

· 研究报告 ·

基于融合双亲短肽提高葡萄糖氧化酶的热稳定性

任春慧^{1,4}, 张娟^{1,4}, 堵国成^{2,4}, 陈坚^{3,4}

- 1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122
- 4 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

任春慧, 张娟, 堵国成, 等. 基于融合双亲短肽提高葡萄糖氧化酶的热稳定性. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1106-1116.

Ren CH, Zhang J, Du GC, et al. Enhancing thermal stability of glucose oxidase by fusing amphiphilic short peptide. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1106-1116.

摘要: 葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, 简称 GOD) 可氧化葡萄糖生产葡萄糖酸及其衍生物, 在新型无抗饲料添加剂的开发中具有良好的应用潜力, 但其生产加工过程中尚存在热稳定差的瓶颈问题。本研究采用融合双亲短肽技术提高葡萄糖氧化酶的热稳定性, 分别选取 8 种不同氨基酸长度、不同 Linker 连接的双亲短肽 (Self-assembling peptides, SAPs) 融合至黑曲霉来源的葡萄糖氧化酶的 N 端, 构建了 8 种融合型酶 SAP1-GS-GOD、SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD、SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD、SAP7-PT-GOD, 并在毕赤酵母 GS115 中异源表达。获得的连接 PT Linker 的融合酶在 60 °C 下孵育 60 min 后的相对酶活均高于初始酶。其中, 融合酶 SAP5-PT-GOD 在 60 °C 下孵育 30 min 的相对酶活为 67%, 是相同处理条件下初始酶相对酶活的 10.9 倍。同时, 融合酶 SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD、SAP5-PT-GOD 的 K_{cat}/K_m 值较初始酶均有进一步的提高。研究表明, 在葡萄糖氧化酶的 N 端融合以 PT 为 Linker 的目标双亲短肽能有效提高葡萄糖氧化酶的热稳定性, 通过对融合酶分子内作用力进行分析, 酶分子内氢键的增加对融合酶热稳定性的提高效果最为显著。上述研究获得的热稳定性提高的融合葡萄糖氧化酶及其效果机制分析对提高酶在加工和应用过程中的活性具有重要的研究意义和应用价值。

关键词: 融合蛋白, 双亲短肽, 葡萄糖氧化酶, 热稳定性

Received: January 10, 2018; **Accepted:** February 26, 2018

Supported by: The Project of Jiangsu Province and Research Prospective Joint Research (No. BY2016022-39), National Natural Science Foundation of China (No. 31470160).

Corresponding authors: Juan Zhang. Tel: +86-510-85918309; E-mail: zhangj@jiangnan.edu.cn

Guocheng Du. E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

江苏省产学研前瞻性联合研究项目 (No. BY2016022-39), 国家自然科学基金 (No. 31470160) 资助。

网络出版时间: 2018-03-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180313.1733.002.html>

Enhancing thermal stability of glucose oxidase by fusing amphiphilic short peptide

Chunhui Ren^{1,4}, Juan Zhang^{1,4}, Guocheng Du^{2,4}, and Jian Chen^{3,4}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Glucose oxidase catalyzes the oxidation of β -D-glucose to gluconic acid and its derivatives, thus shows a great potential in the development of antibiotic-free feed. However, its production and processing still have the problem of poor thermal stability of enzyme activity. In this study, fusion of amphiphilic peptide technology was used to improve the stability of glucose oxidase. Herein, eight self-assembling peptides with different amino acid lengths and Linkers were fused to the N terminus of the glucose oxidase, yielding eight chimeric fusions SAP1-GS-GOD, SAP1-PT-GOD, SAP2-PT-GOD, SAP3-PT-GOD, SAP4-PT-GOD, SAP5-PT-GOD, SAP6-PT-GOD and SAP7-PT-GOD. Then, the 8 recombinant proteins were expressed in *P. pastoris* GS115. After separation and purification, the stability of glucose oxidase at 60 °C was determined. The relative enzyme activities of the PT Linker-linked fusion enzyme incubated at 60 °C for 60 min were higher than those of the original enzyme, and the relative activity of SAP5-PT-GOD was 67% at 60 °C for 30 min, which was 10.9 times higher than that of the initial enzyme with the same treatment. Among them, the K_{cat}/K_m value of SAP1-PT-GOD, SAP2-PT-GOD, SAP3-PT-GOD and SAP5-PT-GOD of the fusion enzyme was further improved than that of the initial enzyme. Through the analysis of the intramolecular force of the fusion enzyme, the increase of the thermal stability of the fusion enzyme is mainly due to the increase of the hydrogen bond. In summary, the study indicates that translational fusion of self-assembling peptides with PT Linker was able to augment the thermo-stability of glucose oxidase, which has certain potential in the production and application of glucose oxidase. The glucose oxidase with improved thermostability obtained in the above study and the related mechanism will play an important role in improving the activity of related enzymes in the proceeding of processing and application.

Keywords: fused protein, amphiphilic peptide, glucose oxidase, thermal stability

葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOD) 是同型二聚体结构, 每个亚基分为两个不同的结构域: 一个区域主要由 β -折叠组成, 以非共价键与黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 辅酶分子紧密结合; 另一个区域则由 4 个 α -螺旋支撑 1 个反平行的 β -折叠组成, 可与底物 β -D-葡萄糖结合^[1]。该酶能将 β -D-葡萄糖催化氧化成葡萄糖酸内酯与过氧化氢, 其中葡萄糖酸内酯能够在非酶促反应下转化成葡萄糖酸。葡萄糖氧化酶作为工业酶制剂中的重要成员之一, 在食品工业、生物传感器和酶生物燃料电池方面都有广泛应用^[2]。

近年来, 葡萄糖氧化酶作为替代抗生素的新型饲料酶制剂, 具有保护动物肠道、促进消

化吸收、提高动物机体免疫力等多种功能^[4]。目前, 用于饲料行业的葡萄糖氧化酶年需求量可达 30 万 t, 年总产值在 100 亿元以上, 其需求量也以每年 10%–30% 的速度逐年递增^[3]。饲料酶等添加剂的制作过程通常需要经过造粒工艺, 在该过程中会由于瞬间高温而对酶的活性造成影响。因此, 提高 GOD 的热稳定性, 可以有效降低催化反应过程中用于温度控制的水电能耗, 并提高 GOD 制剂化产品的酶活性能, 具有良好的应用前景。

目前, 提高酶热稳定性的方法主要有非理性设计 (如 DNA 改组、易错 PCR、体外随机重组等) 以及理性设计 (如借助计算机辅助设计突变位点

进行定点突变等)。Zheng 等利用定向进化提高了木聚糖酶的热稳定性,其最适温度也提高了 10 °C。Yuan 等通过增加南极假丝酵母脂肪酶催化活性中心位点的刚性来提高酶的热稳定性,利用迭代饱和突变,获得的突变体 D223G/L278M 在 48 °C 下半衰期增加为野生酶的 13 倍。但是,由于前者需要建立合适的高通量筛选方法,而后者需要对酶分子结构进行大量的计算模拟,均难以保障方法的高效性和普适性。双亲自组装肽 (Self-assembling peptides, SAPs) 是由相互交替的亲水性和疏水性氨基酸组成,能够聚集形成有序的纳米结构,主要应用于纳米技术领域、细胞培养和分子电子学。双亲自组装肽的功能取决于氨基酸序列的排列顺序、肽链的长度及其所处环境的理化条件,从而形成各种纳米结构,包括纳米囊泡、纳米管和纳米阀门。近年来,利用 SAPs 改造酶特性的尝试引起了广泛的关注。Liu 等在脂肪氧合酶的 N 端融合酿酒酵母 Zuotin 蛋白等来源的 6 种自组装双亲短肽 (SAPs),使该酶在 55 °C 的半衰期提高了 2.3–4.5 倍。进一步的研究表明,Linker 的种类对融合酶的性质也有较大的影响^[6]。

前人研究表明,毕赤酵母具有翻译后修饰的潜力,并与蛋白质折叠加工、二硫键的形成、特定类型脂质的添加和 O-端与 N-端糖基化有关,它不仅克服了原核表达系统背景蛋白多、不能表达结构复杂的蛋白质、表达质粒易丢失等缺陷,同时还弥补了高等真核表达系统操作复杂、表达水平低和产业化生产成本高的不足,具有其他酵母表达系统无法比拟的优越之处。在本研究前期的研究中,Gu 等已成功将 GOD 基因在毕赤酵母中表达,同时通过模块化策略获得了高产 GOD 的菌株,在 3 L 罐上发酵酶活达到 1 972.9 U/mL,是目前报道的 GOD 的最高酶活水平,本研究是之前研究的延续和深化。本研究选择了 8 种 SAPs,融合于 GOD 的 N 端,在毕赤酵母中进行了异源

表达。与之前研究中仅用于大肠杆菌表达系统的融合双亲短肽重组酶相比,本研究中以真核生物毕赤酵母作为表达宿主,这对融合酶热稳定性提升策略而言是一次有效的尝试,另外,研究获得的热稳定性提高的 GOD 融合酶对拓展新型无抗饲料的应用功效亦具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115, 重组质粒 pPIC9k-GOD。

1.1.2 主要试剂

实验中所用的限制性内切酶 *Sna*B I、*Not* I 购自 Thermo 公司。Prime STAR (HS) DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司。SDS-PAGE 凝胶试剂盒、蛋白电泳 marker 购自碧云天公司。实验所用蛋白胨、酵母粉为 Oxoid 公司购买。筛菌所用遗传霉素 G418 购自上海生物工程有限公司,引物合成及测序也均由上海生工有限公司完成。其他常规试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl, pH 7.0。

YPD: 10 g/L 酵母膏, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 葡萄糖。

MD: 13.4 g/L YNB, 0.4 mg/L 生物素, 20 g/L 葡萄糖。

BMGY: 10 g/L 酵母膏, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 甘油, 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), 13.4 g/L YNB, 0.4 mg/L 生物素。

BMMY: 10 g/L 酵母膏, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 甲醇, 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), 13.4 g/L YNB, 0.4 mg/L 生物素。

YPD-G418 :YNB 13.4 g/L ,生物素 0.4 mg/L ,葡萄糖 20 g/L。添加遗传霉素 0.25、1.00、2.00、3.00、4.00 mg/mL ,用于阳性转化子拷贝数的筛选。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母工程菌 *Pichia pastoris* GS115 (pPIC9K-SAPs-GOD) 的构建

SAPs 的编码基因由江南大学刘松老师惠赠 ,编码基因序列如表 1 所示。同时 ,针对 SAP1 的 3'端分别引入 GS 基因和 PT 基因 ,针对 SAP2、SAP3、SAP4、SAP5、SAP6 和 SAP7 其 3'端均引入 PT 基因。GS 基因和 PT 基因序列见表 2。

用表 3 中引物扩增 SAP1-GS-GOD、SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD、SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD、SAP7-PT-GOD 基因 ,通过在引物 5'和 3'端引入线性化 pPIC9k-GOD 载体末端的同源序列 ,使得插入片段扩增产物的 5'和 3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列 (15 bp) ,其中使用 *Sna*B I 酶切线性化载体。

表 1 双亲短肽的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of the self-assembling peptides

SAPs	Amino acid sequence
SAP1	AEAEAKAKAEAEAKAK
SAP2	AEAEAKAKAEAEAKAKAEAEAKAKAE AEAKAKAEAEAKAKAEAEAKAK
SAP3	AEAEAHAAEAEAHAAH VNYGNGVSCSKTKAPTGARHNSKNVILP
SAP4	EPTALFLVSPALLVRVASAVAHLLRRRP RPRRPRLRP DWLKAFYDKVAEKLKEAFKVEPLRAD
SAP5	WLKAFYDKVAEK LKEAF DWLKAFYDKVAEKLKEAFGLLPVLED
SAP6	WLKAFYDKVAEK LKEAF DWLKAFYDKVAEKLKEAFNGGARLAD
SAP7	WLKAFYDKVAEKLKEAF

Note: the linker sequences between the same SAP are marked out of the underline.

表 2 Linker 的种类及特性

Table 2 Types and characteristics of the linker

Linker	Amino acid sequence	Characteristics
PT linker	PTPPTTPTPPTTPTPTP	Rigid
GS linker	GGGSGGGSGGGGS	Flexible

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SAP1-GS-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGCAGAAGCAGAAGCGAAAAGC</u>
SAP1-GS-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP1-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGCAGAAGCAGAAGCGAAAAGC</u>
SAP1-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACAGATCCACCTCCACCAGAACC</u>
SAP2-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACCATCATCATCATCATGCAGAA</u>
SA2P-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP3-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACCATCATCATCATCATGCAGAA</u>
SAP3-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP4-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGTGAATTACGGTAACGGCGTT</u>
SAP4-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP5-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGATTGGCTGAAGGCTTTTTATGA</u>
SAP5-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP6-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGATTGGCTGAAGGCTTTTTATGA</u>
SAP6-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>
SAP7-PT-F	<u>GAGGCTGAAGCTTACGATTGGCTGAAGGCTTTTTATGA</u>
SAP7-PT-R	<u>TTCAATGCCATTTACTGGGGTCGGAGTCGGG</u>

Note: the underlined part of the table is the homologous arm sequence that is consistent with the two terminal sequence of the linearized vector.

将用 *Sna*B I 酶切线性化载体和要插入的短肽的序列利用一步克隆法进行同源重组, 重组的反应体系见表 4。其中, SAPs-GOD 融合表达质粒的构建如图 1 所示。

将重组后的质粒 pPIC9k-SAPs-GOD 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 将转化后的菌液涂布到含有氨苄青霉素的固体 LB 平板中培养。菌落 PCR 验证呈阳性的克隆菌株, 提取其质粒送到上海生物工程有限公司进行测序。将上述构建得到的重组质粒 pPIC9k-SAPs-GOD 用快切酶 *Bgl* II 线性化, 将线性化之后的质粒按照毕赤酵母转化手册进行转化。

1.2.2 重组菌的发酵

挑取转化后 MD 板上的转化子 25 个到含 G418 抗性的 YPD 平板上 (G418 抗性浓度梯度为 1、2、3、4 mg/mL), 挑取 4 mg/mL 浓度的抗性 YPD 板上的重组菌 5–10 个进行摇瓶发酵。

种子培养: 挑取 YPD 平板上的单菌落到 25 mL YPD 液体培养基 (250 mL 摇瓶) 中于

30 °C、220 r/min 条件下培养 18–20 h。

摇瓶发酵: 将种子液按 10% 接入 50 mL BMGY 培养基中 (500 mL 摇瓶), 30 °C、220 r/min 培养 24 h, 将所有菌体离心并用等体积生理盐水洗涤 2 遍, 离心, 将全部菌体转入到 BMMY 培养基中。BMMY 培养基初始甲醇添加量为 1%, 在 30 °C、220 r/min 条件下诱导产酶, 之后每 24 h 添加 1% 的甲醇, 同时每隔 24 h 取少量样品进行酶活力测定。

表 4 线性化质粒与短肽序列融合的反应体系
Table 4 The reaction system for the linearized plasmids and the short peptides

Reaction system	Amount
5 \times CE II Buffer	2 μ L
Linearized pPIC9k-GOD	221 ng
SAPs	20 ng
Exnase TM II	1 μ L
ddH ₂ O	Add water to 10 μ L

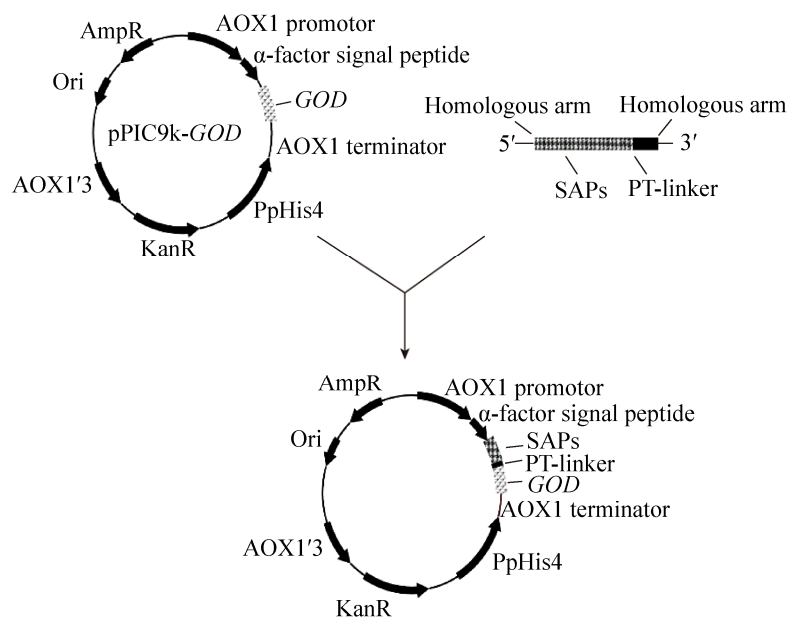


图 1 pPIC9k-SAPs-GOD 重组表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of pPIC9k-SAPs-GOD.

1.2.3 葡萄糖氧化酶的纯化

将发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清。将上清液用 25 kDa 的透析袋在 0 °C Tris-HCl 缓冲液中透析过夜。将透析后所得的酶液用 HitrapTM Q HP 柱纯化。使用 AKTA 蛋白纯化仪进行蛋白分离纯化, 柱纯化条件如下: 用 10 倍柱体积的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.0) 平衡阴离子柱, 并以 1 mL/min 的流速进样; 等待进样结束后, 使用 5 个柱体积的缓冲液 A 冲平柱子; 并以 0-100% 的缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl+100 mmol/L NaCl 缓冲液, pH 7.0) 以 3 mL/min 的流速进行线性洗脱。在 60-80 mmol/L NaCl 浓度时出现紫外吸收峰, 对出现紫外吸收峰的样品进行收集, 测定酶活, 并于 4 °C 条件下保存酶液。

1.2.4 葡萄糖氧化酶酶活的测定

葡萄糖氧化酶 GOD 酶活的测定: 先后加入 2.5 mL 邻联茴香胺、0.3 mL 18% 葡萄糖、0.1 mL 辣根过氧化物酶, 于 35 °C 条件下保温 2 min, 然后加入 0.1 mL 酶液, 35 °C 条件下反应 3 min, 并用 2 mol/L 的硫酸终止反应。其中酶活测定过程中所需各溶液的配制如下: 1) 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0): 一水合柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 3.95 g/L, 二水合柠檬酸钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 23.82 g/L, 调节 pH 为 6.0; 2) 邻联茴香胺溶液: 1 g 邻联茴香胺加在 100 mL 甲醇中搅拌溶解制成浓缩存储液。现用现配, 取 0.1 mL 浓缩液加入到上述柠檬酸缓冲液 12 mL 中混匀; 3) 18% 葡萄糖水溶液: 葡萄糖 180 g/L; 4) 辣根过氧化物酶液: 根据不同产品实际稀释至 100 U/mL。

葡萄糖氧化酶 GOD 酶活的定义: 每分钟转化 1 μ mol 葡萄糖为葡萄糖酸和过氧化氢所需的酶量为一个单位, 用 U 表示。其中葡萄糖氧化酶酶活的计算方法如下:

$$X = [\Delta A \div (7.5 \times t \times 0.1)] \times 5 \times n$$

其中, X 表示酶活, 单位为 U/mL; ΔA 表示 500 nm 吸光值; t 表示酶活测定时间, 单位为 min; 0.1 表示样品体积, 单位为 mL; 5 表示终反映体积, 单位为 mL; 7.5 表示消光系数, 单位为 1/m; n 表示稀释倍数。

1.2.5 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析使用碧云天试剂盒 SDS-PAGE 预制胶, 方法参照使用说明书。并使用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

1.2.6 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定使用碧云天 Bradford 试剂盒, 方法参照使用说明书。同时通过酶活和蛋白浓度计算出葡萄糖氧化酶的比酶活。

1.2.7 葡萄糖氧化酶最适反应温度和温度稳定性的测定

最适反应温度的测定: 将纯化后的 GOD 酶液置于相同的测定体系中, 在不同的温度 (20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、80 °C) 条件下, 测定其酶活。并将最高酶活值作为 100%。

温度稳定性的测定: 将纯化后的 GOD 酶液分别在 60 °C 条件下热浴 60 min, 每隔 10 min 测定其相对酶活。将未热浴处理的酶活作为 100%。

1.2.8 葡萄糖氧化酶最适反应 pH 和 pH 稳定性的测定

最适反应 pH 的测定: 将纯化后的 GOD 酶液置于相同的测定体系中, 在 pH 2.0-9.0 (pH 2.0-8.0 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, pH 9.0 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液) 条件下, 测定其酶活。并将最高酶活值作为 100%。

pH 稳定性的测定: 将纯化后的 GOD 酶液分别在 pH 2.0-9.0 条件下于 35 °C 保温处理 1 h, 并测定其相对酶活。将最高酶活值作为 100%。

1.2.9 葡萄糖氧化酶动力学参数的测定

葡萄糖氧化酶 GOD 动力学参数的测定按照

乒乓机制的双底物 (β -D-葡萄糖和氧气) 反应进行。GOD 在氧化反应中可以催化不同底物, 如氧、醌类物, 而在还原反应中对底物 β -D-葡萄糖专一性严格。本研究在测定动力学常数时, 反应体系中的氧使用对苯醌代替。反应中葡萄糖底物的浓度范围为 0–200 mmol/L, 对苯醌底物浓度范围为 0–10 mmol/L。利用乒乓反应动力学方程双倒数作图法求出酶的动力学参数。本研究中的酶学常数均是针对葡萄糖底物作为主要研究对象。动力学方程如下:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{mA} \cdot B + K_{mB} \cdot A + A \cdot B}$$

公式中: V_{\max} 代表最大反应速率; A 与 B 分别代表底物葡萄糖和对苯醌; K_{mA} 与 K_{mB} 分别代表对葡萄糖和对苯醌的米氏常数。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖氧化酶与双亲短肽融合酶的制备

双亲自组装肽 (Self-assembling peptides, SAPs) 由相互交替的亲水性和疏水性氨基酸形成, 能够聚集形成有序的纳米结构。本研究选用常见的 GS 柔性 Linker 和 PT 刚性 Linker, 首先将 SAP1 分别与柔性 Linker 和刚性 Linker 进行连接, 然后与 GOD 进行融合。将这两株重组菌进行发酵, 并将发酵液进行纯化, 测定其相关酶学性质, 发现连

接柔性 Linker 时融合酶的热稳定性较连接刚性 Linker 时差, 因此在之后的改造研究中, 将 SAPs 均与刚性 Linker PT 进行连接。

将初始酶与融合酶的发酵上清进行分离纯化, 使用阴离子柱 Hitrap™ Q HP 对其进行纯化, 在 60–80 mmol/L NaCl 浓度时出现紫外吸收峰, 并对出现紫外吸收峰的样品进行收集。SDS-PAGE 结果如图 2 所示。

2.2 融合酶动力学参数分析

为了研究融合双亲短肽对重组葡萄糖氧化酶的影响, 本研究考察了各个融合酶的动力学参数。如表 5 所示, 融合酶 SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD、SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 的 K_m 值较初始酶均明显降低, 其中 SAP2-PT-GOD 最为显著, K_m 值仅为初始酶的 56%。同时, 融合酶 SAP2-PT-GOD、SAP5-PT-GOD 的催化效率较初始酶提高最为显著, 较初始酶分别提升了 40% 和 27%。

2.3 融合 SAPs 对葡萄糖氧化酶最适反应温度及其温度稳定性的影响

为了测定初始 GOD 和融合酶最适反应温度及其热稳定性的差异, 我们选择温度梯度 20 °C–80 °C 测定其最适温度, 并于 60 °C 进行热处理 60 min, 测定其耐高温的能力。如图 3A 所示,

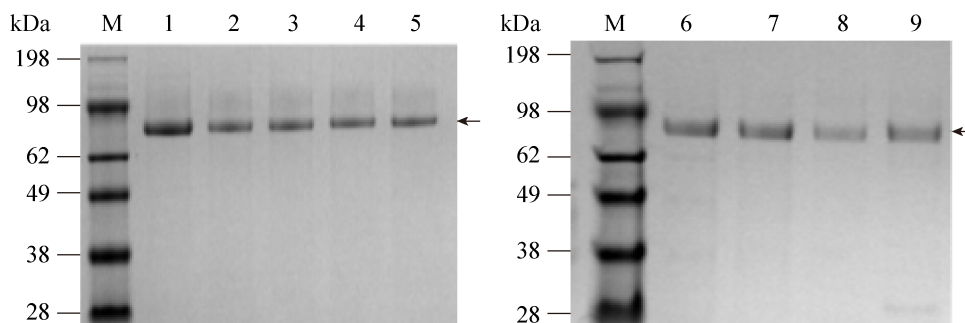


图 2 GOD 纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified GOD. M: molecular weight standard of protein; lane 1: initial enzyme; lane 2: SAP1-GS-GOD; lane 3: SAP1-PT-GOD; lane 4: SAP2-PT-GOD; lane 5: SAP3-PT-GOD; lane 6: SAP4-PT-GOD; lane 7: SAP5-PT-GOD; lane 8: SAP6-PT-GOD; lane 9: SAP7-PT-GOD.

融合酶 SAP1-GS-GOD 的最适温度为 30 °C, SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD 融合酶和初始酶的最适温度均为 35 °C, SAP4-PT-GOD 的最适温度为 40 °C, SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 和 SAP7-PT-GOD 的最适温度为 45 °C。由图 3B 可得,将初始酶和融合酶在 60 °C 条件下处理 60 min,60 min 后连接 PT Linker 的融合酶的酶活残留较初始酶均有所提高,只有连接 GS Linker 的融合酶的酶活残留较初始酶降低。其中,融合酶 SAP5-PT-GOD 在

60 °C 热处理 30 min 后,其残留酶活为 67%,是相同热处理条件下初始酶的 10.9 倍。其他融合酶 SAP1-PT-GOD、SAP2-PT-GOD、SAP3-PT-GOD、SAP4-PT-GOD、SAP6-PT-GOD、SAP7-PT-GOD 在 60 °C 热处理 30 min 后,相对初始酶的残留酶活分别提高了 1.8、2.0、1.7、2.6、3.8 和 2.6 倍。综上,通过对比 SAP1-GS-GOD 和 SAP1-PT-GOD,可以看出双亲短肽与酶之间连接刚性 Linker PT 在热稳定性方面要比连接柔性 Linker GS 效果好。

表 5 初始酶及融合酶的比酶活和动力学常数

Table 5 Kinetic parameters and specific activities of initial GOD and fusion enzymes

Enzyme	V_{\max} (mmol/(L·mg·s))	K_m (mmol/L)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m (mmol/(L·s))
Initial enzyme	5.52±0.28	33.77±1.55	577.13±1.10	17.09
SAP1-GS-GOD	1.95±0.11	20.42±1.78	272.68±1.24	13.35
SAP1-PT-GOD	4.05±0.26	19.08±1.87	357.67±2.21	18.74
SAP2-PT-GOD	2.93±0.21	20.96±1.67	499.56±1.31	23.83
SAP3-PT-GOD	1.98±0.13	20.62±1.72	395.36±2.09	19.17
SAP4-PT-GOD	2.13±0.16	32.00±1.70	478.40±1.62	14.82
SAP5-PT-GOD	2.85±0.22	20.68±1.54	447.45±1.29	21.64
SAP6-PT-GOD	1.94±0.09	27.18±1.13	400.05±1.70	14.72
SAP7-PT-GOD	1.88±0.26	33.95±1.21	449.11±2.27	13.23

Note: the kinetic constants of these enzymes are all directed towards substrate glucose. The kinetic parameters of the enzyme are the average of the 3 experimental results, and the error is less than 5%.

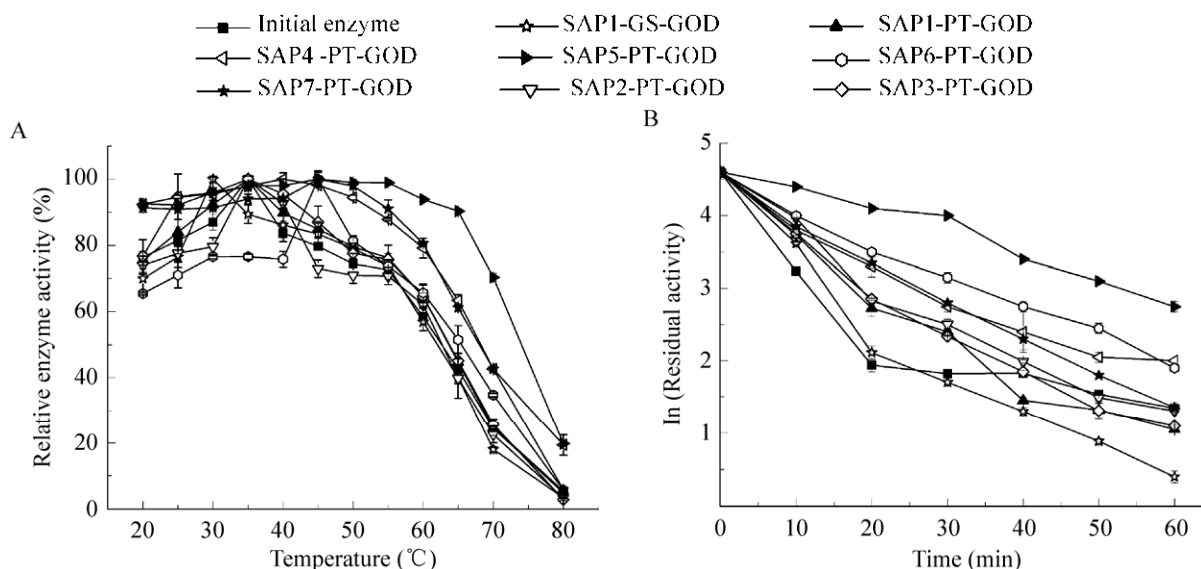


图 3 温度对初始 GOD 与 SAPs-GOD 融合酶的活性 (A) 与稳定性 (B) 的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the activity and stability of initial GOD and SAPs-GOD. (A) Effects of temperature on the activity of initial GOD and SAPs-GOD. (B) Effects of 60 °C on the stability of initial GOD and SAPs-GOD.

2.4 融合 SAPs 对葡萄糖氧化酶最适反应 pH 及其 pH 稳定性的影响

由图 4A 可知, 融合酶与初始酶的最适 pH, 均为 6.0, 但融合酶 pH 的范围有所拓宽。通过对比 SAP1-GS-GOD 和 SAP1-PT-GOD (图 4 B), 可以看出双亲短肽与酶之间连接刚性 Linker PT 在 pH 稳定性方面要比连接柔性 Linker GS 效果好。连接刚性 Linker PT 的融合酶在 pH 4.0–6.0 的范围内, 其相对酶活均在 90% 以上, 明显高于初始酶。

2.5 融合 SAPs 对葡萄糖氧化酶热稳定性提高的机制

根据前人研究, 将短肽融合到酶的 N 端或 C 端提高酶分子稳定性的机制主要为: 分子局部刚性增加和酶分子的寡聚作用^[15]。本研究使用 PIC 在线服务器分析了融合酶 SAPs-GOD 分子内作用力的变化 (表 6)。根据表 6 结果可以看出, 融合酶 SAP2-PT-GOD 中的疏水相互作用较初始酶增加了 2 个, SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 和 SAP7-PT-GOD 中的疏水相互作用较

初始酶均增加了 6 个。根据已有研究, 疏水性是蛋白质单体发生聚集的主要作用力。此外, 大量关于嗜热蛋白的研究表明, 寡聚能够增强蛋白质单体间的相互作用并固定 N 端、C 端及高柔性 loop, 从而提高蛋白质的热稳定性。因此, 本研究认为短肽自身的疏水性使融合酶发生不同程度的寡聚, 从而导致了融合酶热稳定性的增加。另外, SAP2-PT-GOD 分子中的总氢键较初始酶增加了 3 个, SAP1-GS-GOD 分子中的总氢键较初始酶降低了 2 个, SAP1-PT-GOD 和 SAP3-PT-GOD 融合酶中的总氢键没有变化, SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 和 SAP7-PT-GOD 融合酶中的总氢键较初始酶有所下降。通过对融合酶和初始酶氢键类型与数目变化的具体分析, SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 和 SAP7-PT-GOD 融合酶中主链与主链之间的氢键较初始酶增加了 19 个, 其他种类的氢键数目均有不同程度的下降, 对照 2.3 中的结果, 这 4 种酶的热稳定性提高最为明显。因此, 融合酶中主链与主链

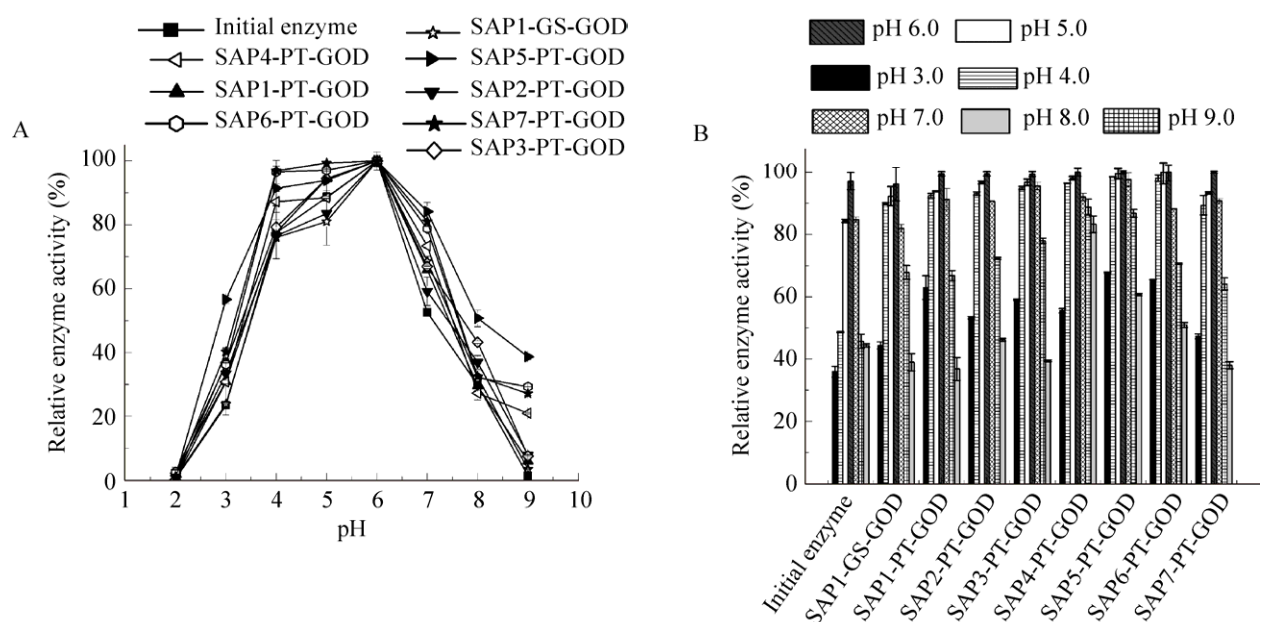


图 4 pH 对初始 GOD 与 SAPs-GOD 融合酶的活性(A)和稳定性(B)的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity and stability of initial GOD and SAPs-GOD. (A) Effects of pH on the activity of initial GOD and SAPs-GOD. (B) Effects of pH on the stability of initial GOD and SAPs-GOD.

表 6 初始 GOD 及 SAPs-GOD 融合酶分子内作用力分析

Table 6 Analysis of intramolecular interaction of initial GOD and SAPs-GOD fusion enzymes

Intramolecular force	Initial enzyme	SAP1-GS-GOD	SAP1-PT-GOD	SAP2-PT-GOD	SAP3-PT-GOD	SAP4-PT-GOD	SAP5-PT-GOD	SAP6-PT-GOD	SAP7-PT-GOD
Hydrophobic interaction	501	501	501	503	501	507	507	507	507
Main chain-main chain hydrogen bonds	600	596	600	598	600	619	619	619	619
Main chain-side chain hydrogen bonds	286	294	286	296	286	272	272	272	272
Side chain-side chain hydrogen bonds	281	275	281	276	281	243	243	243	243
Ionic interactions	45	45	45	46	45	44	44	44	44
Disulfide bonds	1	1	1	1	1	1	1	1	1

之间氢键的增加是这几种融合酶热稳定性增加的主要原因,其他类型氢键对融合酶的热稳定性影响不大。以上结果分析表明,分子内作用力的改变可能是融合酶热稳定性提高的原因,其中分子内疏水相互作用及主链与主链之间的氢键的增加对本研究中融合酶热稳定性的影响最为显著^[24-25]。

另外,SAP1-GS-GOD 和 SAP1-PT-GOD 的 Linker 分别为柔性和刚性,使用刚性的 Linker 更有利于 GOD 热稳定性的提高。对于由刚性 Linker PT 连接的 7 种融合酶,SAP2-PT-GOD、SAP4-PT-GOD、SAP5-PT-GOD、SAP6-PT-GOD 和 SAP7-PT-GOD 的热稳定性较 SAP1-PT-GOD、SAP3-PT-GOD 提高得多,表明融合短肽的长度可能是影响热稳定性的另一重要因素,且连接的双亲短肽其氨基酸长度越长融合酶热稳定性提升越多^[15]。

3 讨论

随着葡萄糖氧化酶在食品、医药、饲料等领域越来越多的应用,由于在工业化大规模生产及应用过程中,温度的调控具有迟滞性,同时酶的制剂化过程中对酶的活性造成较大程度的损害。因此提高葡萄糖氧化酶的热稳定性具有重大的意义。本研究利用自组装双亲短肽融合到葡萄糖氧

化酶的 N 端,有效地提高了葡萄糖氧化酶的热稳定性,同时对于其 pH 稳定性也有一定程度的提高。研究表明,连接 PT Linker 的融合酶的热稳定性较连接 GS Linker 高,双亲短肽的氨基酸序列越长融合酶的热稳定性越高。综上所述,通过调整双亲短肽连接 Linker 的种类以及短肽氨基酸序列的长度,可以获得热稳定性显著提高的融合酶。此外,相较之前仅以大肠杆菌等原核生物作为表达宿主进行的研究,本研究将真核生物毕赤酵母作为表达宿主,对应用双亲短肽融合技术提高真核生物外源蛋白表达的酶学稳定性具有一定的理论意义和应用价值。

REFERENCES

- [1] Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, et al. Glucose oxidase—an overview. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 489–501.
- [2] Dubey MK, Zehra A, Aamir M, et al. Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1032.
- [3] Blazic M, Kovacevic G, Prodanovic O, et al. Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases. *Protein Expr Purif*, 2013, 89(2): 175–180.
- [4] Zhang HL, Li J. Enzyme preparation feed additive—glucose

- oxidase. *Chin Feed Addit*, 2014(9): 15–16, 19 (in Chinese). 张洪丽, 李娟. 酶制剂类饲料添加剂——葡萄糖氧化酶. *中国饲料添加剂*, 2014(9): 15–16, 19.
- [5] Huo F, Song DZ, Tang SW. Application of glucose oxidase in feed. *Feed and Husbandry*, 2014(4): 37–40 (in Chinese). 霍芳, 宋道祯, 汤少伟. 葡萄糖氧化酶在饲料中的应用进展. *饲料与畜牧*, 2014(4): 37–40.
- [6] Fang JC, You RQ, Song C, et al. Production of glucose oxidase and its application in feed industry. *Feed Rev*, 2015(10): 1–7 (in Chinese). 方军成, 尤瑞祺, 宋聪, 等. 葡萄糖氧化酶的生产及其在饲料工业中的应用. *饲料博览*, 2015(10): 1–7.
- [7] Yu HR, Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2): 308–315.
- [8] Dend ZM, Yang HQ, Shin HD, et al. Structure-based rational design and introduction of arginines on the surface of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* for improved thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(21): 8937–8945.
- [9] Fang ZM, Zhou P, Chang F, et al. Structure-based rational design to enhance the solubility and thermostability of a bacterial laccase Lac15. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e102423.
- [10] Padilla-Martínez SG, Martínez-Jothar L, Sampedro JG, et al. Enhanced thermal stability and pH behavior of glucose oxidase on electrostatic interaction with polyethylenimine. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75: 453–459.
- [11] Zheng HC, Liu YH, Sun MZ, et al. Improvement of alkali stability and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* Family-11 xylanase by directed evolution and site-directed mutagenesis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(1): 153–162.
- [12] Xie Y, An J, Yang GY, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7994–8006.
- [13] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357–1369.
- [14] Fatouros DG, Lamprou DA, Urquhart AJ, et al. Lipid-like self-assembling peptide nanovesicles for drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(11): 8184–8189.
- [15] Lu XY, Liu S, Zhang DX, et al. Enhanced thermal stability and specific activity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxigenase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(21): 9419–9427.
- [16] Zhao HL, Yao XQ, Xue C, et al. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon- α 2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expr Purif*, 2008, 61(1): 73–77.
- [17] Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of Tf-based fusion proteins. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 523–528.
- [18] Mu QX, Hu MR, Chen F, et al. High-level production of glucose oxidase by recombinant *Pichia pastoris* using a combined strategy. *Chin J Biotech*, 2016, 32(7): 986–990 (in Chinese). 牟庆璇, 胡美荣, 陈飞, 等. 采用混合策略提高葡萄糖氧化酶在毕赤酵母中的表达水平. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 986–990.
- [19] Shen YN, Gu L, Zhang J, et al. Effects of mixed carbon sources on glucose oxidase production by recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(7): 927–936 (in Chinese). 沈伊娜, 顾磊, 张娟, 等. 双碳源流加对重组毕赤酵母高效表达葡萄糖氧化酶的影响. *生物工程学报*, 2013, 29(7): 927–936.
- [20] Gu L, Zhang J, Liu BH, et al. High-level extracellular production of glucose oxidase by recombinant *Pichia pastoris* using a combined strategy. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(3): 1429–1447.
- [21] Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase. *Food Bioprocess Technol*, 2009, 2(4): 344–352.
- [22] Fung SY, Yang H, Bhole PT, et al. Self-assembling peptide as a potential carrier for hydrophobic anticancer drug ellipticine: complexation, release and *in vitro* delivery. *Adv Funct Mater*, 2009, 19(1): 74–83.
- [23] Ge J, Lu DN, Yang C, et al. A lipase-responsive vehicle using amphipathic polymer synthesized with the lipase as catalyst. *Macromol Rapid Commun*, 2011, 32(6): 546–550.
- [24] Takano K, Okamoto T, Okada J, et al. Stabilization by fusion to the C-terminus of hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii* RNase HI: a possibility of protein stabilization tag. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e16226.
- [25] Pearce FG, Dobson RCJ, Jameson GB, et al. Characterization of monomeric dihydrodipicolinate synthase variant reveals the importance of substrate binding in optimizing oligomerization. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(12): 1900–1909.

(本文责编 陈宏宇)