



毕赤酵母表达的嗜热蓝状菌 β -葡萄糖苷酶 *N*-糖基化修饰的作用与功能

李新新, 柏映国, 华晨, 马锐, 石鹏君*, 罗会颖, 姚斌

中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

摘要:【目的】研究 *N*-糖基化对来源于嗜热蓝状菌 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, Bgl3A)的酶学性质影响。【方法】采用定点突变技术构建了 3 个去 *N*-糖基化的突变体 T44A、S228A、S299A, 并分别在毕赤酵母 GS115 中表达纯化。【结果】与野生型 Bgl3A 相比, 突变体 S228A 分泌蛋白产量极低, 仅能微量检测到 *p*NPG 活性; 突变体 T44A 和 S299A 的最适 pH 和最适温度没有改变, 分别为 4.0 和 75 °C, 但二者的 T_m 值和 70 °C 下的热稳定性都明显优于野生型。以 *p*NPG 为底物时, 突变体 S299A 和 T44A 的催化效率分别降低了 14.5% 和 70.0%; 以纤维二糖为底物时, T44A 的催化效率基本不变, 而 S299A 的催化效率提高了 1.1 倍。【结论】Bgl3A 不同位点的 *N*-糖基化修饰对酶的分泌和酶学性质的影响具有明显差异。其中, N226 位的 *N*-糖基化在维持酶的表达和功能方面至关重要, 而去除 N297 位点的 *N*-糖基化可以提高酶的热稳定性及对纤维二糖的催化效率。

关键词: 嗜热蓝状菌, β -葡萄糖苷酶, *N*-糖基化, 热稳定性, 催化效率

自然界中纤维素降解需要通过一系列的纤维素降解酶系协同作用实现, 主要包括内切葡聚糖酶 (endo-glucanase, EG)、外切纤维素酶 (cellobiohydrolase, CBH) 和 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, BG)^[1-2]。其中, β -葡萄糖苷酶在纤维素降解酶系中扮演着重要角色。 β -葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21) 是能特异性地催化水解低聚糖(通常 2–6 个单糖残基)、烷基和芳香族羟基末端非还原

性的 β -D-葡萄糖苷键, 从而释放葡萄糖单糖分子和相应配基的糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)类的总称, 又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶^[3]。在纤维素降解过程中, β -葡萄糖苷酶能够高效地作用于内切葡聚糖酶和外切纤维素酶降解纤维素的产物(纤维二糖或纤维寡糖), 而进一步将纤维二糖降解为可利用的葡萄糖。由于可有效地消除纤维二糖对外切纤维素酶的产物抑制作用, 从而

基金项目: 国家自然科学基金(31372345); 国家高技术研究发展计划(“863 计划”)(2013AA102803)

*通信作者。Tel: +86-10-82106053; Fax: +86-10-82106054; E-mail: shipengjun@caas.cn

收稿日期: 2018-01-25; 修回日期: 2018-03-21; 网络出版日期: 2018-04-03

提高整体纤维素酶的催化效率, β -葡萄糖苷酶也被称为纤维素降解过程的关键限速酶^[4]。因此, 研究 β -葡萄糖苷酶结构特征, 寻找关键位点并理性改造, 对提高 β -葡萄糖苷酶降解纤维素效率至关重要。

对于 β -葡萄糖苷酶的研究主要集中于微生物来源的 β -葡萄糖苷酶, 已有大量微生物来源的 β -葡萄糖苷酶基因在原核或真核宿主中成功重组表达并进行了生化性质的测定。表达 β -葡萄糖苷酶基因的原核宿主一般为大肠杆菌, 但是由于其表达量低、纯化困难等问题, 一般常选择真核表达宿主。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近年来被公认最有效的外源蛋白真核表达系统之一, 其具有诸多优点, 被广泛用于生产重组蛋白, 但是真核生物毕赤酵母表达蛋白通常存在糖基化修饰, N -糖基化是真核生物所特有的糖基化修饰^[5-6]。同时 N 位糖基化也是蛋白糖基化类型最多的一种, 它主要发生在内质网和高尔基体内, 由糖基转移酶催化, 是在内分泌蛋白和膜结合蛋白的天冬氨酸残基上结合寡糖的过程。 N -乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)还原端与蛋白质肽链中 Asn-X-Ser/Thr(其中 X 为除脯氨酸之外的任何氨基酸)结构的 Asn 的酰胺氮以 β -1,4 糖苷键连接^[7], 少数情况下 Asn-Xaa-Cys 序列也作为糖基化位点。

N -糖基化修饰既可提高也可降低糖蛋白的稳定性, 这取决于糖基化修饰发生的位置, 当糖基化修饰发生在折叠有序的区域时, 会减少其稳定性, 而当糖基化修饰发生在混乱无序的位置时则会增加蛋白质的稳定性^[8]。同时, 也有很多报道表明 N -糖基化会影响酶的活性和分泌, 例如维生素 K 依赖型羧化酶^[9]、隐球菌磷脂酶 B^[10]等。本文利用 NetNGlyc 1.0 Server 软件在线分析来源于嗜热

真菌蓝状菌的 β -葡萄糖苷酶 Bgl3A 基因中易发生 N -糖基化修饰的潜在位点, 利用定点突变技术, 将 β -葡萄糖苷酶潜在 N -糖基化位点上最后一位氨基酸苏氨酸或者丝氨酸(T/S)用同为中性氨基酸的丙氨酸(A)取代。比较突变体表达的重组酶与野生酶的表达量、酶学性质以及催化效率方面的差异, 进而探讨 N -糖基化对嗜热蓝状菌来源 β -葡萄糖苷酶的影响, 为后续对 GH 3 家族的 β -葡萄糖苷酶通过糖基化位点的改造以提高纤维素酶活性和热稳定性的定向进化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体: 嗜热真菌蓝状菌(*Talaromyces leycettanus* JCM12802)购自日本微生物保存中心(Japan Collection of Microorganisms, JCM, <http://jcm.brc.riken.jp/en/>)。毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans1-T1 和质粒 pEASY-T3 购自北京全式金生物技术有限公司。实验所用重组载体 pPIC9r-bgl3A 为本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂和仪器: 底物对硝基苯 β -D-葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside, *p*NPG)和纤维二糖(cellobiose)购买自 Sigma 公司; FastPfu DNA 聚合酶、HiFi 高保真 Taq 酶购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Dra* I 购买自 TaKaRa 公司; Endo-H 酶购自 NEB 公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 质粒小提中量试剂盒购自 TianGen 公司; 蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 蛋白 Marker 购买于北京 GeneStar 生物公司; 酵母浸提物、蛋白胨、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)等其它化学试剂为进口或

国产分析纯。引物由北京梓熙生物技术有限公司合成。

PCR、电转仪和凝胶成像系统(美国 Bio-Rad), 高速冷冻离心机(日本 HIMAC), 酶标仪(美国 Thermo), 紫外分光光度计(日本 JASO), HiTrap Q XL 阴离子柱(美国 GE), 其他仪器及试剂均为国产。

1.2 主要培养基

LB 培养基: 蛋白胨 1.0%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1.0%; YPD 培养基: 酵母提取物 1.0%, 蛋白胨 2.0%, 葡萄糖 2.0%; BMGY 培养基: 1.00% 酵母提取物, 2.00% 蛋白胨, 1.34% YNB, 0.00004% Biotin, 1.00% 甘油(*V/V*), pH 自然; BMMY 培养基: 除以 0.5% 甲醇代替甘油, 其余成分均与 BMGY 相同, pH 自然; MD 培养基(固体): 葡萄糖 20.0 g/L, 琼脂糖 20.0 g/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 4 mg/L。

1.3 在线软件分析 β -葡萄糖苷酶 Bgl3A 中潜在 *N*-糖基化位点

利用在线 *N*-糖基化预测网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析嗜热真菌蓝状菌来源的 β -葡萄糖苷酶 Bgl3A 中潜在的天然 *N*-糖基化修饰的位点, 根据预测结果对 *N*-糖基化位点构建突变体。

1.3.1 突变载体的构建: 利用定点突变技术将潜在的 *N*-糖基化位点上(Asn-X-Ser/Thr)最后一个氨基酸(Ser/Thr)突变为 Ala, 突变后该位点将不能再发生 *N*-糖基化修饰。以实验室构建并保存的重组质粒 pPIC9r-*bgl3A* 为模板, 利用 FastPfu DNA 聚合酶通过上游引物和下游引物对质粒进行扩增。

PCR 反应体系(50 μ L)如下: FastPfu buffer 10 μ L, dNTPs 5 μ L, 硫酸镁 5 μ L, pPIC9r-*Bgl3A* 质粒模板 1 μ L, 引物 F 1 μ L, 引物 R 1 μ L, FastPfu

酶 1 μ L, ddH₂O 28 μ L。

PCR 扩增程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 5 min, 34 个循环; 72 °C 10 min。本实验所用引物如下, 该引物均利用 Vector NTI 软件设计见表 1, 并由北京梓熙生物技术有限公司合成。

PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 切下 PCR 产物中的目的条带并纯化, 溶 25 μ L ddH₂O, 用 DMT 酶在 37 °C 处理 2 h 后转化 DMT 感受态细胞, 在含有 100 μ g/mL 的氨苄青霉素的固体 LB 培养基平板上筛选获得阳性转化子。挑单克隆至 600 μ L 含有 100 μ g/mL 的氨苄青霉素的液体 LB 培养基上过夜培养, 次日提取质粒并进行测序, 将测序结果与 pPIC9r-*bgl3A* 比对以确定是否突变成功。

1.3.2 毕赤酵母重组菌株的构建: 将测序正确的突变体质粒进行单酶切(*Dra* I)线性化, 切胶回收后电击转化到 GS115 感受态细胞中, 涂布至 MD 平板, 30 °C 培养 3 d。然后, 挑取板上的单克隆于 BMGY 培养基中培养 2 d, 后更换至 BMMY 诱导培养基培养 2 d, 4500 r/min 离心收集上清进行酶活的筛选。

1.3.3 重组 β -葡萄糖苷酶的诱导表达和纯化: 将筛选出的酶活高的转化子在 YPD 进行培养 16 h,

表 1. 引物序列

Table 1. Sequences of primers used in this study	
Names	Sequences (5'→3')
T44A-F	CTGAACAAGCTCAACCAGGCGGAGAAGGT
T44A-R	GGTGACGATACCAACCTTCTCGGCCTGGTTG
S228A-F	GCCTGGTCCTGTGAGAATGATGCTCTTCTCAAC
S228A-R	CTCAGTCTTCAACAGACCGTTGAGAAGAGCATCATT
S299A-F	CAGCACACCACGGTCAACAGCGCCAACTCG
S299A-R	AGGCATGGTCATATCGAGACCCGAGTTGGCGCTGTT

接入到装有 400 mL BMGY 培养基的 1 L 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 48 h。将菌液进行离心(6000 r/min, 10 min), 上清液去掉, 然后加入 200 mL BMGY 培养基重悬菌体, 30 °C、200 r/min 摇床培养, 每 12 h 补加 2 mL 甲醇溶液, 摇床培养 48 h。将培养基上清液于 12000 r/min 离心 10 min, 弃菌体得到粗酶液后用 30 kDa 的膜包进行超滤浓缩。浓缩后的酶液用磷酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.5)过夜透析进行脱盐处理。将处理后的酶液加入已平衡的 HiTrap QXL 阴离子柱, 用 0–1 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱, 并用 96 孔板收集。对收集管中的 β -葡萄糖苷酶活性进行测定, 将有酶活的酶液收集, 取 7 μ L 进行 *N*-糖基化的脱糖基处理(Endo-H), 并进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.4 重组 β -葡萄糖苷酶活性的测定方法: *p*NPG 底物酶活力测定反应步骤如下: 250 μ L 4 mmol/L *p*NPG 底物与 250 μ L 适当稀释的酶液, 于 75 °C 下反应 10 min, 加入 1.5 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应, 使用分光光度计测定 OD_{405} 值。

纤维二糖底物酶活力测定反应步骤如下: 70 μ L 4 mmol/L 纤维二糖底物与 70 μ L 适当稀释的酶液, 于 75 °C 下反应 10 min, 煮沸 5 min 终止反应, 然后加入 2.1 mL GOD 显色液显色 10 min, 使用分光光度计测定 OD_{520} 值。

酶活单位 U 的定义: 在给定反应条件下, 每分钟分解底物 *p*NPG 生成 1 μ mol/L 对硝基苯酚或分解纤维二糖底物生成 1 μ mol/L 葡萄糖所需的酶量为 1 个 β -葡萄糖苷酶活性单位(U)。

1.3.5 重组 β -葡萄糖苷酶最适 pH 和温度的测定: 将 *p*NPG 底物加入 100 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 在不同 pH 条件(pH 3.0–5.0, 间隔 0.5 个 pH)下加入适当稀释倍数的酶液, 于 75 °C 反应 10 min, 设置 3 个平行及空白对照, 根据测定结果

绘制 β -葡萄糖苷酶野生型以及各突变体(T44A/S228A/S299A)的最适 pH 曲线。

在 pH 4.5 的条件下将 β -葡萄糖苷酶在不同温度(60–80 °C, 间隔 5 °C)下反应 10 min 测定酶活, 设置 3 个平行和空白对照, 根据测定结果绘制 β -葡萄糖苷酶野生型以及各突变体(T44A/S228A/S299A)的最适温度曲线。

1.3.6 重组 β -葡萄糖苷酶温度稳定性的测定: 热力学稳定性: 准备突变体与野生型 β -葡萄糖苷酶蛋白, 浓度 0.15–0.20 mg/mL, 体积 500 μ L, 利用差量量热仪扫描各 β -葡萄糖苷酶的 T_m 值。

动力学稳定性: 将稀释一定倍数的 β -葡萄糖苷酶在 60 °C 和 70 °C 下分别保温处理 10、20、30、40、50、60 min 后, 以 *p*NPG 为底物, 在 75 °C、pH 4.5 条件下测定其残余酶活力, 设置 3 个平行和空白对照, 以未处理的酶液作为对照(100%), 根据测定结果, 绘制各 β -葡萄糖苷酶的热稳定性曲线。

1.3.7 重组 β -葡萄糖苷酶不同底物动力学常数的测定: 葡萄糖苷酶动力学常数的反应时间为 5 min, 分别以不同浓度的 *p*NPG 和纤维二糖为底物, 在各种酶最适 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液体系中, 最适温度下测定酶活性, 测定结果根据双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)计算酶促反应动力学常数 K_m 和 V_{max} , 进一步计算酶催化效率值 k_{cat}/K_m 。

1.3.8 重组 β -葡萄糖苷酶同源建模与纤维二糖底物对接: 以一致性为 73% 的来源于里氏木霉 *Hypocrea jecorina* 第 3 家族 β -葡萄糖苷酶 Cel3A (PDB: 3ZYZ)为模板, 通过 Discovery Studio 2017 Client 软件中的 Macromolecules 模块对野生型酶蛋白以及各突变体进行单模板同源建模, 后利用 Minimization 工具和 Verify 3D 优化程序对模建结

果进行能量最小化和结构优化。利用 Small Molecules 模块对纤维二糖底物优化, 利用 Receptor-Ligand Interactions 模块中 Dock 对 β -葡萄糖苷酶和纤维二糖进行分子对接。

2 结果和分析

2.1 野生型葡萄糖苷酶 *N*-糖基化位点的预测

利用在线 *N*-糖基化预测网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 分析嗜热真菌蓝状菌来源的 β -葡萄糖苷酶 Bgl3A 蛋白序列, 预测易发生天然 *N*-糖基化修饰的位点。由表 2 可知, Bgl3A 中 5 个具有 *N*-糖基化特征序列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) 的位点, 其中阈值超过 0.5 的有 3 个。因此, Bgl3A 具有 3 个潜在的糖基化位点, 分别为 N42、N226 和 N297。并利用定点突变技术去除这些位点的糖基化, 将 *N*-糖基化序列的 (Asn-X-Ser/Thr) 最后一个氨基酸 (Ser/Thr) 突变为对蛋白构象影响最小的 Ala。

2.2 三种重组突变体与野生型蛋白的表达与纯化

将构建成功的突变体在毕赤酵母中表达。通过酶活初筛, 成功挑取高酶活的转化子并进行摇瓶诱导。粗酶液经过浓缩、脱盐、阴离子交换柱等步骤进行蛋白纯化后, 通过 SDS-PAGE 验证其蛋白分子量大小及其纯度 (图 1-A), 并用内切 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 H (Endo- β -N-

acetylglucosaminidase H, Endo H) 处理, 切割与糖肽和酶蛋白的天冬氨酸残基连接的寡聚糖。

如图 1-A 所示, 纯化后的各 β -葡萄糖苷酶突变体在约 75 kDa 处出现蛋白条带, 并且 β -葡萄糖苷酶由于潜在 *N*-糖基化位点不同, 使突变体蛋白条带存在差异。其中 T44A 和 S299A 突变体的蛋白条带与野生型 Bgl3A 相似, 而 S228A 蛋白条带在蛋白浓度方面发生明显变化, 浓度远小于 T44A、S299A 和野生型 Bgl3A。对 T44A、S299A 和 Bgl3A 的酶液进行不同程度的稀释, 同时对 S228A 酶液进行浓缩。然后用 Endo H 对各突变体进行处理, 如图 1-B 所示, 各突变体大小基本一致, 处理后的蛋白的分子量均在 70 kDa 左右。

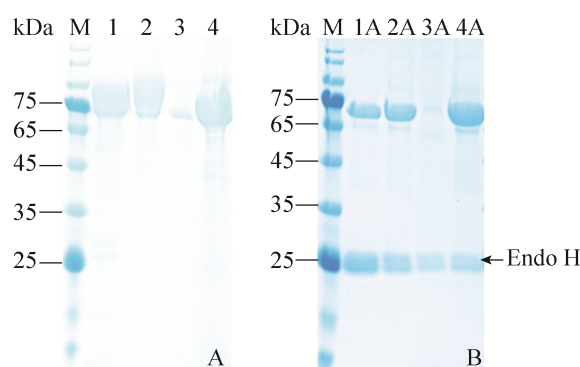


图 1. β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis of purified recombinant β -glucosidase. A: lane 1: Bgl3A wild-type; lane 2: T44A; lane 3: S228A; lane 4: S299A. B: 1A/2A/3A/4A treated by Endo H, respectively.

2.3 三种重组突变体与野生型 Bgl3A 的比较

2.3.1 最适 pH、最适温度比较: β -葡萄糖苷酶的最适作用 pH 为 4.0 (图 2-A), 在 pH 4.0–4.5 具有较高酶活。其中 T44A、S299A 与野生型 Bgl3A 一致, 最适 pH 没有发生变化, 并且在 pH 4.5 能够保持 50% 左右的相对酶活力。S228A 最适 pH 发生轻微变化, 为 4.5, 在 pH 4.0 能够保持 70% 左右的相对

表 2. Bgl3A 序列 *N*-糖基化位点预测结果

Table 2. Predicted *N*-glycosylation sites of Bgl3A

Position	Potential	Jury agreement	<i>N</i> -Glyc result
42 NQTE	0.6	(8/9)	+
226 NGSW	0.6	(8/9)	+
297 NGSV	0.5	(6/9)	+
434 NITT	0.4	(5/9)	-
591 NITP	0.1	(9/9)	-

酶活力。

β -葡萄糖苷酶为中高温酶,最适温度为 75 °C。其中 T44A、S299A 与野生型 Bgl3A 一致,最适温度均为 75 °C, S228A 最适温度为 70 °C (图 2-B)。在 60 °C 和 75 °C 也均有 50%左右的相对酶活。

2.3.2 稳定性比较(热力学稳定性和动力学稳定性): 表 3 结果表明 2 个突变体 T44A、S299A 的

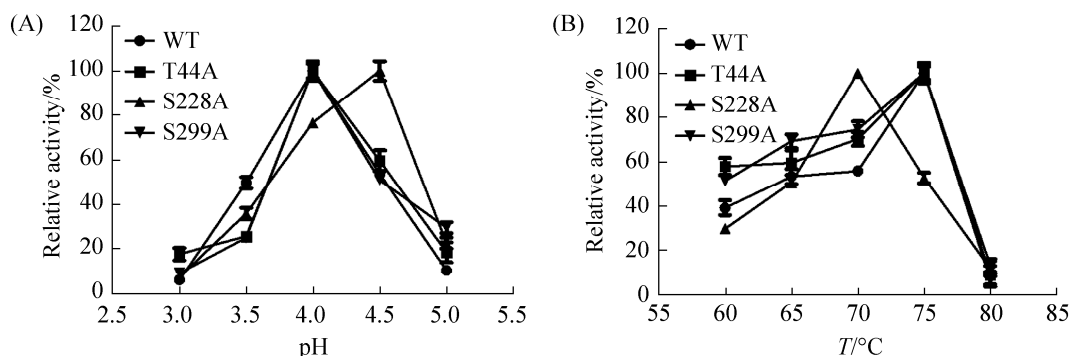


图 2. 重组葡萄糖苷酶 Bgl3A 野生型以及突变体酶学性质

Figure 2. Enzymatic properties of wild-type and mutants of recombinant β -glucosidase Bgl3A. A: Effect of pH on enzyme activity; B: Effect of temperature on enzyme activity. Each value in the panel represents the mean \pm SD ($n=3$).

表 3. Bgl3A 野生型与突变体差量热仪扫描的热力学稳定性参数

Table 3. Thermodynamic stability parameters of Bgl3A wild-type and mutants were scanned by DSC

Enzyme	Wild-type	T44A	S299A
T_m	60.1	60.4	60.8

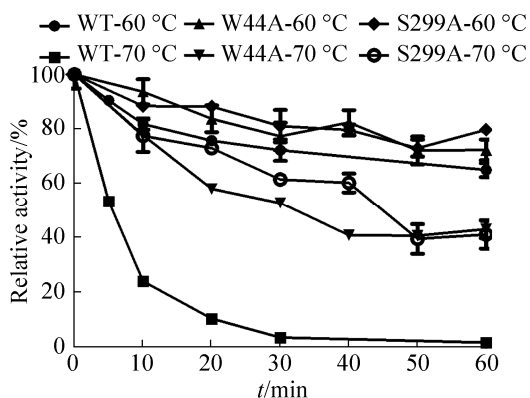


图 3. 重组 Bgl3A 野生型以及突变体热动力学稳定性
Figure 3. Thermo dynamic stability of recombinant Bgl3A wild-type and mutants. Each value in the panel represents the mean \pm SD ($n=3$).

热力学稳定性略高于野生型(S228A 由于蛋白分泌过低,未测定),其中 T44A、S299A 的 T_m 分别较野生型 Bgl3A 提高 0.3 °C、0.7 °C。

突变体的动力学稳定性优于野生型(图 3),突变体 T44A 和 S299A 在 70 °C 处理 60 min 后,仍能残余50%左右的相对酶活力,而野生型 Bgl3A 在 70 °C 处理 20 min 后,残余酶活力仅剩不足 20%。

2.3.3 动力学参数比较: 在最适反应条件下测定毕赤酵母表达的野生型 Bgl3A 和 3 个突变体的酶促反应动力学参数。如表 4 所示,整体来讲, N-糖基化修饰位点的突变对酶的催化能力有明显影响。

对 p NPG 底物,突变体 T44A、S228A 以及 S299A 的催化能力均降低,分别为 4611 mmol/(s·L)、67 mmol/(s·L)和 13120 mmol/(s·L)。其中突变体 T44A 的 K_m 为 2.73 mmol/L,提高至野生型 Bgl3A 的 2.6 倍,说明其亲和能力下降。另外, V_{max} 和 k_{cat} 数值相比 Bgl3A 也有所下降,导致其催化能力 (k_{cat}/K_m)仅为野生型 Bgl3A 的 30%; S299A 亲和力 K_m 为 0.17 mmol/L,较野生型 Bgl3A 提高 5 倍。但其 V_{max} 和 k_{cat} 数值明显下降,因此,其催化效率为野生型酶的 86%。

对纤维二糖底物的催化能力,不同位点 *N*-糖基化突变体也有所差异。突变体 T44A 催化效率与野生型 Bgl3A 基本一致, S228A 检测不到活性。突变体 S299A 的 K_m 为 11.4 mmol/L, 较野生型降低 0.6 倍, 即亲和力提高, 导致催化能力较野生型 Bgl3A 提高 1.1 倍。

2.4 野生型 Bgl3A 同源建模、二糖对接

以来源于里氏木霉 *Hypocrea jecorina* 第 3 家

族 β -葡萄糖苷酶 Cel3A (PDB: 3ZYZ) 为模板, 通过用 Discovery Studio 2017 Client 软件进行单模板同源建模, 并与纤维二糖对接(图 4)。

如图 4 标示, β -葡萄糖苷酶的酸碱催化碱基为口袋附近的 Asp 254 和 Glu 466。Asn 42、Asn 226 和 Asn 297 为 β -葡萄糖苷酶 3 个潜在 *N*-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。其中, Asn 226 糖链距离催化口袋关键残基(Asp 254 和 Glu 466)最近, 去除该位

表 4. 野生型 Bgl3A 与突变体对不同底物的动力学参数

Table 4. Kinetic parameters of Bgl3A wild-type and mutants on different substrates

Substrate	Enzymes	K_m /(mmol/L)	V_{max} /[μ mol/(min·mg)]	k_{cat} /(/s)	k_{cat}/K_m /[s/(mMol/L)]
<i>p</i> NPG	Wild-type	1.0 \pm 0.0	12451 \pm 235	16227 \pm 306	15339 \pm 361
	T44A	2.73 \pm 0.20	9664 \pm 516	12596 \pm 67	4611 \pm 68
	S228A	4.48 \pm 1.40	230 \pm 61	300 \pm 80	67 \pm 4
	S299A	0.17 \pm 0.00	1766 \pm 63	2302 \pm 83	13120 \pm 203
Cellobiose	Wild-type	17.9 \pm 2.7	1218 \pm 127	1587 \pm 165	89 \pm 4
	T44A	21.0 \pm 3.2	1384 \pm 161	1803 \pm 210	84 \pm 2
	S228A	—	—	—	—
	S299A	11.4 \pm 5.0	1772 \pm 186	1963 \pm 621	183 \pm 3

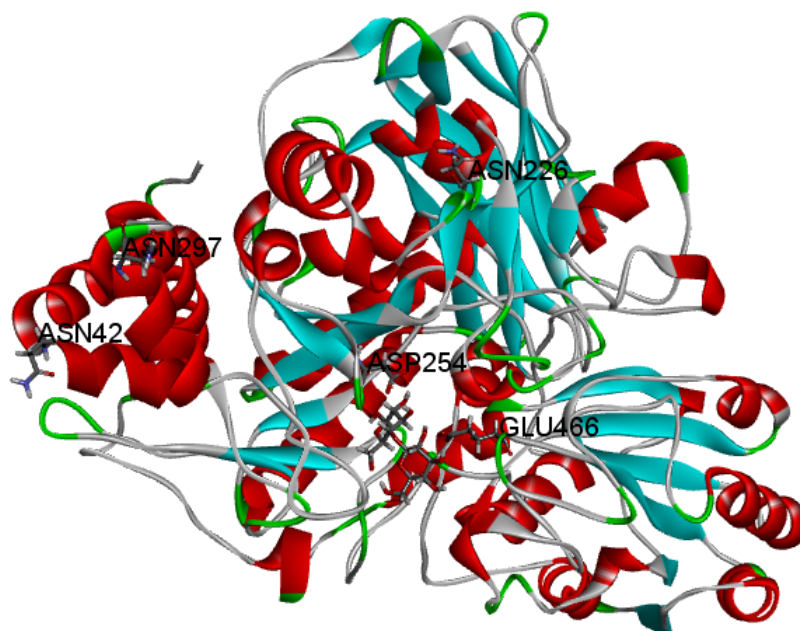


图 4. 野生型 Bgl3A 同源建模以及与二糖底物对接

Figure 4. Homology modeling of wild-type Bgl3A and its docking with cellobiose.

点处的糖链(突变体 S228)可能会对催化口袋造成影响, 会改变酶蛋白构象, 从而使酶活降低。

3 讨论

3.1 *N*-糖基化影响蛋白表达及分泌

自然界中, 蛋白质存在多种翻译后修饰方式, 主要有糖基化、磷酸化、泛素化、脂基化、甲基化和乙酰化等^[11-12], 超过半数的蛋白质是经过糖基化修饰的, 其中四分之三是 *N*-糖基化修饰。同时, 近几十年, 蛋白糖基化的研究逐渐关注 *N*-糖基化对酶分泌能力的作用。*N*-糖基化有助于酶蛋白的正确折叠表达以及外分泌。例如 Wei 等^[13]报道的来源于曲霉的葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中的表达, 存在 4 个天然的 *N*-糖基化位点, 其中 N224 糖基化位点突变后, 突变酶对 *p*NPG 底物基本无降解活性; 转录水平分析表明 N224 突变体蛋白因错误折叠不能分泌至胞外且在胞内被降解。另外, West 等^[14]报道的谷氨酰转移酶去除 N95 糖基化修饰后, 会使蛋白在分泌之前自催化裂解。本文研究了毕赤酵母表达嗜热真菌蓝状菌 Bgl3A 的 N226 糖基化位点出现相同结果, 突变酶 S228A 对 *p*NPG 底物的比活力较野生型降低 227 倍, 对纤维二糖底物基本丧失活性。以上分析表明, 对于第 3 家族葡萄糖苷酶, 曲霉的葡萄糖苷酶的 N224 位点和 Bgl3A 的 N226 位点的 *N*-糖基化对酶的分泌和折叠起到至关重要的作用, 其机制可能是 *N*-糖基化防止了酶在胞内被蛋白酶降解。

3.2 *N*-糖基化影响酶热稳定性

已有大量研究表明 *N*-糖基化修饰会对酶蛋白的稳定性产生影响。关于 *N*-糖基化能增强酶的稳定性报道有许多, 例如 Xi 等^[15]发现 *N*-糖基化修

饰的亮氨酸氨基肽酶具有较高的热稳定性; 此外来源于真菌曲霉的糖化酶在去除 *N*-连接的多糖残基后导致蛋白热稳定性下降, 并且在一些补充实验中, 人工引入了新的 *N*-糖基化位点, 表现出热稳定性增强的现象^[16]。但是, 也有文献报道糖基化修饰不会显著影响酶的热稳定性甚至会使其热稳定性降低^[6]。通过差量量热仪扫描的热力学稳定性显示, 突变体 T44A、S299A 的 T_m 值分别较野生型 Bgl3A 提高 0.3 °C 和 0.7 °C; 动力学稳定性也呈现相似趋势, 突变体 T44A 和 S299A 在 70 °C 处理 60 min 后, 仍能保持残余 50% 左右的相对酶活力, 而野生型 Bgl3A 在 70 °C 处理 20 min 后, 残余酶活力仅剩不足 20%。以上结果表明, Bgl3A 在这 2 个位点的 *N*-糖基化对酶的热稳定性具有负面作用, 其原因可能是糖链位于蛋白表面, 导致酶的整体结构趋于不稳定。

3.3 *N*-糖基化影响催化效率

同时, *N*-糖基化对酶催化效率的影响, 也受到广泛关注。已有报道表明, 随着 *N*-糖基化的位点不同、数目不同和糖链的结构不同, 其对酶催化活性的影响有显著差异^[17-19]。例如, William 等^[20]对里氏木霉表达的纤维二糖水解酶 *TrCBHI* *N*-糖基化研究, 将 *TrCBHI* 的 N384 突变后, 发现该位点突变体对纤维素水解活性提升 70%, 而其他糖基化位点的突变体催化活性呈现一定程度的降低。这一定程度说明了不同位置的糖链对酶催化活性影响的不确定性。同样, 本研究中的 3 个去 *N*-糖基化突变体对纤维二糖底物的催化活性也不相同, 突变体 T44A 催化效率与野生型 Bgl3A 基本一致, S228A 几乎检测不到活性。突变体 S299A 的 K_m 较野生型降低 0.6 倍, 即亲和力提高, 导致催化效率较野生型 Bgl3A 提高 1.1 倍。*N*-糖基化

对纤维二糖催化效率的影响机制可能是由于不同糖基化发生在蛋白的不同结构区域, 对蛋白质结构的影响从而导致酶对底物催化效率的变化。但总体来说, 由于 2 个 *N*-糖基化 T44A 和 S299A 均位于蛋白质表面, 远离催化中心, 对酶的催化效率影响不会起到明显作用。

总的来说, 本实验成功构建了 3 个 β -葡萄糖苷酶的去 *N*-糖基化突变体 T44A、S228A 和 S299A, 并且比较了它们在最适温度、最适 pH、热稳定性及催化效率等方面与野生型 Bgl3A 的差异。其中 T44A 和 S299A 与 Bgl3A 一致, 最适 pH 均为 4.0, S228A 最适 pH 发生轻微变化, 为 4.5。Bgl3A 为中高温酶, 最适作用温度为 70–75 °C。3 个突变体中, T44A 和 S299A 与野生型 Bgl3A 一致, 最适温度均为 75 °C, S228A 最适温度发生变化, 为 70 °C。热稳定性分析表明, 突变体 T44A 和 S299A 的热稳定性略高于野生型。酶促反应动力学分析表明以 *p*NPG 为底物, 3 个突变体的催化能力均下降, 其中突变体 T44A 的催化效率(k_{cat}/K_m)低至野生型 Bgl3A 的 3.3 倍; 以纤维二糖为底物, 突变体 T44A 的催化能力基本没变化, 突变体 S299A 催化能力较野生型 Bgl3A 提高 1.1 倍, 而突变体 S228A 由于蛋白表达量过低, 导致其对两种底物的催化能力均明显下降甚至无法检测到活性。由此可见, 不同位点的 *N*-糖基化修饰对酶学性质影响不同, N226 位点的 *N*-糖基化对于第 3 家族的 β -葡萄糖苷酶至关重要, 而 N297 位点糖基化的去除有利于其对纤维二糖底物的降解。

致谢

感谢实验室课题组姚斌老师和罗会颖老师给予实验经费的支持, 感谢石鹏君老师对实验的整

体设计以及指导, 感谢柏映国老师对实验结果分析的点拨, 感谢马锐老师对论文的整体修改和润色, 感谢华晨同学对实验数据测定过程的帮助。

参考文献

- [1] Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 45–52.
- [2] Nelson CE, Rogowski A, Morland C, Wilhide JA, Gilbert HJ, Gardner JG. Systems analysis in *Cellvibrio japonicus* resolves predicted redundancy of β -glucosidases and determines essential physiological functions. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(2): 294–305.
- [3] Zhang Z, Liu JL, Lan JY, Duan CJ, Ma QS, Feng JX. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 107–115.
- [4] Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 500–511.
- [5] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249–270.
- [6] Ma Q, Cai R, Jiang FC, Ma LJ, Du LP, Xiao DG. Effect of *N*-glycosylation on the heterologous expression of β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Food Science*, 2017, 38(16): 86–91. (in Chinese)
马清, 蔡瑞, 姜凤超, 马立娟, 杜丽平, 肖冬光. *N*-糖基化对 β -甘露聚糖酶在毕赤酵母中异源表达的影响. *食品科学*, 2017, 38(16): 86–91.
- [7] Yang MM, Johnson SC, Murthy PPN. Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris*: influence of gene dosage, sequence optimization and expression temperature. *Protein Expression and Purification*, 2012, 84(2): 247–254.
- [8] Mignon P, Pidko EA, van Santen RA, Geerlings P, Schoonheydt RA. Understanding the reactivity and basicity

- of zeolites: a periodic DFT study of the disproportionation of N_2O_4 on alkali-cation-exchanged zeolite Y. *Chemistry*, 2008, 14(17): 5168–5177.
- [9] Tie JK, Zheng MY, Pope RM, Straight DL, Stafford DW. Identification of the *N*-linked glycosylation sites of vitamin K-dependent carboxylase and effect of glycosylation on carboxylase function. *Biochemistry*, 2006, 45(49): 14755–14763.
- [10] Turner KM, Wright LC, Sorrell TC, Djordjevic JT. *N*-linked glycosylation sites affect secretion of cryptococcal phospholipase B1, irrespective of glycosylphosphatidylinositol anchoring. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2006, 1760(10): 1569–1579.
- [11] Veenstra TD. Proteomic Analysis of Posttranslational Modifications. John Wiley & Sons, Inc., 2013: 87–116.
- [12] Hu J, Guo YT, Li YM. Research progress in protein post-translational modification. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(11): 1061–1072. (in Chinese)
胡笏, 郭燕婷, 李艳梅. 蛋白质翻译后修饰研究进展. *科学通报*, 2005, 50(11): 1061–1072.
- [13] Wei W, Chen L, Zou G, Wang QF, Yan X, Zhang J, Wang CS, Zhou ZH. *N*-glycosylation affects the proper folding, enzymatic characteristics and production of a fungal β -glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(12): 3075–3084.
- [14] West MB, Wickham S, Quinalty LM, Pavlovicz RE, Li CL, Hanigan MH. Autocatalytic cleavage of human γ -glutamyl transpeptidase is highly dependent on *N*-glycosylation at asparagine 95. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(33): 28876–28886.
- [15] Xi HX, Tian YP, Zhou ND, Shen W. Characterization of an *N*-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(2): 236–246.
- [16] Liu HL, Doleyres Y, Coutinho PM, Ford C, Reilly PJ. Replacement and deletion mutations in the catalytic domain and belt region of *Aspergillus awamori* glucoamylase to enhance thermostability. *Protein Engineering*, 2000, 13(9): 655–659.
- [17] Wu G, Wei L, Liu W, Lin J, Wang L, Qu Y, Zhuang G. Asn 64-glycosylation affects *Hypocrea jecorina* (syn. *Trichoderma reesei*) cellobiohydrolase Cel7A activity expressed in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 26(2): 323–328.
- [18] Qi FF, Zhang WX, Zhang FJ, Chen GJ, Liu WF. Deciphering the effect of the different *N*-glycosylation sites on the secretion, activity, and stability of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(13): 3962–3971.
- [19] Siadat SOR, Mollasalehi H, Heydarzadeh N. Substrate affinity and catalytic efficiency are improved by decreasing glycosylation sites in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2015, 38(3): 483–488.
- [20] Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou YC, Baker JO, Michener W, Brunecky R, Himmel ME. Probing the role of *N*-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose*, 2009, 16(4): 699–709.

Effect of *N*-glycosylation on enzymatic properties of β -glucosidase from *Talaromyce leycettanus*

Xinxin Li, Yingguo Bai, Chen Hua, Rui Ma, Pengjun Shi*, Huiying Luo, Bin Yao

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

Abstract: [Objective] To investigate the effect of *N*-glycosylation on the enzymatic properties of β -glucosidase Bgl3A from *Talaromyce leycettanus*. [Methods] Site-directed mutagenesis was conducted to construct three *N*-glycosylation-removing mutants T44A, S228A and S299A, and the gene products were expressed in *Pichia pastoris* GS115. [Results] In comparison with wild type Bgl3A, the mutant S228A was low in protein secretion, with trace activity against *p*NPG, while mutants T44A and S299A showed similar optimal pH and temperature, i.e. pH 4.0 and 75 °C, but had higher T_m values and greater thermostability at 70 °C. When using *p*NPG as the substrate, mutants S299A and T44A had decreased catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) of 14.5% and 70%, respectively; for cellobiose, T44A retained almost the same catalytic efficiency, while S299A showed an improvement of 1.1-fold. [Conclusion] *N*-glycosylation modification at different sites of Bgl3A had different effect on the secretion and enzymatic properties. Among them, S228 is essential for maintaining the expression and function of the enzyme, whereas S299 can increase the enzyme thermostability and catalytic efficiency on cellobiose.

Keywords: *Talaromyce leycettanus*, β -glucosidase, *N*-glycosylation, thermostable, catalytic efficiency

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372345) and by the National High Technology Research and Development Program of China (2013AA102803)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82106053; Fax: +86-10-82106054; E-mail: shipengjun@caas.cn

Received: 25 January 2018; Revised: 21 March 2018; Published online: 3 April 2018