaz P. Xylanases: molecular properties and applications. Polaina J, MacCabe AP. *Industrial Enzymes*. Heidelberg: Springer-Verlag Press, 2007, 65-82.
- [3] Verma D, Satyanarayana T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 360-367.
- [4] Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67 (5): 577-591.
- [5] Li CX, Xu JH. The digging and application of industrial enzyme resources in post genome era. *Biotechnology & Business*, 2011, 1: 40-49. (in Chinese)
李春秀, 许建和. 后基因组时代工业酶资源的挖掘和应用. *生物产业技术*, 2011, 1: 40-49.
- [6] Turunen O, Etuaho K, Fenel F, Vehmaanperä J, Wu X, Rouvinen J, Leisola M. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1, 4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism. *Journal of Biotechnology*, 2001, 88 (1): 37-46.
- [7] Jeong MY, Kim S, Yun CW, Choi YJ, Cho SG. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127 (2): 300-309.
- [8] Paës G, O'Donohue MJ. Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Journal of Biotechnology*, 2006, 125 (3): 338-350.
- [9] Dumon C, Varvak A, Wall MA, Flint JE, Lewis RJ, Lakey JH, Morland C, Luginbühl P, Healey S, Todaro T, DeSantis G, Sun M, Parra-Gessert L, Tan X, Weiner DP, Gilbert HJ. Engineering hyperthermostability into a GH11 xylanase is mediated by

- subtle changes to protein structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (33): 22557-22564.
- [10] Zhou CY, Wang YT, Wu MC, Wang W, Li DF. Heterologous Expression of Xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. *Food Technology and Biotechnology*, 2009, 47 (1): 90-95.
- [11] Badieyan S, Bevan DR, Zhang C. Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109 (1): 31-44.
- [12] Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 1995, 91 (2): 43-56.
- [13] Li JF, Tang CD, Shi HL, Wu MC. Cloning and optimized expression of a neutral endoglucanase gene (*ncel5A*) from *Volvariella volvacea* WX32 in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111 (5): 537-540.
- [14] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685.
- [15] Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [16] Shi HL, Wang JQ, Wu MC, Gao SJ. Optimized Expression and Enzymatic Properties of Xylanase Produced by Recombinant *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biologicals*, 2012, 25 (10): 1362-1365. (in Chinese)
史红玲, 汪俊卿, 邬敏辰, 高树娟. 毕赤酵母产重组木聚糖酶发酵条件的优化及其酶学性质. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25 (10): 1362-1365.
- [17] Liu MQ, Weng XY, Sun JY. Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein Expression and Purification*, 2006, 48 (2): 292-299.
- [18] Wang SL, Zhu J, Wu MC. Study on purification and properties of xylanase. *Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition)*, 2006, 34 (2): 71-76. (in Chinese).
王时良, 朱劼, 邬敏辰. 木聚糖酶的分离纯化及性质研究. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)* 2006, 34 (2): 71-76.
- [19] The relationship between enzyme conformation rigidity and thermostability in hyperthermia bacteria. *Chemistry of Life*, 2003, 23 (3): 187-189. (in Chinese)
祝伟, 彭谦. 超高温菌酶构象的刚性和热稳定性的相互关系. *生命的化学*, 2003, 23 (3): 187-189.
- [20] Matsumura M, Signor G, Matthews BW. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, 1989, 342 (6247): 291-293.
- [21] Kumar PR, Eswaramoorthy S, Vithayathil PJ, Viswamitra MA. The tertiary structure at 1.59 Å resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces varioti* Bainier. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 295 (3): 581-593.
- [22] Polyansky AA, Kosinsky YA, Efremov RG. Correlation of local changes in the temperature-dependent conformational flexibility of thioredoxins with their thermostability. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, 30 (5): 421-430.
- [23] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2007, 2 (4): 891-903.

Correlation between thermostability of the xylanase *EvXyn11^{TS}* and its N-terminal disulfide bridge

Rou Min¹, Jianfang Li², Shujuan Gao¹, Huimin Zhang², Jing Wu³, Minchen Wu^{3*}

¹School of Pharmaceutical Science, ²School of Food Science and Technology, ³Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Objective] To reveal the correlation between thermostability of xylanase *EvXyn11^{TS}* and its N-terminal disulfide bridge, an *EvXyn11^{TS}*-encoding gene (*Syxyn11*) was synthesized and subjected to site-directed mutagenesis. [Methods] Multiple homology alignment of protein primary structures between the *EvXyn11^{TS}* and several GH family 11 xylanases displayed that, in their N-termini, only *EvXyn11^{TS}* contained a disulfide bridge (Cys⁵-Cys³²), whose effect on the xylanase thermostability was predicted by molecular dynamics simulation. We constructed a gene *Syxyn11^M*, encoding the mutated xylanase (*EvXyn11^M*) without N-terminal disulfide bridge. Then, *Syxyn11* and *Syxyn11^M* were expressed in *Pichia pastoris* GS115, and temperature and pH properties of the expressed enzymes were analyzed. [Results] The analytical results displayed that the temperature optimum of *EvXyn11^M* was 70°C, which was 15°C lower than that of *EvXyn11^{TS}*. The half-life ($t_{1/2}^{90}$) of *EvXyn11^{TS}* at 90°C was 32 min, while the $t_{1/2}^{70}$ of *EvXyn11^M* at 70°C was only 8.0 min. [Conclusion] The important role of the N-terminal disulfide bridge on the thermostability of *EvXyn11^{TS}* was first predicted by molecular dynamics simulation, and confirmed by site-directed mutagenesis. This work provided a novel strategy to improve thermostabilities of the mesophilic family 11 xylanases with high specific activities.

Keywords: xylanase, thermostability, N-terminal disulfide bridge, molecular dynamics simulation, site-directed mutagenesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31101229)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85329042; E-mail: biowmc@126.com

Received: 20 November 2012/Revised: 17 January 2013

《微生物学报》EndNote Style

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写, 这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿, 我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献, 自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件, 这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后, 复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后, 投稿前, 请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能, 将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式, 以便于编辑修改。【注: 本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的, 因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊, 需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名: 2009 年开始西文刊名需要全拼, 为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊: 以尊重原始文种为主, 2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文献, 并在英文文献的后面标出“文种”。

(3) 译著: 需要给出外国作者的原姓名。

致谢: “《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的, 杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此, 谨向他们表示衷心地感谢!