

# 定向进化提高嗜热拟青霉 J18 耐热 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶在酸性条件下的催化能力

李一男<sup>1</sup>, 贾会勇<sup>1</sup>, 闫巧娟<sup>2</sup>, 江正强<sup>1</sup>, 杨绍青<sup>1</sup>

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国农业大学工学院, 北京 100083

**摘要:** 应用定向进化技术提高了嗜热拟青霉 *Paecilomyces thermophila* J18 耐热  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 (PtLic16A) 在酸性条件下的催化能力。结合易错 PCR 和 DNA 改组的方法, 构建了  $\beta$ -葡聚糖酶的突变体文库; 利用刚果红染色法建立了阳性克隆的高通量筛选体系。筛选得到的突变酶 PtLic16AM1 的反应最适 pH 由 7.0 变化至 5.5, 且保持了原有的耐热性和比酶活。突变酶的 DNA 序列中有 4 个点位发生突变, 引发了 4 处氨基酸替换, 分别是 T58S、Y110N、G195E 和 D221G。结构模拟结果显示, 发生突变的 4 个氨基酸位点中, Y110N 位置靠近酶活性中心, 而 T58S、G195E 和 D221G 则离酶活性中心较远, 其中 T58S、G195E 可能对酶最适 pH 的变化起到了关键作用。

**关键词:** 嗜热拟青霉,  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶, 易错 PCR, DNA 改组

## Improvement of catalytic capability of *Paecilomyces thermophila* J18 thermostable $\beta$ -1,3-1,4-glucanase under acidic condition by directed evolution

Yinan Li<sup>1</sup>, Huiyong Jia<sup>1</sup>, Qiaojuan Yan<sup>2</sup>, Zhengqiang Jiang<sup>1</sup>, and Shaoqing Yang<sup>1</sup>

1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract:** Directed evolution was used to improve the performance of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase (designated as PtLic16A) from *Paecilomyces thermophila* J18 under acidic condition. A mutant library was constructed by error-prone PCR and DNA shuffling, and positive clones were screened by Congo red staining. More than 1 500 mutants were selected. One mutant (PtLic16AM1) exhibited an optimal activity at pH 5.5, while the optimal pH of the wild-type enzyme was 7.0. The mutant PtLic16AM1 kept the high specific activity and thermotolerance of the wild-type enzyme. Sequence analysis revealed that the mutant enzyme has four sense

**Received:** May 18, 2011; **Accepted:** August 8, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31071508), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-08-0534).

**Corresponding author:** Zhengqiang Jiang. Tel: +86-10-62737689; E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31071508), 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-08-0534) 资助。

substitutions which caused four amino acid substitutions - namely T58S, Y110N, G195E and D221G. Homology modeling showed that among the four amino acid substitutions, Y110N was near the active site of the enzyme, while the other three was distant. T58S and G195E may play key roles in the change of optimal pH. This study provided a new perspective of obtaining applicable  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase for industrial use.

**Keywords:** *Paecilomyces thermophila*,  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase, error-prone PCR, DNA shuffling

$\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.73) 又称地衣多糖酶, 能专一性催化大麦  $\beta$ -葡聚糖或地衣多糖中临近  $\beta$ -1,3-糖苷键的  $\beta$ -1,4-糖苷键的水解反应, 使大麦和燕麦的  $\beta$ -葡聚糖降解为小分子糖<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖酶在啤酒酿造和饲料工业中有重要的应用价值<sup>[2]</sup>。在啤酒工业中,  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶降解麦芽汁中的  $\beta$ -葡聚糖, 降低麦芽汁粘度, 提高麦芽汁过滤速率, 保持成品酒的稳定性。 $\beta$ -葡聚糖是饲料中的抗营养因子, 阻碍动物对营养的吸收, 降低了饲料的转化率, 在饲料中添加  $\beta$ -葡聚糖酶, 可以大大降低  $\beta$ -葡聚糖粘度, 从而改善麦类饲料的营养价值。啤酒酿造的糖化工艺温度一般为  $65\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 麦芽汁 pH 一般为  $5.0\sim 5.6$ , 因此啤酒工业生产中的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶除了需具备耐热的特性外, 还应在偏酸性条件下具备较强的催化能力。此外, 由于动物肠道的酸性环境, 最适 pH 偏酸的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶也更适合在饲料工业中应用。

酶分子的定向进化属于蛋白质的非理性设计, 不需要事先了解酶蛋白的结构、活性位点和催化机制等信息, 而是通过在体外模拟自然进化机制 (随机突变、基因重组、自然选择), 使基因发生突变, 并通过特异的方法筛选得到具有某些预期特征的突变酶<sup>[3]</sup>。国内外研究者已利用定向进化技术对多种  $\beta$ -葡聚糖酶的性质进行了改造。Wang 等运用易错 PCR 方法改造里氏木霉内切葡聚糖酶, 得到了多种最适 pH 发生变化的突变体<sup>[4]</sup>。Lin 等结合易错 PCR 和 DNA 改组提高了  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的催化活性<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的定向进化研究较少, 且主要集中在提高热稳定性的研究上。Kim 等通过定向进化将来源于 *Orpinomyces joyonii* 的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的半失活温度提高了  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[6]</sup>。张秀艳等改造了枯草

芽胞杆菌的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶, 使其最适温度提高了  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[7]</sup>。秦久福等采用体外分子进化提高了淀粉液化芽胞杆菌  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性<sup>[8]</sup>。

本研究室的前期研究完成了嗜热拟青霉 J18 耐热  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶基因 (*PtLic16A*) 的克隆和在毕赤酵母中高效表达,  $5\text{ L}$  发酵罐液体发酵产  $\beta$ -葡聚糖酶, 发酵  $120\text{ h}$  酶活达到  $55\ 300\text{ U/mL}$ 。此酶最适温度为  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  且热稳定性良好, 最适 pH 为  $7.0$ <sup>[9]</sup>, 具有很大的工业应用价值。为提高此耐热酶在酸性条件下的催化能力, 本文通过易错 PCR (error-prone PCR) 和 DNA 改组 (DNA shuffling) 相结合的方法构建了嗜热拟青霉  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 *PtLic16A* 的突变体文库, 采用刚果红染色法筛选, 获得了一个酸性  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体 *PtLic16AM1*。通过分析突变体的序列和结构, 初步考察了  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的蛋白质结构与功能的关系。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂

*Taq* DNA 聚合酶、DNase I、限制性内切酶 (TaKaRa 宝生物公司)、*Pfu* DNA 聚合酶 (Promega 公司)、T4 DNA 连接酶 (NEB 公司)、引物 (上海生物工程技术有限公司合成)、DNA Ladder Marker、多功能 DNA 纯化试剂盒、高纯质粒小量提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司), 酵母膏和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品, 异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 为 Inalco 公司产品, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 菌株与质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21、含有嗜热拟青霉  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶基因 (*PtLic16A*) 的质粒

pET26b-*PtLic16A* 均由实验室保存; 表达载体 pET-26b (+) 购自 Novagen 公司。

### 1.3 易错 PCR

为方便表达载体的构建, 在正向和反向引物的 5'端分别引入了 *Bsp*H I 和 *Xho* I 酶切位点。以含有葡聚糖酶基因的原核表达质粒 pET26b-*PtLic16A* 为模板, 利用引物 PtLic16AF (TCGATGTCATGATGTATCATCTTGTGACGACTACGGCCGG) 和 PtLic16AR (CCGCTCGAGGGGTGCGTACACGCGGAGCGAG) 在 *Taq* DNA 聚合酶作用下进行易错 PCR 扩增, 易错 PCR 体系 (50  $\mu$ L): 33.5  $\mu$ L 双蒸水, 5.0  $\mu$ L 10 $\times$ *Taq* DNA 聚合酶缓冲液, 4.0  $\mu$ L dNTPs (12.5 mmol/L dCTP 和 dTTP, 2.5 mmol/L dATP 和 dGTP), 3.5  $\mu$ L 的 100 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.0  $\mu$ L 的 10 mmol/L  $MnCl_2$ , 1.0  $\mu$ L 的 10  $\mu$ mol/L PtLic16AF/PtLic16AR, 0.5  $\mu$ L 质粒 DNA 模板 (~10 ng), 0.5  $\mu$ L (2.5 U) *Taq* DNA 聚合酶。易错 PCR 反应条件: 95  $^{\circ}C$  5 min; 95  $^{\circ}C$  30 s, 55  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}C$  8 min。将易错 PCR 得到的 DNA 片段 (命名为 xBM) 进行回收, 用于 DNA 改组。

### 1.4 DNA 改组

DNA 改组包括 DNA 随机片段化、重叠延伸 PCR 和全长基因扩增 PCR 三个过程<sup>[10-11]</sup>。利用 DNase I 将易错 PCR 得到的 DNA 片段化, 得到随机切割的 DNA 片段, 命名为 xBM/DNase I。DNase I 酶切体系 (100  $\mu$ L): 30  $\mu$ L 双蒸水、10  $\mu$ L 10 $\times$ DNase I 缓冲液、6.7  $\mu$ L 的 10 mmol/L  $Mn^{2+}$ 、3.6  $\mu$ L 经 NaCl 稀释 10 000 倍的 DNase I (0.0252 U)、49.7  $\mu$ L DNA (~8  $\mu$ g)。DNase I 酶切过程为: 20  $^{\circ}C$  反应 15 min, 加入 2.5 mmol/L EDTA 终止反应, 80  $^{\circ}C$  保温 10 min 以灭活 DNase I, 乙醇沉淀法纯化 DNA 小片段。两轮 PCR 过程: 1) 取经过 DNase I 处理的 DNA 小片段 xBM/DNase I (~50 bp) 进行第一轮无引物 PCR, PCR 体系 (50  $\mu$ L): 29.58  $\mu$ L 双蒸水、5  $\mu$ L 10 $\times$ *Pfu* DNA 聚合酶缓冲液、5  $\mu$ L dNTPs (每种 2 mmol/L)、

2  $\mu$ L 的 25 mmol/L  $MgSO_4$ 、8  $\mu$ L (~2  $\mu$ g) xBM/DNase I、0.42  $\mu$ L (1 U) *Pfu* DNA 聚合酶; PCR 条件: 95  $^{\circ}C$  5 min; 95  $^{\circ}C$  30 s, 45  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  1 min +5 s/循环, 10 个循环; 72  $^{\circ}C$  8 min。2) 取第一轮 PCR 产物 1  $\mu$ L (50~100 ng) 作为第二轮 PCR 的模板, 利用两端引物 PtLic16AF 和 PtLic16AR 扩增得到全长突变文库, PCR 体系 (50  $\mu$ L): 33.58  $\mu$ L 双蒸水, 5  $\mu$ L 10 $\times$ *Pfu* DNA 聚合酶缓冲液, 5  $\mu$ L dNTPs (每种 2 mmol/L), 2  $\mu$ L 的 25 mmol/L  $MgSO_4$ , 1.5  $\mu$ L 的 10  $\mu$ mol/L PtLic16AF/PtLic16AR, 1  $\mu$ L 模板, 0.42  $\mu$ L (1 U) *Pfu* DNA 聚合酶; PCR 条件: 95  $^{\circ}C$  5 min; 95  $^{\circ}C$  30 s, 55  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}C$  8 min。

### 1.5 突变文库构建与筛选

DNA 改组产物回收后用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 再与经过 *Bsp*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-26b (+) 载体连接 (*Nco* I 和 *Bsp*H I 是同尾酶, 可直接相连)。连接产物经酚氯仿抽提纯化后电转化至 *E. coli* BL21。

将转化后的菌液稀释适当倍数, 均匀地涂在含 50 mg/L 卡纳霉素的 LB 平板上, 37  $^{\circ}C$  培养 24 h。待长出适当大小的菌落后, 挑至筛选平板上, 筛选平板为加有 0.5% 大麦  $\beta$ -葡聚糖、1 mmol/L IPTG 和 50 mg/L 卡纳霉素的 LB 平板 (调至 pH 5.0), 同时接种表达亲本酶 PtLic16A 的大肠杆菌作为对照。在 37  $^{\circ}C$  下培养。原平板也在 37  $^{\circ}C$  继续培养, 以便以后挑取突变体菌株。筛选平板在 37  $^{\circ}C$  下培养 1 d 后, 在 60  $^{\circ}C$  下热处理 1 h, 细胞裂解后, 用 0.1% 的刚果红溶液染色 15 min, 再用 1 mol/L NaCl 溶液洗去刚果红。选择透明圈大小与对照组相近或更大的菌株, 通过透明圈的位置及平板上的编号从原始平板上挑取相应菌株, 进行复筛。复筛中, IPTG 诱导大肠杆菌表达后, 超声波破碎细胞, 测定粗酶液在酸性和中性条件下的酶活, 所用缓冲液分别为: 柠檬酸缓冲液, pH 3.0~6.0; 2-吗啉乙磺酸缓冲液 (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, MES), pH

5.0~7.0; 磷酸缓冲液, pH 6.0~7.0。以酸性条件下酶活高于中性条件下酶活的突变体为阳性突变体。复筛中得到的阳性突变体委托上海英骏生物技术公司进行 DNA 测序。

### 1.6 $\beta$ -葡聚糖酶的纯化

诱导表达后的大肠杆菌经离心收集菌体, 按 1:100 重溶解于平衡缓冲液 (50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑), 菌液经超声波破碎细胞使酶释放, 离心收集上清即为粗酶液。用镍离子亲和层析 (Ni-IDA) 得到纯酶, 经 SDS-PAGE<sup>[12]</sup>检测蛋白纯度。

### 1.7 $\beta$ -葡聚糖酶活性和蛋白含量测定

$\beta$ -葡聚糖酶的活力测定采用 DNS 法<sup>[13]</sup>。以大麦  $\beta$ -葡聚糖为底物, 配制 1% (W/V) 浓度, 测定时在小试管中加入 50  $\mu$ L 底物, 然后加入 100  $\mu$ L 75 mmol/L 的 pH 7.0 MES 缓冲液, 混匀。70  $^{\circ}$ C 预热 3 min, 加入 50  $\mu$ L 经过适当稀释的酶液, 反应 10 min 后加入 200  $\mu$ L DNS 试剂终止反应, 煮沸 15 min 后加入 200  $\mu$ L 饱和酒石酸钾钠溶液, 冷却后, 在 540 nm 波长下测定吸光度值, 以葡萄糖作为标准。酶活力的单位定义为: 在上述条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量。

蛋白含量测定: 参照 Lowry 等<sup>[14]</sup>的方法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

### 1.8 $\beta$ -葡聚糖酶性质测定

最适 pH 及 pH 稳定性: 将酶液溶于不同 pH 值的 5 种不同缓冲液体系中 (柠檬酸缓冲液, pH 3.0~6.0; MES 缓冲液, pH 5.0~7.0; 磷酸缓冲液, pH 6.0~7.5; Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5~9.0; 2-(环己胺)-1-乙磺酸缓冲液 (2-(Cyclohexylamino) ethanesulfonic acid, CHES), pH 8.5~10.0), 然后按照上述酶活性测定方法测定  $\beta$ -葡聚糖酶的酶活力, 以酶活力最高值为 100% 并作图。用上述不同的 pH 值缓冲液分别稀释纯酶液, 将稀释好的酶液置于 50  $^{\circ}$ C 水浴锅中分别处理 30 min 后, 迅速将样品置于冰水中冷却 30 min, 然后以上述方法测定残余酶活力, 以未

经处理的酶液作为对照, 计算残余酶活力占对照酶活力的百分比。

最适反应温度及温度稳定性: 将酶液适当稀释后, 然后分别在不同温度下 (40~100  $^{\circ}$ C) 按照上述方法测定  $\beta$ -葡聚糖酶的酶活力, 以酶活力最高值为 100% 并作图。用 pH 7.0 的 MES 缓冲液将  $\beta$ -葡聚糖酶稀释至一定倍数, 分别在不同的温度下保温 30 min, 然后置于冰水浴中冷却 30 min, 最后按标准的方法测定残余酶活力, 以未经处理的酶液酶活力为对照, 计算残余酶活力占对照酶活力的百分比。

底物特异性及动力学参数: 用 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.5) 配制 1% 浓度的不同底物, 然后在 70  $^{\circ}$ C 下反应 10 min, 采用上述方法测定水解释放出的还原糖量, 以葡萄糖作为标准。酶活力单位定义为在上述条件下每分钟反应生成还原糖所需要的酶量。动力学参数的测定, 配制不同浓度 (0.5~2.0  $K_m$  范围内) 的大麦  $\beta$ -葡聚糖底物, 加入一定量  $\beta$ -葡聚糖酶在 70  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后测定酶活力, 通过 Graftit 软件计算出  $V_{max}$ 、 $K_m$  和标准偏差。

### 1.9 三维结构同源模拟与突变位点分析

根据突变酶的 DNA 测序结果, 利用软件 DNAMAN (LynnonBiosoft, USA) 对测序结果进行比对分析, 并将基因序列翻译成氨基酸序列; 利用 Clustal X 软件对亲本酶蛋白质序列与突变酶蛋白质序列进行比对分析。在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 数据库输入目的蛋白质氨基酸序列生成模拟结构图, 根据预测的结构信息对突变位点进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变文库构建与筛选

易错 PCR 方法是目前定向进化最为常用的突变手段<sup>[15]</sup>。与 DNA 改组相结合, 可将易错 PCR 产生的不同点突变结合到一个 DNA 分子上, 增加基因突变率并尽可能使得基因上的点突变分布在基因的不

同区域。将定向进化的突变率控制在合适范围至关重要<sup>[16]</sup>。本研究利用易错 PCR 和 DNA 改组相结合的方法将随机突变率控制在合适范围, 以利于后期筛选工作。易错 PCR 中控制  $Mg^{2+}$  浓度为 7.0 mmol/L,  $Mn^{2+}$  浓度为 0.2 mmol/L。包含 DNA 随机片段化、重叠延伸以及全长基因扩增的 DNA 改组过程见图 1。从突变文库随机挑选 10 个克隆测序, 突变率约为 0.5%, 即每个  $\beta$ -葡聚糖酶基因分子约 5 个核苷酸碱基突变。

是否有高效灵敏的筛选方法是定向进化能否成功的关键问题之一。本研究中, 采用了刚果红染色方法, 此方法在多种聚糖水解酶的筛选中较为常用<sup>[17-18]</sup>, 通过透明圈的存在与否初步判断突变体是否在酸性条件下具有  $\beta$ -葡聚糖酶活性, 通过初筛快速又准确地缩小了筛选范围。突变体文库中的大肠杆菌转接至筛选平板, 控制数量使每个筛选平板接种 50 个单菌落, 此数量有利于接下来的透明圈的观察。大肠杆菌表达的酶主要是胞内蛋白, 需破壁后才能释放出胞内酶, 因此需要寻找有效的破壁方法, 有研究者配制含溶菌酶的细胞裂解液以进行破壁<sup>[19]</sup>。本研究的亲本酶 PtLic16A 具有较好的耐热性, 在 70 °C 以下都能保持稳定, 利用此优势, 将初筛平板置于 60 °C 对大肠杆菌进行热裂解以释放胞内酶, 释放出的  $\beta$ -葡聚糖酶在 60 °C 下直接与筛选平板中的底物作用, 能保持较高的催化活力, 使透明圈更加明显, 此方法简化了操作, 提高了破壁效率。筛选结果显示, 每个筛选平板的 50 个转化子中, 有 3~5 个转化子经突变后透明圈明显, 具有较高的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活性。经过摇瓶诱导产酶后, 都能检测到相应的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活性, 证明了初筛方法是有效的。在复筛中, 通过比较酸性 pH 和中性 pH 下的酶活, 找出在酸性条件下催化能力增强的突变体。实际筛选过程中, 绝大多数突变体的最适 pH 都没有发生变化, 只有极少数突变体在酸性条件下的催化能力相比亲本有所增强。采用上述筛选方

法, 筛选了 1 500 多个突变体, 最终得到了最适 pH 由 7.0 变为 5.5 的突变酶 PtLic16AM1。测序结果显示, PtLic16AM1 的基因中共有 4 个碱基发生了突变, 分别为 A226T、T382A、G638A 和 A716G。4 处突变均为有义突变, 导致 4 处氨基酸替换, 分别为 T58S、Y110N、G195E 和 D221G。

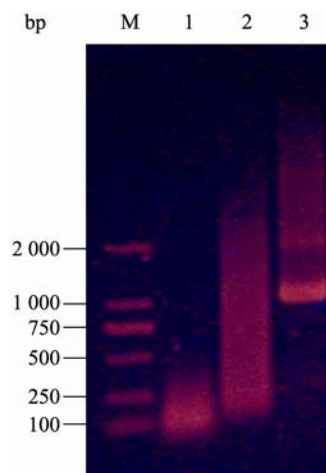


图 1 易错 PCR 产物的 DNA 改组

Fig. 1 DNA shuffling after error-prone PCR. M: DNA marker; 1: DNA fragments digested with Dnase I; 2: reassembly products; 3: amplification of full-length gene.

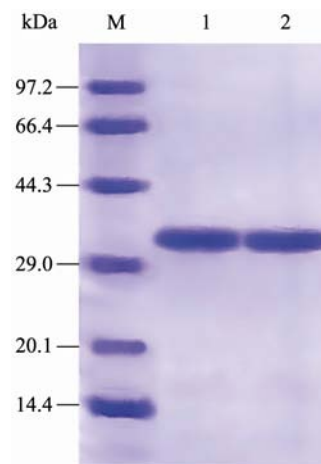


图 2 亲本酶和突变酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of purified PtLic16A and PtLic16AM1. M: standard protein marker; 1: PtLic16A; 2: PtLic16AM1.

## 2.2 纯化鉴定

亲本酶和突变酶经 Ni-IDA 亲和层析纯化和 SDS-PAGE 鉴定, 呈现单一的目的条带 (图 2), 野生酶和突变酶的分子量基本相同。突变酶 PtLic16AM1 纯酶的比活为 10 872 U/mg, 与亲本酶 (11 938 U/mg) 相比, 略微有所降低。

## 2.3 酶学性质变化

### 2.3.1 最适 pH 及 pH 稳定性

如图 3A 所示, 突变酶 PtLic16AM1 的最适 pH 为 5.5, 而亲本酶的最适 pH 为 7.0。与亲本酶相比, 突变酶的最适 pH 明显降低, 表明原有的中性  $\beta$ -葡聚糖酶经过定向进化已变成酸性  $\beta$ -葡聚糖

酶。由图 3B 可知, 亲本酶和突变酶的 pH 稳定性基本一致, 在 pH 5.0~9.0 之间, 处理 30 min 后均能保持在 90% 以上, 在碱性条件下, 突变酶与亲本酶相比, 稳定性略有降低。酸性条件下, 稳定性略有增强。

### 2.3.2 最适温度及温度稳定性

突变酶 PtLic16AM1 的最适反应温度均为 70 °C (图 4A), 这与亲本酶的最适温度相同, 表明经过定向进化, 突变酶保持了亲本酶的耐热能力。亲本酶和突变酶的温度稳定性都较好, 在 70 °C 处理 30 min 后, 酶活仍然能够保持在 70% 左右 (图 4B), 温度稳定性变化趋势一致。

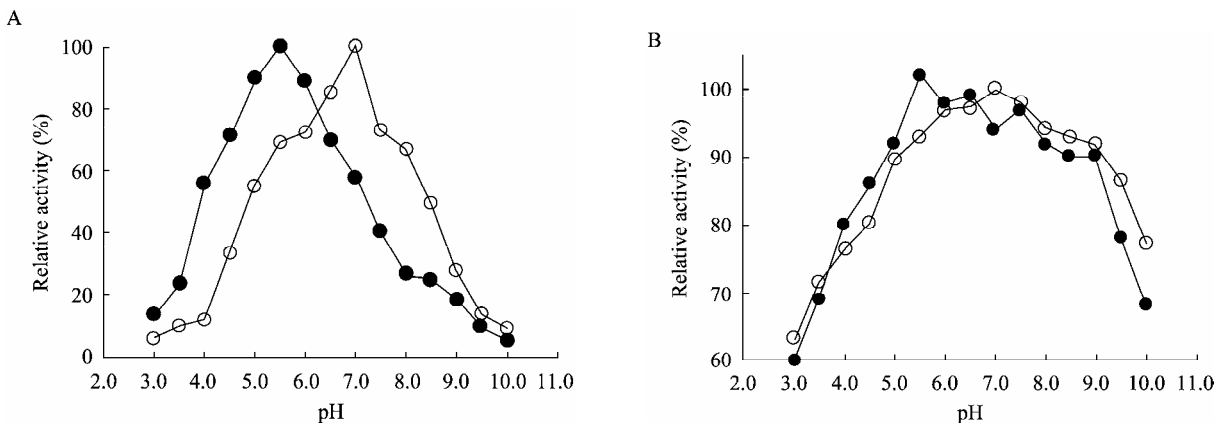


图 3 亲本酶和突变酶的反应最适 pH (A) 及 pH 稳定性 (B)

Fig. 3 Optimal pH (A) and pH stability (B) of PtLic16A (○) and PtLic16AM1 (●).

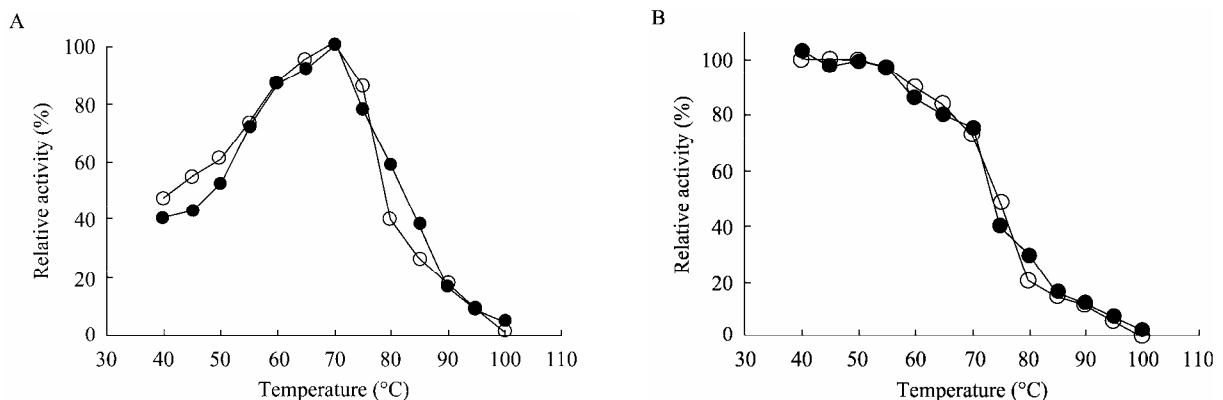


图 4 亲本酶和突变酶的反应最适温度 (A) 及温度稳定性 (B)

Fig. 4 Optimal temperature (A) and thermostability (B) of PtLic16A (○) and PtLic16AM1 (●).

表 1 亲本酶 PtLic16A 和突变酶 PtLic16AM1 的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of PtLic16A and PtLic16AM1

Mutant	$V_{\max}$ (mmol/(min·g))	$K_m$ (g/L)	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ (g/(s·L))
PtLic16A	6116.6±212	3.69±0.29	102	27.6
PtLic16AM1	7858.7±306	3.41±0.34	131	38.4

\*Kinetic parameters were estimated at pH 5.5 using barley  $\beta$ -glucan.

### 2.3.3 底物特异性和动力学参数

突变酶 PtLic16AM1 对大麦葡聚糖和地衣多糖有很高的底物特异性, 比酶活分别为 10 872 U/mg 和 7 889 U/mg, 对昆布多糖、CMC-Na、Avicel、梓木聚糖均没有活性。这与亲本酶是一致的。在酸性条件下 (pH 5.5), 突变酶 PtLic16AM1 与亲本酶 PtLic16A 相比,  $V_{\max}$  增大了 28.5%, 而  $K_m$  降低了 7.6%。结果表明突变酶在酸性条件下的催化能力明显增强 (表 1)。

### 2.4 突变体结构预测与分析

采用 SWISS-MODEL 对亲本酶 PtLic16A 和突变体 PtLic16AM1 进行结构预测生成三级结构, SWISS-MODEL 自动选择了 *Phanerochaete chrysosporium* Laminarinase 16A 作为模板。预测结果 (图 5) 显示嗜热拟青霉  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶由两个分别为 7 股和 6 股的大反向平行  $\beta$  折叠层组成, 两个  $\beta$  折叠层由  $\alpha$  螺旋和无规卷曲连接, 活性中心在  $\beta$  折叠层中, 活性位点氨基酸残基 EIDIIE 和糖苷水解酶 16 家族活性位点氨基酸残基 EIDIE 相似。突变酶 PtLic16AM1 的 4 个氨基酸突变位点中, Y110N 位置靠近酶活性中心, 而 T58S、G195E 和 D221G 则离酶活性中心较远。通过定向进化获得的突变酶较少有在活性中心发生突变的, 大部分突变位点都远离酶的活性中心, 远离活性中心的位点突变使酶的构象特别是活性中心的构象发生微小的变化进而影响酶的功能<sup>[20]</sup>。第 58 位突变为丝氨酸, 由于丝氨酸中的羟基易与水分子相互作用生成氢键, 可能有利于酶在酸性条件下增强结构的稳定性<sup>[21]</sup>。有研究认为酸性氨基酸含量高时可以减少在低 pH 条件下

正电荷的累计, 从而提高其在酸性条件下的稳定性<sup>[22]</sup>, 第 195 位突变为谷氨酸 (谷氨酸是酸性氨基酸) 可能属于此种情况。

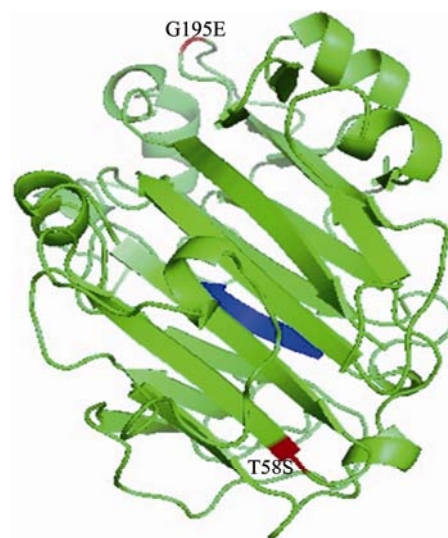


图 5 PtLic16AM1 的模拟三维结构

Fig. 5 Simulated three-dimensional structure of PtLic16AM1.

## 3 结论

结合易错 PCR 和 DNA 改组构建了嗜热拟青霉  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 PtLic16A 的突变文库并建立了高通量筛选体系, 获得了一个突变酶 PtLic16AM1, 其反应最适 pH 由原来的 7.0 变化为 5.5。序列分析表明, PtLic16AM1 的基因中发生了 4 处碱基突变, 引起了 4 处氨基酸替换。突变酶 PtLic16AM1 结构模拟结果显示, 突变的 4 个氨基酸位点中, Y110N 位置靠近酶活性中心, 而 T58S、G195E 和 D221G 则

离酶活性中心较远, 其中第 58 位突变为丝氨酸、第 195 位突变为谷氨酸可能对酶最适 pH 的变化起到了关键作用。

## REFERENCES

- [1] Planas A. Bacterial 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543(2): 361–382.
- [2] Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochem*, 2006, 7: 23.
- [3] Zhao HM, Chockalingam K, Chen ZL. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 13(2): 104–110.
- [4] Wang T, Liu XM, Yu Q, et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomol Eng*, 2005, 22(1-3): 89–94.
- [5] Lin L, Meng X, Liu PF, et al. Improved catalytic efficiency of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Bacillus Subtilis* BME-15 by directed evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(4): 671–679.
- [6] Kim SA, Cheng KJ, Liu JH. A variant of *Orpinomyces joyonii* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase with increased thermal stability obtained by random mutagenesis and screening. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(1): 171–174.
- [7] Zhang XY, Ruan H, Mu L, et al. Enhancement of the thermostability of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase by directed evolution. *J Zhejiang Univ Sci A*, 2006, 7(11): 1948–1955.
- [8] Qing JF, Gao WW, Li Q, et al. Improvement of thermostability of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 through *in vitro* evolution. *Chin J Biotech*, 2010, 26(9): 1293–1301.
- 秦久福, 高威威, 李崎, 等. 通过体外分子进化技术提高淀粉液化芽胞杆菌 BS5582  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性. *生物工程学报*, 2010, 26(9): 1293–1301.
- [9] Hua CW, Yan QJ, Jiang ZQ, et al. High-level expression of a specific  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(2): 509–518.
- [10] Zhao HM, Arnold FH. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(6): 1307–1308.
- [11] Lorimer IAJ, Pastan I. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNase I in the presence of  $Mn^{2+}$ . *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(15): 3067–3068.
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426–428.
- [14] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265–275.
- [15] Neylon C. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4): 1448–1459.
- [16] Voigt CA, Kauffman S, Wang ZG. Rational evolutionary design: the theory of *in vitro* protein evolution. *Adv Protein Chem*, 2000, 55: 79–160.
- [17] Nakazawa H, Okada K, Onodera T, et al. Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(4): 649–657.
- [18] Huang JL, Wang GX, Xiao L. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2006, 97(6): 802–808.
- [19] Song JK, Rhee JS. Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A1 by evolutionary molecular engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(3): 890–894.
- [20] Zhang SP, Cui TB, Chen L, et al. Directed evolution of Douchi fibrinolytic enzyme. *J South China Univ Technol: Nat Sci Ed*, 2010, 38(9): 138–141.
- 张少平, 崔堂兵, 陈亮, 等. 豆豉纤溶酶的定向进化. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2010, 38(9): 138–141.
- [21] Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, 2000, 13(3): 179–191.
- [22] Zhang GY, Gao JQ, Fang BS. Amino acid composition and classification of acidic and alkaline enzymes. *Chin J Biotech*, 2009, 25(1): 95–100.
- 张光亚, 高嘉强, 方柏山. 酸性和碱性酶稳定性机制及其识别. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 95–100.