

• 农业生物技术 •

反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶基因在毕赤酵母中的高效表达及酶学性质

付婷婷*, 胡玮*, 陈勇, 魏欢, 杨光

新疆农业大学 动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

付婷婷, 胡玮, 陈勇, 等. 反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶基因在毕赤酵母中的高效表达及酶学性质. 生物工程学报, 2017, 33(5): 785-795.

Fu TT, Hu W, Chen Y, et al. High-level expression and characterization of *Selenomonas ruminantium* β -xylosidase in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 785-795.

摘要: β -木糖苷酶 (β -xylosidase, 酶编号 EC 3.2.1.37) 是木聚糖降解酶系中的重要组成部分。本研究以毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 为宿主菌尝试表达反刍兽月形单胞菌 *Selenomonas ruminantium* 中的 β -木糖苷酶基因 *Sxa*。根据毕赤酵母对密码子的偏爱性、mRNA 二级结构、GC 含量和稀有密码子, 对 *Sxa* 基因进行优化; 通过基因合成技术获得了全长基因 *mSxa* 并构建重组酵母表达载体 pPIC9K-*mSxa*; 以 *Bgl* II 酶切重组载体 pPIC9K-*mSxa*, 电击转化将 *mSxa* 基因导入毕赤酵母 GS115 中, 获得的转化子经过表型和遗传霉素 G418 抗性筛选、PCR 鉴定, 得到表达 β -木糖苷酶基因的工程菌 GS115-pPIC9K-*mSxa*; 通过活性测定获得高效表达 β -木糖苷酶的重组酵母, 并对重组 β -木糖苷酶的酶学性质进行了初步研究。结果表明, 重组 β -木糖苷酶的分子量约为 66 kDa。在发酵罐水平表达的酶活性达到了 287.61 IU/mL。对酶学性质研究显示, 该酶在温度为 40-60 °C, pH 为 5.0-7.0 时较稳定, 其最适反应温度和 pH 分别为 55 °C 和 6.0, 专一性地作用于 β -木糖苷键。Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 对该酶具有激活作用, 而 Fe³⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、EDTA 及 SDS 抑制其酶活性。本研究首次将反刍兽月形单胞菌的 β -木糖苷酶基因转化到毕赤酵母中获得表达, 并具有较高活性, 为进一步工业化应用奠定了基础。

关键词: 反刍兽月形单胞菌, β -木糖苷酶, 毕赤酵母, 异源表达, 酶学性质

Received: November 8, 2016; **Accepted:** February 7, 2017

Supported by: The Xinjiang Uygur Autonomous Region High Tech Research Project (No. 201211104).

Corresponding author: Yong Chen. Tel: +86-991-8763771; E-mail: xjaucy@163.com

*These authors contributed equally to this study.

新疆维吾尔自治区高技术研究项目 (No. 201211104) 资助。

网络出版时间: 2017-02-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170216.1109.005.html>

High-level expression and characterization of *Selenomonas ruminantium* β -xylosidase in *Pichia pastoris*

Tingting Fu*, Wei Hu*, Yong Chen, Huan Wei, and Guang Yang

College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: β -xylosidase (EC 3.2.1.37) is an important part of the xylanolytic enzymes system. In the present research, β -xylosidase gene *Sxa* derived from *Selenomonas ruminantium* was expressed in *Pichia pastoris* GS115. According to the codon bias and rare codons of *P. pastoris*, mRNA secondary structure and GC content, *Sxa* gene was optimized. The optimized full-length gene *mSxa* was obtained by gene synthesis technique and the recombinant yeast expression vector pPIC9K-*mSxa* was constructed. After being digested by restriction enzyme *Bgl* II, the *mSxa* gene was transformed into *P. pastoris* GS115. Then, phenotype and geneticin G418 resistance screening, and PCR were adopted to identify the positive transformants. Finally, the recombinant *P. pastoris* GS115-pPIC9K-*mSxa* was obtained. Based on enzymatic activity assay, a high-level expression clone was picked up and then the enzymatic characteristics of the recombinant β -xylosidase were studied. The results showed that the molecular weight of the *mSxa* expressed in *P. pastoris* G115 was about 66 kDa. The maximum activity was achieved 287.61 IU/mL at fermenter level. Enzymatic characterization showed the β -xylosidase was stable between 40 °C and 60 °C, and pH between 5.0 and 7.0. The optimal reaction temperature and pH were 55 °C and 6.0, and preferentially degrading the β -xylose glycosidic bond. The enzymatic activity was activated by Mn^{2+} and Ca^{2+} , and inhibited by Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , EDTA and SDS. The study indicates that the modified β -xylosidase gene *mSxa* from *Selenomonas ruminantium* can express successfully with high activity in *P. pastoris*. The study lays a foundation for further industrial application of the β -xylosidase.

Keywords: *Selenomonas ruminantium*, β -xylosidase, *Pichia pastoris*, heterologous expression, enzymatic characteristics

β -木糖苷酶 (β -xylosidase, 酶编号为 EC 3.2.1.37) 是木聚糖降解酶系中的一种, 主要催化水解木糖苷和以外切方式作用于低聚合度木寡糖 (木二糖和木三糖) 的非还原性末端生成木糖^[1], 在造纸、生物能源、食品、饲料以及医药等多个领域具有潜在的应用价值^[2]。

反刍兽月形单胞菌 *Selenomonas ruminantium* 是瘤胃中的优势菌, 占瘤胃总细菌的 21%–50%^[3], 是利用低聚木糖的重要微生物, 其降解低聚木糖的能力与木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶活性呈正相关^[4]。由反刍兽月形单胞菌产生的 β -木糖苷酶 *Sxa* 是具有 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶活性的双功能酶^[5]。与以往发现的 β -木糖苷酶相比, *Sxa* 的活性更高, 其 K_{cat} 和

K_{cat}/K_m 是目前发现的其他 β -木糖苷酶的 10 倍^[5]。由此可见, 反刍兽月形单胞菌产生的木糖苷酶 *Sxa* 具有较好的商业价值。然而, 反刍兽月形单胞菌为严格厌氧菌, 直接利用其生产 *Sxa* 的成本较高。

本研究以 *Sxa* 为目的基因, 根据宿主菌毕赤酵母 *Pichia pastoris* 密码子的偏爱性等对来源于反刍兽月形单胞菌的 β -木糖苷酶 *Sxa* 基因进行密码子优化, 通过全基因合成技术得到新的 β -木糖苷酶基因 *mSxa*, 构建重组载体 pPIC9K-*mSxa*, 并在毕赤酵母中表达; 同时, 对重组 β -木糖苷酶 *mSxa* 的酶学性质进行研究, 为后续应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、宿主菌毕赤酵母 GS115 和表达载体 pPIC9K 为本实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 和蛋白质标准分子量购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒小提试剂盒和 DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;地衣多糖、大麦 β -葡聚糖、燕麦木聚糖购自 Megazyme 公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶 *Sxa* 基因的优化与 *mSxa* 基因的合成

在 GenBank 中检索反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶基因 *Sxa* (GenBank Accession No. AF040720.1) DNA 序列,经 SignalP 4.1 软件在线分析 *Sxa* 是否存在潜在的信号肽序列;在不改变原有 *Sxa* 氨基酸顺序的情况下,利用 Optimum GeneTM 根据毕赤酵母对密码子的偏爱性、mRNA 二级结构、GC 含量和稀有密码子进行优化。优化后的核苷酸序列送至南京金斯瑞生物科技有限公司合成获得优化后的 β -木糖苷酶基因 *mSxa*。合成的 *mSxa* 基因和酵母表达载体 pPIC9K 用限制性内切酶 *Sna*B I 和 *Avr* II 进行双酶切,酶切产物采用 DNA 纯化试剂盒进行纯化。经纯化后的 *mSxa* 基因和表达载体 pPIC9K 用 T4 DNA 连接酶进行连接,构建 *mSxa* 基因的酵母表达载体 pPIC9K-*mSxa*。将 pPIC9K-*mSxa* 转化 *E. coli* DH5 α ,经过菌落 PCR 和限制性内切酶鉴定后,由上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 重组毕赤酵母表达系统的构建及筛选

用限制性内切酶 *Bgl* II 将重组质粒 pPIC9K-*mSxa* 线性化,并用 DNA 纯化试剂盒进

行纯化回收后,使用 BTX ECM399 电转化仪转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。将细胞涂布于葡萄糖再生培养基(Regeneration dextrose base, RDB)平板上,29 $^{\circ}$ C 培养 48 h。挑选生长良好的细胞在最小葡萄糖培养基(Minimal dextrose medium, MD)和最小甲醇培养基(Minimal methanol medium, MM)板上进行甲醇利用慢型(Mut^s)和甲醇利用正常型(Mut⁺)的表型筛选,再经不同浓度梯度遗传霉素 G418 (Geneticin[®])的抗性筛选以及 PCR 鉴定,得到高拷贝阳性转化子。

1.4 重组 β -木糖苷酶 *mSxa* 的诱导表达

选取表型为 Mut^s、抗 6 mg/mL G418 的 9 个高拷贝转化子分别于试管和摇瓶中进行甲醇诱导表达,诱导表达时每 24 h 补加甲醇 1 次至终浓度为 0.5%。采用试管表达时培养 48 h 后结束;采用摇瓶表达时培养 144 h 结束,同时每 12 h 取 5 mL 菌液用于测定 β -木糖苷酶酶活性。

1.5 重组 β -木糖苷酶 *mSxa* 的活性检测

1.5.1 刚果红平板染色法定性检测 β -木糖苷酶活性

分别取培养 96 h 的宿主菌 GS115、转化 pPIC9K 空载体的重组菌以及 pPIC9K-*mSxa* 重组菌诱导表达 0、60 和 96 h 后的培养上清液 80 μ L,滴至含 5 mmol/L 对硝基苯基- β -D-木糖苷(*p*-Nitrophenyl β -D-xyloside, *p*NPX)琼脂平板的牛津杯中,将平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 16-18 h,取出牛津杯在平板上缓慢添加适量 0.1%刚果红染液,静置 30 min,用适量 1 mol/L 氯化钠溶液进行脱色 30-60 min,再用适量 0.5%乙酸固定平板。根据刚果红染色平板上透明圈的直径初步判断表达产物的酶活性。

1.5.2 β -木糖苷酶活性的定量测定

参考胡玮的方法定量测定 β -木糖苷酶酶活性^[6]。1个木糖苷酶活性单位 (IU) 为:以 5 mmol/L *p*NPX 为底物,每分钟在 pH 6.0 和 55 °C 条件下分解 *p*NPX 生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.6 重组 β -木糖苷酶 *mSxa* 高密度诱导表达

参考 Hoggins 等^[7]的方法进行高密度发酵。在装有 6 L 发酵 FM22/PMT4 培养基的发酵罐中接种 1% 的种子液,甲醇诱导表达 114 h,每 12 h 取 10 mL 样品,用于测定酶活性。

1.7 发酵上清的 SDS-PAGE

取 1 mL 发酵上清液加入 0.1 mL 的 100% 三氯乙酸 (TCA),混匀后于 -20 °C 放置 30 min,离心 20 min,弃上清后向沉淀加入 0.2 mL 冷丙酮洗去 TCA,加入 20 μ L 上样缓冲液混匀后进行 SDS-PAGE。

1.8 重组 β -木糖苷酶 *mSxa* 酶学性质的研究

1.8.1 表达产物的浓缩和纯化

发酵产物经离心后,取 6 mL 发酵上清液经超滤浓缩至 1 mL。以 G-75 葡聚糖凝胶对浓缩上清进行层析纯化,用部分收集器每 30 s 收集 1 管。取 2.5 μ L 于 280 nm 处测定 OD_{280} ,通过 OD_{280} 初步判定蛋白质所在洗脱组分。

1.8.2 *mSxa* 的最适反应温度及温度稳定性

1) 取 200 μ L 适当稀释的重组 β -木糖苷酶溶液,分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 条件下与 5 mmol/L *p*NPX 于 pH 6.0 条件下反应 10 min,然后加入 2 mol/L 碳酸钠 750 μ L 终止反应,测定酶活性。2) 取 200 μ L 适当稀释的重组 β -木糖苷酶液,分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 条件下保

持 30 min 后,在 55 °C 及 pH 6.0 条件下测定其剩余酶活性,以最适温度条件下的酶活性为 100% 计算各处理的相对酶活性。

1.8.3 *mSxa* 的最适反应 pH 及 pH 稳定性

1) 取 200 μ L 适当稀释的重组 β -木糖苷酶液溶,分别在 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10 和 11 及 55 °C 条件下测定酶活性。2) 取 200 μ L 适当稀释的重组 β -木糖苷酶溶液,分别在 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10 和 11 及 55 °C 条件下保持 30 min 后测定剩余酶活性,以最适 pH 条件下的酶活性为 100% 计算各处理的相对酶活性。

1.8.4 *mSxa* 的底物特异性

取 200 μ L 适当稀释的重组 β -木糖苷酶液,分别以大麦 β -葡聚糖、地衣多糖、燕麦木聚糖、*p*NPX 和羧甲基纤维素钠为底物在 pH 6 和 55 °C 条件下测定酶活性,以最适底物的酶活性为 100% 计算各底物的相对酶活性。

1.8.5 金属离子、螯合剂和表面活性剂对 *mSxa* 酶活性的影响

在最适反应体系中加入适当浓度的金属离子 ($FeCl_3$ 、 $MnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $CoCl_2$ 、 $CaSO_4$ 和 $MgSO_4$),螯合剂 (EDTA) 和表面活性剂 (SDS),使金属离子、螯合剂和表面活性剂的浓度为 5 mmol/L,在 pH 6 和 55 °C 条件下测定酶活性,以加入等体积缓冲液的样品酶活性为 100% 计算各组相对酶活性。

2 结果与分析

2.1 反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶 *Sxa* 基因的优化与合成

经 DNA 测序后确认,人工合成的 *mSxa* 基因全长 1 617 bp,共编码 538 个氨基酸残基,与设计的优化序列 (图 1) 完全一致。与 *Sxa* 基因 (GenBank Accession No. AF040720.1) 相比,优

化核苷酸 385 个, 涉及 340 个密码子, 优化前后的序列的相似性为 76.10%。通过 Optimum GeneTM 软件分析后发现, 密码子优化指数由优化前的 0.63 提高到优化后的 0.85, GC 含量由优

化前的 53.68% 降低至优化后的 43.68%, *Sxa* 基因含有 6.00% 的稀有密码子, 优化后被全部消除。

2.2 表达高活性 β -木糖苷酶重组酵母的筛选

通过表型和抗遗传霉素筛选, 累积获得 9 个

抗 6 mg/mL G418 的 Mut^s 转化子。在试管中, 木糖苷酶的平均活性为 1.98 IU/mL, 其中 91 号转化子酶活性明显高于其他转化子, 其活性为 8.56 IU/mL, 是其他转化子平均活性的 7.3 倍 (图 2)。后续研究均选取第 91 号转化子进行。

2.3 平板刚果红法鉴定重组 β -木糖苷酶活性

如图 3 所示, 毕赤酵母 GS115 和转化空表达载体 pPIC9K 的 GS115 诱导 96 h 后以及转化 pPIC9K-*mSxa* 的 GS115 诱导前的培养上清未产生透明圈, 表明毕赤酵母 GS115 和转化空表达载体 pPIC9K 的 GS115 无木糖苷酶活性。转化 pPIC9K-*mSxa* 的 GS115 诱导 60 和 96 h 后的培养上清产生了明显的透明圈, 诱导 60 h 后的透明圈直径为 13 mm, 诱导 96 h 后的透明圈直径为 21 mm。这表明 *mSxa* 基因在毕赤酵母 GS115 中得到了表达, 并且产生了明显的木糖苷酶活性。

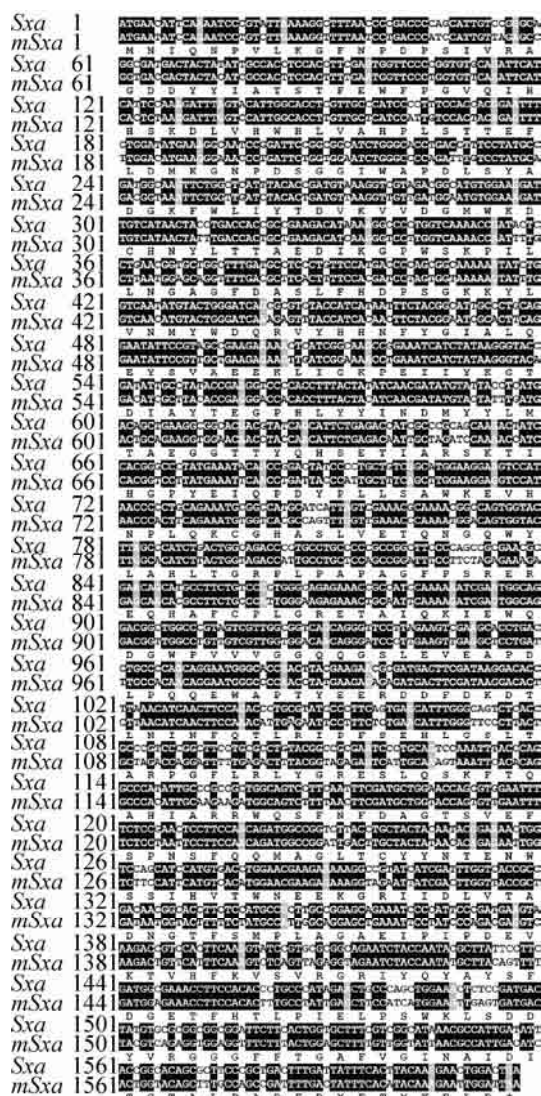


图 1 反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶 *Sxa* 基因优化前和优化后序列的比较

Fig. 1 Alignment of nucleotide sequences between the wild-type and optimized β -xylosidase *Sxa* gene of *S. ruminantium*. The regions with black background mean the nucleotides were not changed before and after optimization.

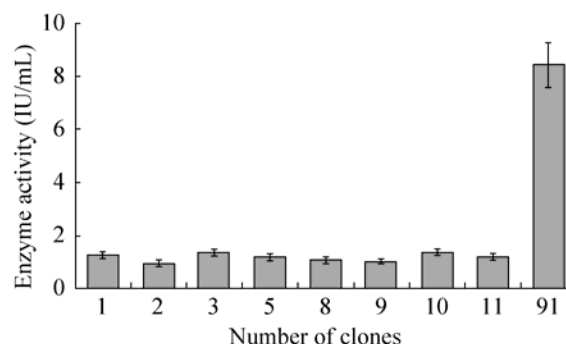


图 2 *mSxa* 在试管表达水平下的酶活性

Fig. 2 Enzymatic activity of *mSxa* of different clones expressed in test tube.

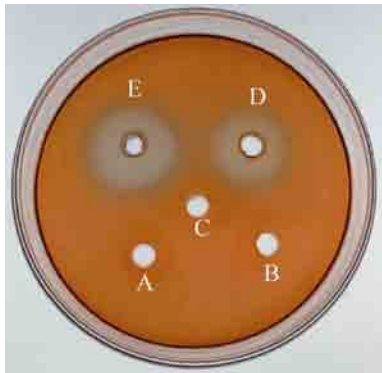


图3 平板刚果红法鉴定重组 β -木糖苷酶活性

Fig. 3 Activity staining of the secreted recombinant β -xylosidase on plate observed after induction. A: the host *P. pastoris* GS115 induced 96 h, did not produce a transparent circle; B: GS115-pPIC9K induced 96 h, did not produce a transparent circle; C: GS115-pPIC9K-*mSxa* before inducing, did not produce a transparent circle; D: GS115-pPIC9K-*mSxa* induced 60 h, produced a less transparent circle; E: GS115-pPIC9K-*mSxa* induced 96 h, produced a larger transparent circle.

2.4 重组 β -木糖苷酶 mSxa 的表达

如图4所示,在摇瓶条件下,第91号转化子在诱导表达84 h之前,随着时间的增加,酶活性有缓慢上升;在84–96 h,酶活性迅速上升,并在96 h时活性达到最高值,为17.54 IU/mL。之后开始缓慢下降。在10 L发酵罐中,mSxa的活性变化规律与摇瓶中的变化相似,但整体活性显著提高,在诱导表达96 h时酶活性较高,为287.61 IU/mL。

2.5 发酵上清的 SDS-PAGE

如图5所示,发酵上清在66 kDa附近出现一条明显的蛋白质条带。反刍兽月形单胞菌 *Sxa* 酶由538个氨基酸残基组成,理论相对分子质量为59.18 kDa。所得到的蛋白分子量略大于理论计算值,这可能是由于蛋白质的糖基化和磷酸化的结果。

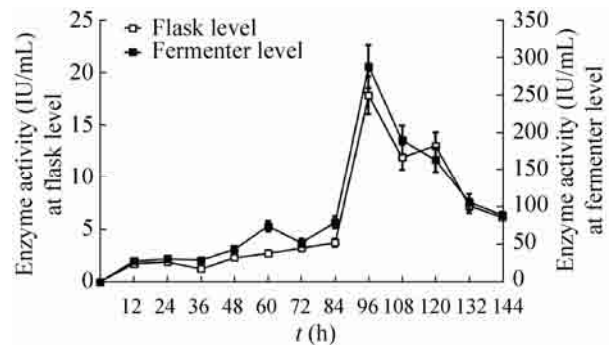


图4 mSxa 在摇瓶和发酵罐条件下的酶活性

Fig. 4 Enzymatic activity of mSxa expressed at flask and fermenter levels.

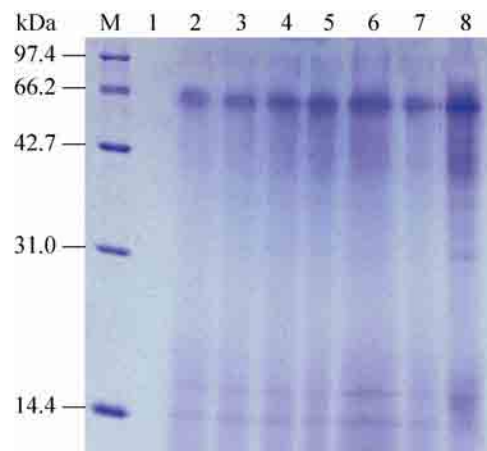


图5 不同发酵时间发酵液上清的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the culture supernatants at different time of fermentation. M: protein molecular weight standards; 1–8: before induction; 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h and 96 h after induction in a 10 L fermenter.

2.6 重组 β -木糖苷酶 mSxa 的酶学性质

2.6.1 mSxa 最适反应温度及温度稳定性

如图6所示,当反应的温度低于55 $^{\circ}$ C时,随着反应温度的升高酶活性逐步升高并在55 $^{\circ}$ C时酶活性达到最高;之后随着反应温度的不断升高酶活性逐渐下降。因此,该重组 β -木糖苷酶的最适温度为55 $^{\circ}$ C。

通过对剩余酶活性的测定发现,重组 β -木糖苷酶在温度为 40–60 °C 保持 30 min 后剩余酶活性均大于 80%;但是当温度超过 60 °C 后,剩余酶活性急剧下降。这表明,该重组 β -木糖苷酶在 40–60 °C 时有较好的热稳定性。

2.6.2 重组 β -木糖苷酶最适反应 pH 及 pH 稳定性

如图 7 所示,在 pH 2.0 的条件下,该酶的相对酶活性为 40%;在 pH 5.0–7.0 之间,该酶相对酶活性均在 80% 以上,且该重组 β -木糖苷酶的最适反应 pH 为 6.0;在 pH 11.0 时,该酶的相对酶活性仅为 9.2%。

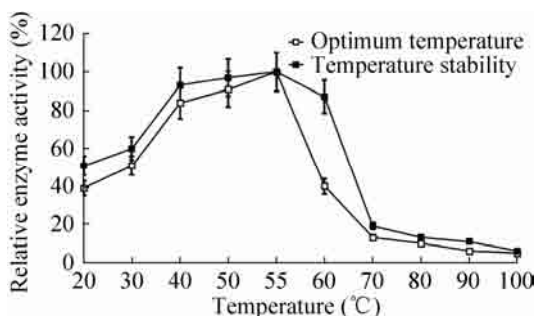


图 6 mSxa 的最适温度和温度稳定性

Fig. 6 The optimal temperature and temperature stability of mSxa.

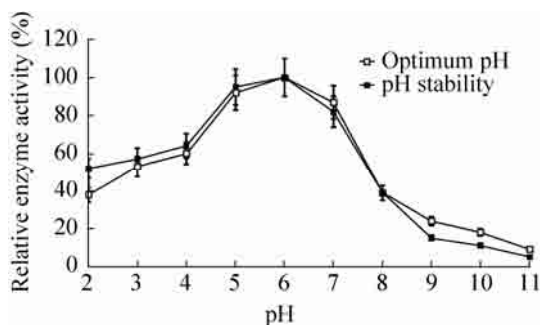


图 7 mSxa 的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 7 The optimal pH and pH stability of mSxa.

通过测定剩余酶活性,在 pH 2.0 时该酶的剩余酶活性为 53%;在 pH 5.0–7.0 时剩余酶活性均高于 80.0%;当 pH 升高至 9.0 时,该酶的剩余酶活性仅有 11.5%。由此可知,该重组 β -木糖苷酶在 pH 5.0–7.0 的条件下较为稳定。

2.6.3 mSxa 的底物特异性

底物特异性试验结果显示,重组 β -木糖苷酶对燕麦木聚糖 (Oat spelt xylan, OSX) 和 *p*NPX 具有水解作用,但不降解地衣多糖 (Lichenin, Li)、大麦 β -葡聚糖 (Barley β -glucan, BG) 以及羧甲基纤维素钠 (Sodium carboxymethyl cellulose, SCMC) (图 8)。此外,该重组 β -木糖苷酶对 *p*NPX 的降解效率远高于 OSX。这表明重组 β -木糖苷酶具有较高的底物特异性。

2.6.4 金属离子、螯合剂和表面活性剂对 mSxa 酶活性的影响

图 9 显示, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对重组 β -木糖苷酶活性有激活作用,其中 Ca^{2+} 使酶活性提高近 50%,而 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、EDTA 及 SDS 明显抑制酶的活性。

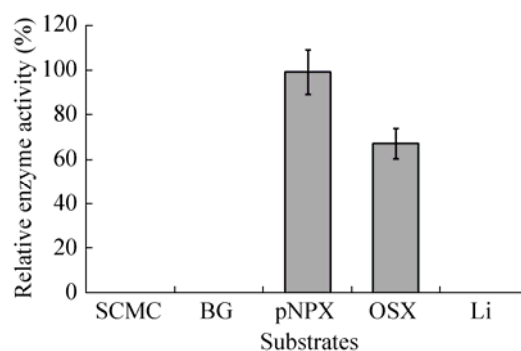


图 8 mSxa 的底物特异性

Fig. 8 Substrate specificity of mSxa. SCMC: sodium carboxymethyl cellulose; BG: barley β -glucan; *p*NPX: *p*-Nitrophenyl β -D-xyloside; OSX: oat spelt xylan; Li: Lichenin.

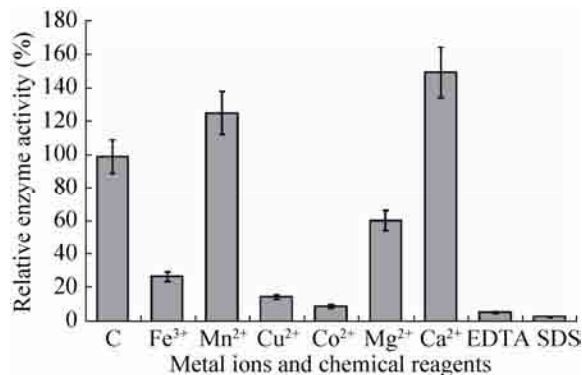


图9 金属离子、螯合剂及表面活性剂对 mSxa 酶活性的影响

Fig. 9 Influence of metal ions, chelating agent and surfactant on enzymatic activity of mSxa. C: control; EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid; SDS: sodium dodecylsulphate.

3 讨论

木聚糖酶和 β -木糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶、乙酰酯酶是降解木聚糖的主要酶类^[8-9]。一些细菌、放线菌和真菌等微生物以及高等植物均可产生 β -木糖苷酶。与木聚糖酶相比,有关 β -木糖苷酶的研究及异源表达还鲜见报道。

根据氨基酸组成, β -木糖苷酶分布于糖苷水解酶的第 3、30、39、43、51、52 和 54 家族^[10]。由于 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶的活性中心高度保守,因此 β -木糖苷酶和一些 α -阿拉伯呋喃糖苷酶可以水解 α -阿拉伯呋喃糖苷键和 β -吡喃糖苷键^[11]。由反刍兽月形单胞菌产生的 β -木糖苷酶 Sxa 是糖苷水解酶第 43 家族成员^[12],是具有 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶活性的双功能酶^[5]。这种双功能酶不仅具有从木聚糖和低聚木聚糖中释放木糖,也能够从阿拉伯聚糖、阿拉伯低聚糖和阿拉伯木聚糖中释放阿拉伯糖^[13]。这表明 Sxa 在木聚糖的生物转化中具有潜

在的应用价值。在本研究中,重组 β -木糖苷酶 mSxa 具有降解燕麦木聚糖和 pNPX 的作用,而不降解其他非淀粉多糖,说明 mSxa 具有较强的专一性。受条件限制,本研究未对 mSxa 的 α -阿拉伯呋喃糖苷酶活性进行研究。

瘤胃是降解纤维质效率最高的生物反应器,其中蕴含了大量非淀粉多糖酶基因资源。但是由于大部分瘤胃微生物为严格厌氧微生物,因此,直接利用瘤胃微生物生产工业用酶制剂受到极大限制。基因工程技术能很好地解决这一问题。目前,一些来源于瘤胃微生物的基因获得了异源表达^[14-16]。

毕赤酵母是高效表达异源蛋白质的优良系统。利用该系统,一些来源于瘤胃细菌和真菌的葡聚糖酶和木聚糖酶获得了表达^[16-18]。对目的基因进行优化常用于提高蛋白质的表达水平。优化时不仅需考虑替换宿主低利用率的密码子,同时还需注意 mRNA 的二级结构和自由能、顺式作用元件以及重复序列和 GC 含量。Dehnavi 等^[19]对 Sxa 基因进行优化后,在毕赤酵母 GS115 中的表达水平达到 0.5 U/mL。在本试验中,重组 β -木糖苷酶 mSxa 在 10 L 发酵罐中的表达水平达到 287.61 IU/mL,远远高于之前的任何报道。这可能与以下因素有关:1) 优化核苷酸的位置。Dehnavi 等^[19]对编码 Sxa 的 365 个核苷酸进行了优化,涉及 341 个氨基酸,GC 含量由 52% 下降至 46%;本研究对 385 个核苷酸进行了优化,涉及 340 个密码子(339 个氨基酸和终止密码子),GC 含量由优化前的 53.68% 降低至优化后的 43.68%。这表明,本研究中 mSxa 的核苷酸与 Dehnavi 等^[19]合成的基因存在明显不同,mSxa 的 mRNA 自由能可能更低,更易于表达。2) 异源表达系统。Dehnavi 等^[19]

所采用的表达系统为 pPink α -HC/GS115, 而本研究中采用的表达系统为 pPIC9K/GS115。众所周知, 表达载体的结构元件是影响外源蛋白质表达的因素之一。3) 甲醇利用表型。pPink α -HC/GS115 无需进行甲醇利用表型筛选, 通过同源重组产生的转化子均为 Mut⁺。而本研究中, 利用 *Bgl* II 线性化 pPIC9K-*mSxa* 后, 获得的转化子是 Mut^s。不同的甲醇利用表型是影响外源蛋白质表达水平的重要因素^[20]。与 Mut^s 相比, Mut⁺ 的生长速度和甲醇摄入速度要快得多^[21]。因此, 目前大部分的研究均利用 Mut⁺ 型菌株表达外源蛋白质。然而, 研究发现尽管 Mut^s 菌株达到最高表达量的诱导时间较长, 但其代谢甲醇较少, 受氧的限制较小, 有时外源蛋白质的表达量比 Mut⁺ 菌株还要高^[21-22]。

酶的热稳定性是影响工业应用的重要因素。由微生物产生的 β -木糖苷酶最适反应温度一般介于 40–60 °C 之间^[8], 而一些嗜热微生物产生的 β -木糖苷酶有较高的热稳定性。Bachmann 等^[23] 研究发现, 褐色高温单孢菌 *Thermomonospora fusca* 的 β -木糖苷酶最适反应温度为 82 °C, 其活性在 70 °C 可以保持 1.5 h。在本研究中, 重组 β -木糖苷酶的最适反应温度为 55 °C; 在 40–60 °C 时保持 30 min, 剩余约 80% 的酶活性; 当温度达到 70 °C 时, 酶活性基本丧失。这说明本研究中获得的 *mSxa* 耐热性能不强。要获得工业应用, 还需通过蛋白质改造以提高其热稳定性。Jordan 等^[5] 在大肠杆菌中表达了 *Sxa* 基因, 将第 145 位的色氨酸替换为苯丙氨酸或亮氨酸可提高重组 β -木糖苷酶的 KiD-glucose 和 KiD-xylose, 增加对 pH 和温度的稳定性。对氨基酸残基进行替换并不总能产生有益的结果。Jordan 等^[24] 将 *Sxa* 第 186 位的谷氨酸替换为丙氨酸后, 酶活性显著降低。

大部分 β -木糖苷酶的最适 pH 在 3.0–6.0 之间, 耐受弱酸性^[8]。如来源于出芽短梗霉菌 *Aureobasidium pullulans* 的 β -木糖苷酶, 其最适 pH 为 4.0^[25]。然而, 由嗜热脱氮芽孢杆菌 *Geobacillus thermodenitrificans* 产生的 β -木糖苷酶具有耐热、耐碱和耐盐的特性, 其最适 pH 为 7.0^[26]。这提示, 该 β -木糖苷酶可能具有更广阔的应用范围。本试验以 *pNPX* 为底物, 在反应温度 55 °C 时测得 *mSxa* 的最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–7.0 都保持良好的稳定性, 表明 *mSxa* 亦呈弱酸性。

不同金属离子、螯合剂和表面活性剂对重组 β -木糖苷酶的影响有显著差异。有研究表明, 金属离子 Fe³⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Ag⁺、Cu²⁺ 和 Hg²⁺, SDS 以及螯合剂 EDTA 抑制酶的活性; 而金属离子 Mg²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺ 和 K⁺ 对酶的活性起激活作用^[17,27]。在本研究中, 5 mmol/L 的 Fe³⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、EDTA 及 SDS 明显抑制酶的活性。而 Ca²⁺ 和 Mn²⁺ 对 *mSxa* 具有明显的激活作用, 因此推测 Ca²⁺ 和 Mn²⁺ 可能是 *mSxa* 的辅因子。

4 结论

通过密码子优化, 反刍兽月形单胞菌 β -木糖苷酶基因 *mSxa* 在毕赤酵母中实现了分泌表达。在发酵罐水平表达的酶活性达到了 287.61 IU/mL。该酶在温度为 40–60 °C, pH 为 5.0–7.0 时较稳定, 其最适反应温度和 pH 分别为 55 °C 和 6.0。该酶对 β -木糖苷键具有特异的切割作用, Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 激活其活性, 而 Fe³⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、EDTA 及 SDS 抑制其活性。

REFERENCES

- [1] Rasmussen LE, Sørensen HR, Vind J, et al. Mode of action and properties of the β -xylosidases from

- Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(5): 869–876.
- [2] Bosetto A, Justo PI, Zanardi B, et al. Research progress concerning fungal and bacterial β -xylosidases. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(4): 766–795.
- [3] Wu XZ, Gao YX, Ou HL, et al. Isolation and characterization of *Selenomonas ruminantium* from the rumen of dairy cows. *Prog Vet Med*, 2008, 29(10): 25–28 (in Chinese).
武心镇, 高玉霞, 欧海龙, 等. 奶牛瘤胃中反刍兽月形单胞菌的分离鉴定. *动物医学进展*, 2008, 29(10): 25–28.
- [4] Whitehead TR, Cotta MA. Identification of a broad-specificity xylosidase/arabinoxidase important for xylooligosaccharide fermentation by the ruminal anaerobe *Selenomonas ruminantium* GA192. *Curr Microbiol*, 2001, 43(4): 293–298.
- [5] Jordan DB, Wagschal K, Fan ZM, et al. Engineering lower inhibitor affinities in β -D-xylosidase of *Selenomonas ruminantium* by site-directed mutagenesis of Trp145. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(11): 1821–1835.
- [6] Hu W. Expression of the *Paecilomyces* sp. FLH 30 endo β -1,3(4) glucanase gene and *Selenomonas ruminantium* xylosidase gene in *Pichia pastoris* [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2016 (in Chinese).
胡玮. *Paecilomyces* sp. FLH 30 内切 β -1,3(4)葡聚糖酶基因和 *Selenomonas ruminantium* 木糖苷酶基因在毕赤酵母中的表达 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2016.
- [7] Higgins DR, Cregg JM. *Pichia* protocols // *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 1998, 103: 1–264.
- [8] Fan YY, Li XT, Teng C. Research progress on β -xylosidases from microorganism. *Food Res Dev*, 2013, 34(12): 116–121 (in Chinese).
范园园, 李秀婷, 滕超. 微生物产 β -木糖苷酶的研究进展. *食品研究与开发*, 2013, 34(12): 116–121.
- [9] Qing Q, Wyman CE. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4(1): 18.
- [10] Jordan DB, Wagschal K. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1647–1658.
- [11] McKee LS, Peña MJ, Rogowski A, et al. Introducing endo-xylanase activity into an exo-acting arabinofuranosidase that targets side chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6537–6542.
- [12] Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, et al. β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* of glycoside hydrolase family 43. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 137-140(1/12): 93–104.
- [13] Lagaert S, Pollet A, Courtin CM, et al. β -xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2): 316–332.
- [14] Kwon M, Song JY, Park HS, et al. Characterization of heterologously expressed acetyl xylan esterase1 isolated from the anaerobic rumen fungus *neocallimastix frontalis* PMA02. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(11): 1576–1584.
- [15] Kobayashi Y, Okuda N, Matsumoto M, et al. Constitutive expression of a heterologous *Eubacterium ruminantium* xylanase gene (*xynA*) in *Butyrivibrio fibrisolvens*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 163(1): 11–17.
- [16] Yang YX, Zhang HL, Wang Y, et al. Expression of *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- β -glucanase gene in *Pichia pastoris*. *J Nanjing Agric Univ*, 2014, 37(4): 123–130 (in Chinese).
杨玉霞, 张慧玲, 汪艳, 等. 产琥珀酸丝状杆菌 1,3-1,4- β -葡聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达. *南京农业大学学报*, 2014, 37(4): 123–130.
- [17] Wang Y, Li X, Chen Y, et al. Expression of a xylanase gene originated from rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis* in *Pichia pastoris*.

- Biotechnol Bull, 2015, 31(5): 186–193 (in Chinese).
- 汪艳, 李晓, 陈勇, 等. 来源于瘤胃厌氧真菌 *Neocallimastix frontalis* 木聚糖酶在毕赤酵母中的表达. 生物技术通报, 2015, 31(5): 186–193.
- [18] Wang Y, Luo YL, Hu W, et al. High-level expression and characterization of *xynA* originated from anaerobic fungi *Orpinomyces* sp. PC-2 in *Pichia pastoris*. J Agric Biotechnol, 2016, 24(5): 708–717 (in Chinese).
- 汪艳, 罗艳丽, 胡玮, 等. 源于厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. PC-2 的 *xynA* 在毕赤酵母中的高效表达及其酶学性质分析. 农业生物技术学报, 2016, 24(5): 708–717.
- [19] Dehnavi E, Siadat SOR, Roudsari MF, et al. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. Protein Expr Purif, 2016, 124: 55–61.
- [20] Pla IA, Damasceno LM, Vannelli T, et al. Evaluation of *Mut⁺* and *Mut^S* *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. Biotechnol Prog, 2006, 22(3): 881–888.
- [21] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. Microb Cell Fact, 2012, 11: 22.
- [22] Orman MA, Çalik P, Özdamar TH. The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of *Mut^S* and *Mut⁺* strains. Biotechnol Appl Biochem, 2009, 52(3): 245–255.
- [23] Bachmann SL, Mccarthy AJ. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermomonospora fusca*. J Gen Microbiol, 1989, 135(2): 293–299.
- [24] Jordan DB, Braker JD. β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: role of glutamate 186 in catalysis revealed by site-directed mutagenesis, alternate substrates, and active-site inhibitor. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 161(1/8): 395–410.
- [25] Nasr S, Soudi MR, Salmanian AH, et al. Partial optimization of endo-1,4- β -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(12): 1245–1253.
- [26] Anand A, Kumar V, Satyanarayana T. Characteristics of thermostable endoxylanase and β -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. Extremophiles, 2013, 17(3): 357–366.
- [27] Liang YL, Li XY, Shin HD, et al. Expression and characterization of a xylosidase (Bxyl) from *Bacillus halodurans* C-125. Chin J Biotech, 2009, 25(9): 1386–1393 (in Chinese).
- 梁艳丽, 李兴玉, Shin HD, 等. 嗜碱芽孢杆菌 C-125 木糖苷酶基因的表达与酶特征鉴定. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1386–1393.

(本文责编 陈宏宇)