



## 研究报告

## N-糖基化对一种新型重组耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶(ReTMan26)稳定性的影响

罗长财<sup>1</sup> 缪静<sup>2</sup> 李国莹<sup>1</sup> 杜瑶<sup>1</sup> 余晓斌<sup>\*1</sup>

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 鲁东大学生命科学学院 山东 烟台 264025

**摘要:**【背景】对来源于嗜热枯草芽孢杆菌(TBS2)的一种新型重组耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶(ReTMan26)基因序列进行分析,该基因中含有3个N-糖基化位点(N8、N26与N255),经毕赤酵母表达时可进行N-糖基化修饰。【目的】确定N-糖基化对ReTMan26稳定性的影响。【方法】通过构建ReTMan26蛋白质三维结构模型,初步分析N-糖基化对该酶稳定性的影响。在此基础上,利用天然蛋白去糖基化试剂盒除去ReTMan26的N-多糖链,获得去除N-糖基化的耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶(ReTMan26-DG),并对纯化后的ReTMan26及ReTMan26-DG进行相应的稳定性对比检测。【结果】ReTMan26与ReTMan26-DG的最适反应pH均为6.0,但在pH 1.5–9.0范围内,ReTMan26的稳定性比ReTMan26-DG有小幅提高。ReTMan26的最适反应温度为60 $^{\circ}\text{C}$ ,比ReTMan26-DG高5 $^{\circ}\text{C}$ ;ReTMan26经100 $^{\circ}\text{C}$ 处理10 min,剩余酶活为58.6%,而ReTMan26-DG经93 $^{\circ}\text{C}$ 处理10 min,剩余酶活为58.2%,100 $^{\circ}\text{C}$ 处理10 min则完全失活。经胃蛋白酶及胰蛋白酶在37 $^{\circ}\text{C}$ 处理2 h后,ReTMan26的剩余酶活分别为70.5%及91.2%,比ReTMan26-DG分别提高了23.7%及25.6%。【结论】N-糖基化可提高ReTMan26的pH稳定性、耐热稳定性及抗蛋白酶消化性能。

关键词: N-糖基化, 重组耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶, 纯化, 稳定性

## Effect of N-glycosylation on the stability of a novel recombinant thermostable $\beta$ -mannanase (ReTMan26)

LUO Zhang-Cai<sup>1</sup> MIAO Jing<sup>2</sup> LI Guo-Ying<sup>1</sup> DU Yao<sup>1</sup> YU Xiao-Bin<sup>\*1</sup>

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

2 School of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China

**Abstract:** [Background] Based on the sequence analysis of a novel recombinant highly thermostable  $\beta$ -mannanase (ReTMan26) from a thermophilic *Bacillus subtilis* (TBS2), there are 3 N-glycosylation sites (N8, N26 and N255) in the encoding gene of ReTMan26, and ReTMan26 could be N-glycosylated when expressed by *Pichia pastoris*. [Objective] To determine the effects of N-glycosylation on the stability of

**Foundation item:** National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-11)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-510-85918167; E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

**Received:** 14-03-2018; **Accepted:** 18-05-2018; **Published online:** 06-06-2018

**基金项目:** 国家轻工技术与工程一流学科课题资助项目(LITE2018-11)

**\*通信作者:** Tel: 0510-85918167; E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:** 2018-03-14; **接受日期:** 2018-05-18; **网络首发日期:** 2018-06-06

ReTMan26. **[Methods]** Through constructing the three-dimensional structure models, the effects of N-glycosylation on the stability of ReTMan26 were analyzed. Then, the N-deglycosylated ReTMan26 (ReTMan26-DG) was obtained using Native Protein Deglycosylation Kit. After purification, the differences of enzymatic stability between ReTMan26 and ReTMan26-DG were determined. **[Results]** The optimum reaction pH of ReTMan26 was 6.0, identical with that of ReTMan26-DG, and pH stability of ReTMan26 was slightly higher than that of ReTMan26-DG in pH range between 1.5 and 9.0. The optimum temperature of ReTMan26 was 60 °C, 5 °C higher than that of ReTMan26-DG. ReTMan26 retained 58.6% of its maximum activity after treatment at 100 °C for 10 min. However, ReTMan26-DG retained 58.2% residual activity after treatment at 93 °C and was completely inactivated after treatment at 100 °C for 10 min. After treatment with trypsin or pepsin at 37 °C for 2 h, ReTMan26 retained 91.2% and 70.5% of its baseline activity, 23.7% and 25.6% higher than ReTMan26-DG, respectively. **[Conclusion]** N-glycosylation could improve the stability of ReTMan26 at different pH, high-temperature and the resistance to digestive proteases.

**Keywords:** N-glycosylation, Recombinant thermostable  $\beta$ -mannanase, Purification, Stability

$\beta$ -甘露聚糖酶(EC3.2.1.78)是一种能催化 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键降解的糖苷水解酶,被广泛用于饲料、食品加工、纺织、造纸、生物能源等领域<sup>[1-2]</sup>。由于饲料制粒及生物能源生产等环节涉及到高温处理过程,易使酶失活<sup>[3-4]</sup>,因此,提高 $\beta$ -甘露聚糖酶的耐高温性能亟待解决。

为开发一种具有优良耐高温性能的 $\beta$ -甘露聚糖酶,从热泉中筛选出一株嗜热枯草芽胞杆菌(TBS2),该菌产生的 $\beta$ -甘露聚糖酶(BS-Man)在90 °C处理10 min后酶活仍保留63.6%,但其发酵水平低,难以实现工业化生产<sup>[5]</sup>。由于毕赤酵母具有表达量高、操作简单、能对蛋白进行翻译后修饰等优点,被广泛用于外源蛋白的表达<sup>[6-7]</sup>。为此,将该酶基因从TBS2中克隆并在毕赤酵母X33中实现了高效表达,经鉴定该酶属于糖苷水解酶26家族(GH26),是一种新型耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶<sup>[8]</sup>。检测发现,由毕赤酵母表达的重组耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶(ReTMan26)的耐高温性能比BS-Man有较大幅度的提高。进一步分析发现,ReTMan26序列中存在3个N-糖基化位点(N8、N26及N255)。N-糖基化是毕赤酵母进行翻译后修饰的一种主要形式<sup>[9]</sup>,当表达的蛋白中含有N-糖基化位点时,毕赤酵母就可能对其进行N-糖基化修饰<sup>[10-11]</sup>,因此推测ReTMan26耐高温性能的提高可能与N-糖基化存在一定的

关联。

本研究通过构建ReTMan26蛋白质三维结构模型,初步分析了N-糖基化在蛋白结构中的位置及其作用,然后采用天然蛋白去糖基化试剂盒对ReTMan26进行脱N-糖基化处理,并对脱N-糖基化前后的ReTMan26进行了纯化及对比测试,以确定N-糖基化对该酶的pH稳定性、耐热稳定性及抗消化蛋白酶性能的影响,便于今后进行更深入的研究和开发。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

(1)天然菌株TBS2:从水温高于68 °C的热泉中筛选出的一株产耐高温 $\beta$ -甘露聚糖酶BS-Man的嗜热枯草芽胞杆菌(Thermophilic *Bacillus subtilis*)<sup>[5]</sup>。

(2)重组毕赤酵母*Orig-pPICZaA-X33*:以TBS2为出发菌株,通过基因克隆、电转化毕赤酵母X33感受态细胞,筛选获得的一株用于生产ReTMan26的重组毕赤酵母<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 主要试剂和培养基

槐豆胶、天然蛋白去糖基化试剂盒(NDEGLY)购自Sigma-Aldrich公司;酵母粉、胰蛋白胍购自Oxoid公司;其余试剂均为国产分析纯。

TBS2 发酵培养基(g/L): 魔芋精粉 20.0, 硫酸铵 10.0, 硝酸钠 5.0, 七水硫酸镁 2.5, 磷酸二氢钾 1.5, 初始 pH 6.5。

YPD 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母粉 10.0, 葡萄糖 20.0。

BSM 培养基: 85%磷酸 26.7 mL, 硫酸钾 18.2 g, 七水硫酸镁 14.9 g, 氢氧化钾 4.13 g, 二水硫酸钙 0.9 g, 微量元素(PTM1) 4.4 mL, 加水定容至 1 L。

微量元素(PTM1, g/L): 七水硫酸亚铁 65.0, 氯化锌 20.0, 五水硫酸铜 6.0, 一水硫酸锰 3.0, 氯化钴 0.5, 二水钼酸钠 0.2, 生物素 0.2, 碘化钠 0.08, 硼酸 0.02, 98%浓硫酸 5 mL, 采用纯净水定容至 1 L。其中生物素采用过滤灭菌, 待 PTM1 高温灭菌并冷却至室温后加入。

### 1.1.3 主要仪器

恒温恒湿培养箱、恒温摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; 紫外-可见分光光度计, 岛津公司; 50 L 自动液体发酵罐, 上海保兴生物工程设备有限公司。

## 1.2 ReTMan26 中 N-糖基化位点及其作用分析

使用蛋白质在线建模软件 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)构建 ReTMan26 的三维结构模型, 再通过 PyMOL 软件进行分析, 以初步判断 N-糖基化位点在 ReTMan26 蛋白结构中的位置及可能的作用。

### 1.3 $\beta$ -甘露聚糖酶活性检测

采用 0.1 mol/L pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液进行酶液稀释及反应底物(槐豆胶)配制。检测时吸取 2.0 mL 经 37 °C 预热的待测酶液至试管中, 加入 2.0 mL 经 37 °C 预热且浓度为 6 g/L 的底物溶液, 振荡混匀, 于 37 °C 温育 30 min。然后加入 5.0 mL DNS 试剂并振荡混匀, 以终止酶解反应。在沸水中加热 5 min 后用自来水冷却, 加水定容至 25.0 mL, 振荡混匀。以纯净水作为空白对照, 于 540 nm 测定吸光值, 然后通过标准曲线计算酶活。

酶活定义为: 在 37 °C、pH 5.5 的条件下, 每分钟从 3 mg/mL 的甘露聚糖溶液中水解释放 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。

## 1.4 BS-Man 摇瓶发酵及纯化

采用嗜热枯草芽孢杆菌 TBS2 进行摇瓶发酵以获得耐高温  $\beta$ -甘露聚糖酶 BS-Man。摇瓶发酵条件为: 500 mL 摇瓶装 100 mL TBS2 发酵培养基, 初始 pH 7.0, 温度 50 °C, 转速 200 r/min, 发酵 36 h。发酵结束后于 8 000 $\times$ g 离心 10 min, 上清液经 10 kD 超滤膜浓缩后进行盐析, 然后取盐析产物通过 Sephadex G-75 层析柱(洗脱液为 0.1 mol/L pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液)进行纯化, 纯化效果通过 SDS-PAGE 进行验证。

## 1.5 ReTMan26 高密度液体发酵

挑取重组毕赤酵母 *Orig-pPICZaA-X33* 单菌落, 接种至 YPD 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h 制备摇瓶种。50 L 发酵罐中装 BSM 培养基 20 L (其中预先加有 320 g 纯甘油作为碳源), 采用 17% (质量体积比)的氨水作为氮源并调节 pH。高密度液体发酵条件为: 接种量 10% (体积比), 搅拌速率 500 r/min, 发酵 pH 4.6, 通气量 50 L/min, 温度 30 °C。接种培养 12 h 后, 开始流加 50% (质量体积比)的甘油, 流加速率为: 12–16 h, 32 g/h; 16–20 h, 40 g/h; 20–24 h, 48 g/h。甘油流加结束约 15 min 后, 溶氧大幅升高, 即开始甲醇诱导。甲醇的流加速率为: 24–30 h, 30 mL/h; 30–40 h, 40 mL/h; 40–50 h, 50 mL/h; 50–60 h, 60 mL/h; 60–80 h, 70 mL/h; 80–100 h, 80 mL/h; 100–192 h, 90 mL/h。

## 1.6 ReTMan26 脱 N-糖基化处理及纯化

参照天然蛋白去糖基化试剂盒使用说明, 发酵液经 8 000 $\times$ g 离心 10 min 去除菌体后, 取 2 mL 酶液分别加入 20  $\mu$ L 的 F1、F2、F3 组分及 400  $\mu$ L 缓冲液, 于 37 °C 进行脱 N-糖基化处理 6 h。脱 N-糖基化前后的酶液采用 10 kD 超滤膜进行超滤浓缩后, 再采用 Sephadex G-75 层析柱(洗脱液为 0.1 mol/L pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液)进行纯化, 纯化产物

通过 SDS-PAGE 验证纯化效果。脱 N-糖基化后的 ReTMan26 标识为 ReTMan26-DG。

为确定脱 N-糖基化效果,各取 10  $\mu$ L 经纯化后的 ReTMan26、ReTMan26-DG 及 BS-Man 一起进行 SDS-PAGE 电泳。

## 1.7 稳定性对比实验

### 1.7.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性

采用不同 pH 值的反应体系: pH 1.5–5.0 (磷酸氢二钠-盐酸缓冲液)、pH 5.0–8.5 (磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液)、pH 8.5–10.0 (甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),分别添加 0.2 mL 经适当稀释的 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 酶液,在 37  $^{\circ}$ C、不同 pH (1.5–10.0) 条件下反应 30 min,将活性最高的实验组酶活设定为 100%,其余不同反应 pH 时的酶活与之相比,得到该酶在不同 pH 时的相对酶活,以确定其最适反应 pH。

为测定酶的 pH 稳定性,采用 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 于 37  $^{\circ}$ C、不同 pH (1.5–9.0) 条件下预处理 4 h,然后检测酶活,以未经处理的对照组酶活为 100%,各处理组与之相比获得不同 pH 处理后的剩余相对酶活。

### 1.7.2 最适反应温度及耐热稳定性

在最适 pH 及相同条件下,分别采用 0.2 mL 经适当稀释的 ReTMan26 和 ReTMan26-DG 酶液在不同温度(20–80  $^{\circ}$ C)进行反应,将活性最高的实验组酶活设定为 100%,其余反应温度下所测酶活与之相比获得各温度下的相对酶活,以确定其最适反应温度。

为检测 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 的耐热性能,在相同条件下,各实验组取 0.2 mL 酶液于不同温度(60–100  $^{\circ}$ C)预处理 10 min,然后测定酶活。以未经热处理的对照组酶活为 100%,各实验组所测酶活与之相比获得该酶经不同温度处理后的剩余相对酶活,从而确定其耐热性能。

为进一步反映 N-糖基化对 ReTMan26 耐热稳定性的影响,分别采用 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 在不同温度(60–100  $^{\circ}$ C)进行不同时间的热处理,并检测剩余酶活,以确定脱 N-糖基化前后的

ReTMan26 在不同温度时的半衰期。

### 1.7.3 抗消化蛋白酶的稳定性

根据单胃动物消化道特点,在体外进行蛋白酶消化模拟实验。各取 0.20 mg 的 ReTMan26 及 ReTMan26-DG (纯化后的冻干粉)分别加入消化酶液 A、B 中,于 37  $^{\circ}$ C 下消化 2 h。

消化酶液 A (胃液)组成: 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-盐酸缓冲液, pH 2.0, 胃蛋白酶 80 U/mL。

消化酶液 B (肠胰液)组成: 0.2 mol/L 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液, pH 6.8, 胰蛋白酶 150 U/mL。

消化结束后,分别以未经消化酶处理的 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 酶活性为 100%,各处理组的酶活与之相比获得剩余相对酶活。

## 2 结果与分析

### 2.1 N-糖基化位点及其作用分析

据报道,不同来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶在氨基酸序列上会存在一定差异,但在蛋白质结构上通常具有一些相同特征,例如,属于 GH5、GH26 及 GH113 家族的  $\beta$ -甘露聚糖酶的催化域,一般都是由 8 个  $\alpha$ -螺旋和 8 个  $\beta$ -折叠交替排列形成桶状结构,其中排列在一起的 8 个  $\beta$ -折叠片段形成桶状内部凹槽,与之相连的  $\alpha$ -螺旋则组成桶的外沿。另外,氨基酸序列上还存在 8 个保守氨基酸构成该桶状结构的活性口袋,其组成依次为精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asn)、谷氨酸(Glu)、组氨酸(His)、酪氨酸(Tyr)、谷氨酸(Glu)及色氨酸(Trp),且其中的 2 个谷氨酸位点分别位于第 4 及第 7 个  $\beta$ -折叠的 C 末端,高度保守,是  $\beta$ -甘露聚糖酶的亲核催化及酸碱催化位点<sup>[12-13]</sup>。

图 1A 为 ReTMan26 的总体三维结构图,从中可以看出,ReTMan26 蛋白形成了明显的桶状结构,这与报道的  $\beta$ -甘露聚糖酶结构特征相同。

为更好地展示 ReTMan26 中的 3 个 N-糖基化位点,图 1B 为经过适当旋转后的 ReTMan26 三维结构图。可以发现, N8、N26 及 N255 这 3 个 N-糖基化位点均处于 ReTMan26 催化域外围,这些位点的 N-糖基化对酶催化性能的影响可能很小。

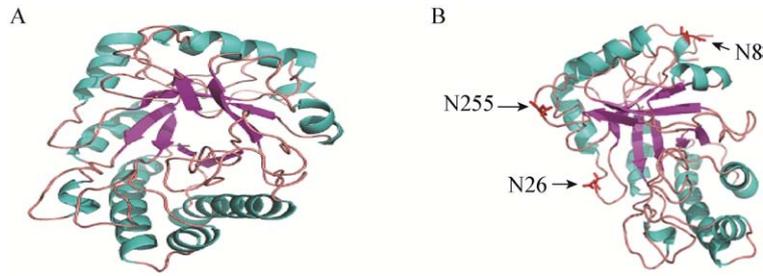


图 1 ReTMan26 蛋白质三维结构模型(A)及其 N-糖基化位点分析(B)

Figure 1 Three-dimensional structure model of ReTMan26 (A) and its N-glycosylation sites analysis (B)

图 2A 为 ReTMan26 活性口袋的三维结构图, 依次由 Arg52、His87、Asn90、Glu149、His182、Tyr224、Glu283、Trp284 组成, 其中位于第 4、7 个  $\beta$ -折叠 C 末端的 Glu149 与 Glu283 两个谷氨酸位点, 是 ReTMan26 中高度保守的酸碱催化和亲核催化位点, 这 2 个位点对于酶的催化活性及稳定性具有重要作用。图 2B 则为 3 个 N-糖基化位点及 2 个酸碱催化、亲核催化位点(Glu149、Glu283)在 ReTMan26 三维结构中的分布图, 可以发现, N26 与 Glu149、N255 与 Glu283 在空间上处于相邻状态, 推测这 2 个 N-糖基化位点在酸碱、高温或消化蛋白酶等存在时, 能在一定程度对 Glu149、Glu283 或附近其它重要催化域部位提供保护, 从而提高 ReTMan26 的稳定性。

## 2.2 高密度液体发酵

重组毕赤酵母 *Orig-pPICZaA-X33* 在 50 L 液体

发酵罐中的发酵过程曲线见图 3。

发酵结束后, 发酵液中 ReTMan26 酶活为 5 435 U/mL, 为了分析发酵液中蛋白分布情况, 取发酵结束后的离心上清液进行 SDS-PAGE 电泳; 同时, 取空白毕赤酵母 X33 (含不带任何外源基因的 pPICZaA 空白质粒)发酵后的离心上清液作对照, 结果见图 4。

与对照(CK)相比, 重组毕赤酵母 *Orig-pPICZaA-X33* 发酵 192 h 后的离心上清液在 42 kD 附近出现一条粗大、明亮的条带, 由于纯化后的 ReTMan26 分子量也约为 42 kD (图 5), 说明该条带是 ReTMan26 蛋白条带。因为 ReTMan26 的理论分子量为 36.132 kD, 小于 42 kD, 说明经毕赤酵母表达的 ReTMan26 已发生了相应的翻译后修饰。由于 ReTMan26 中存在 3 个 N-糖基化位点, 初步判断 ReTMan26 极可能形成了 N-糖基化。

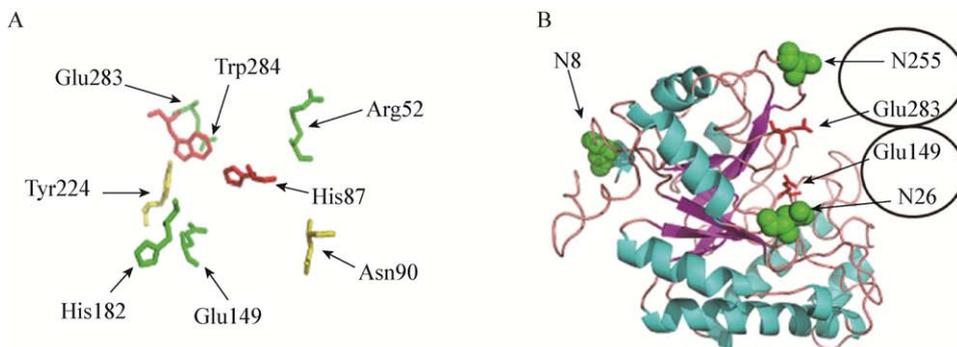


图 2 ReTMan26 活性口袋(A)及 3 个 N-糖基化位点对酶蛋白的稳定性作用分析(B)

Figure 2 Active pocket (A) and function analysis of the three N-glycosylation sites to the stability of ReTMan26 (B)

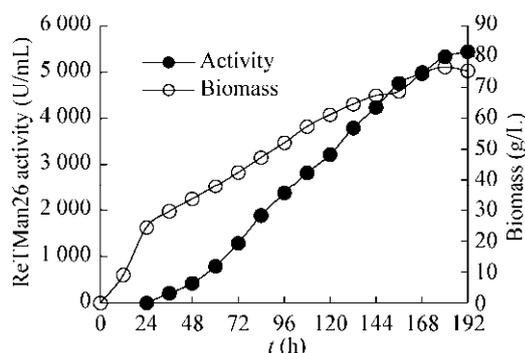


图3 重组毕赤酵母 *Orig-pPICZαA-X33* 高密度液体发酵  
Figure 3 High-cell-density fermentation by recombinant *P. pastoris Orig-pPICZαA-X33*

### 2.3 脱 N-糖基化处理及纯化

天然蛋白去糖基化试剂盒(NDEGLY)含有多种 N-糖基化水解酶组分,可以在不经蛋白变性及温和条件下专一性地切除 N-多糖链,这样去除 N-糖基化后,酶蛋白仍可保持活性。为了检测去糖基化试剂盒脱 N-多糖链及后续纯化的效果,以

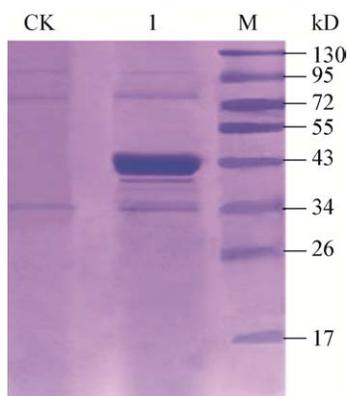


图4 ReTMan26 在毕赤酵母 X33 中表达后的 SDS-PAGE 电泳分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of ReTMan26 expressed by *P. pastoris X33*

注: CK: 空白毕赤酵母 X33 发酵后的离心上清液; 1: 重组毕赤酵母 *Orig-pPICZαA-X33* 发酵 192 h 后的离心上清液; M: 蛋白质 Marker.

Note: CK: Supernatant of negative *P. pastoris X33* after fermentation; 1: Supernatant of recombinant *P. pastoris Orig-pPICZαA-X33* after fermentation for 192 h; M: Protein marker.

纯化后的 BS-Man 为对照,对 ReTMan26 脱 N-糖基化前后经过纯化的产物进行了 SDS-PAGE 电泳,结果见图 5。

经纯化后的 ReTMan26 为 42 kD 左右的单一条带,而去除 N-糖基化并纯化后的产物 ReTMan26-DG 为 36 kD 左右的单一条带,这与嗜热枯草芽孢杆菌 TBS2 通过摇瓶发酵产生并纯化后的 β-甘露聚糖酶 BS-Man 条带一致。枯草芽孢杆菌作为一种原核生物,对表达的酶蛋白不能进行翻译后修饰,不会形成糖基化,而且 ReTMan26-DG 与该酶的理论分子量基本相同,这说明经过去糖基化试剂盒处理后, N-多糖链已去除且纯化效果良好,同时也证明通过毕赤酵母产生的 ReTMan26 中发生其它糖基化(如 O-糖基化)或磷酸化修饰的情况很少或几乎没有。

### 2.4 稳定性对比实验结果

#### 2.4.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性

纯化后的 ReTMan26 及 ReTMan26-DG 最适反应 pH 及 pH 稳定性检测结果分别见图 6、7。

ReTMan26 与 ReTMan26-DG 的最适反应 pH 均为 6.0,这说明 N-糖基化对 ReTMan26 最适反应 pH 基本没影响。

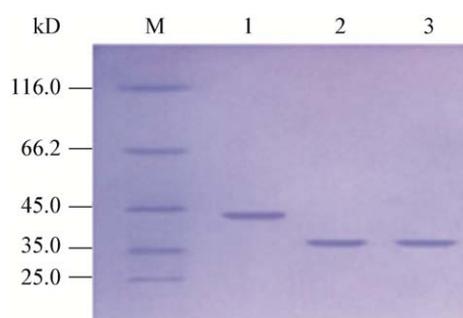


图5 纯化后各种酶的 SDS-PAGE 电泳分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of different purified enzymes

注: M: 蛋白质 Marker; 1: 纯化后的 ReTMan26; 2: 纯化后的 ReTMan26-DG; 3: 纯化后的 BS-Man.

Note: M: Protein marker; 1: ReTMan26 after purification; 2: ReTMan26-DG after purification; 3: BS-Man after purification.

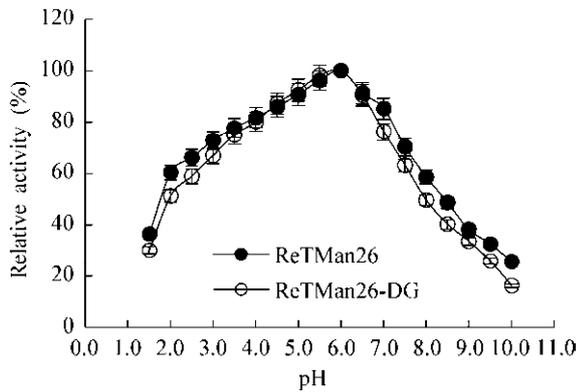


图 6 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 的最适反应 pH  
Figure 6 Optimum reaction pH of ReTMan26 and ReTMan26-DG

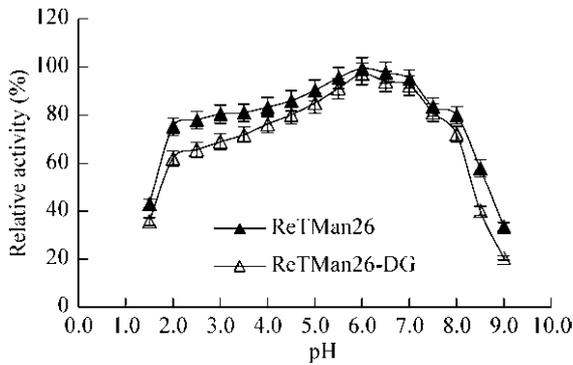


图 7 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 的 pH 稳定性  
Figure 7 pH stability of ReTMan26 and ReTMan26-DG

从图 7 可以发现, 在 pH 1.5-9.0 范围内, ReTMan26 的 pH 稳定性比 ReTMan26-DG 有一定程度的提高, 其中在 pH 6.0 时提高幅度最低, 仅约 2.2%; 在 pH 8.5 时提高幅度最大, 为 17.9%, 因此 N-糖基化可小幅提高 ReTMan26 的 pH 稳定性。

#### 2.4.2 最适反应温度及耐热性

ReTMan26 的最适反应温度为 60 °C, 而 ReTMan26-DG 最适反应温度为 55 °C, 因此 ReTMan26 的最适反应温度比 ReTMan26-DG 提高了 5 °C。最适反应温度检测结果见图 8。

ReTMan26 与 ReTMan26-DG 在 60-100 °C 分别处理 10 min 后的耐热实验结果见图 9。

ReTMan26 经 100 °C 处理 10 min 后剩余酶活仍达到 58.6%, ReTMan26-DG 在 93 °C 处理 10 min 后剩余酶活为 58.2%, 而在 100 °C 处理 10 min 则完全失活, 因此 N-糖基化可明显提高 ReTMan26 的耐热性能。

ReTMan26 与 ReTMan26-DG 在不同温度的半衰期结果见表 1。在 100 °C 时, ReTMan26 的半衰期约为 12 min, 而去除 N-糖基化后的 ReTMan26-DG 仅为 0.25 min 左右, 在其它温度时 ReTMan26 的半衰期也比 ReTMan26-DG 有较明显的提高。

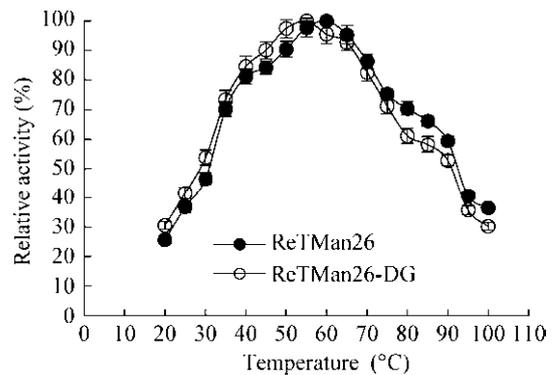


图 8 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 最适反应温度  
Figure 8 Optimum temperature of ReTMan26 and ReTMan26-DG

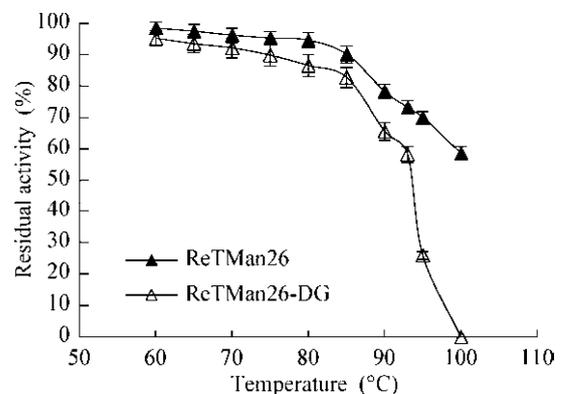


图 9 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 的耐热稳定性  
Figure 9 Thermostability of ReTMan26 and ReTMan26-DG

表 1 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 在不同温度时的半衰期( $t_{1/2}$ )Table 1 Half-lives ( $t_{1/2}$ ) of ReTMan26 and ReTMan26-DG at different temperatures

Enzymes	$t_{1/2}$ (min)				
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
ReTMan26	360±15	252±10	120±3	20±1.0	12.00±0.50
ReTMan26-DG	300±12	200±5	90±3	15±0.5	0.25±0.01

### 2.4.3 抗消化酶的稳定性

动物消化道内含有较高浓度的消化蛋白酶,因此,ReTMan26 作为饲料酶进行应用需具有较好的抗消化性能,以防被动物所分泌的消化蛋白酶水解而失去作用。

ReTMan26 经胃蛋白酶及胰蛋白酶各处理 2 h 后,剩余酶活分别为 70.5% 及 91.2%,与 ReTMan26-DG 相比分别提高 23.7% 及 25.6% (图 10)。

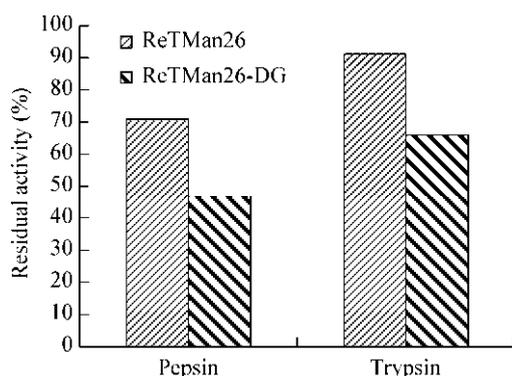


图 10 ReTMan26 与 ReTMan26-DG 抗消化蛋白酶的性能

Figure 10 Resistance of ReTMan26 and ReTMan26-DG to digestive proteases

## 3 讨论与结论

针对毕赤酵母 *Orig-pPICZαA-X33* 所产的 ReTMan26 耐高温性能比其基因来源菌株(嗜热枯草芽孢杆菌 TBS2)所产的 BS-Man 有明显提高的现象,本研究通过构建 ReTMan26 的蛋白质三维结构模型,初步判断其中存在的 3 个 N-糖基化位点经毕赤酵母修饰后,可能会对该酶的稳定性产生一定影响。为此采用天然蛋白去糖基化试剂盒脱除了 ReTMan26 中的 N-多糖链,并对脱除 N-糖基化前后

的 ReTMan26 进行了相应的稳定性对比实验。

脱 N-糖基化前后的 ReTMan26 最适反应 pH 均为 6.0,这与基因来源于枯草芽孢杆菌 MAFIC-S11 并在毕赤酵母中表达的 β-甘露聚糖酶相同<sup>[14]</sup>。该结果说明 N-糖基化对 ReTMan26 的最适反应 pH 基本上不会产生影 响,这是由于酶的最适反应 pH 一般由其关键催化位点或催化域确定,N-糖基化对其催化特性并不会产生影响。虽然如此,在 pH 1.5–9.0 范围内,N-糖基化可以小幅提高 ReTMan26 的 pH 稳定性,这可能因为在酸碱处理时,处于合适位置的 N-多糖链能对关键催化位点或催化域提供一定程度的保护,减少酶蛋白的变性或失活,从而提高其 pH 稳定性。

ReTMan26 的最适反应温度为 60 °C,与来源于枯草芽孢杆菌 WL-3 的 β-甘露聚糖酶<sup>[15]</sup>及来源于烟色曲霉(*A. fumigates*)的 β-甘露聚糖酶 MANA 相同<sup>[16]</sup>,而脱除 N-糖基化后最适反应温度为 55 °C。通常在一定范围内,反应温度越高,酶的催化活性越强,没有 N-多糖链的影响,酶与底物可更好地接触,获得更高的酶促反应速率,所以去除 N-糖基化后的酶可表现出更低的最适反应温度。

在耐热性能方面,经 100 °C 处理 10 min 后 ReTMan26 剩余酶活仍达到 58.6%,而去除 N-糖基化后,该酶经 93 °C 处理 10 min 后剩余酶活为 58.2%,100 °C 处理 10 min 则完全失活。与之相对应,在 100 °C 时,ReTMan26 的半衰期约为 12 min,去除 N-糖基化后的半衰期仅为 0.25 min 左右。这说明通过毕赤酵母形成的 N-糖基化能明显提高 ReTMan26 的耐热稳定性。类似地,Zou 等报道了一种通过毕赤酵母表达的重组 β-葡糖苷酸酶(β-glucuronidase) GUS,经 65 °C 处理 2 h,脱 N-多

糖链后的 GUS 完全失活, 而含 N-糖基化的 GUS 酶活仍保留 80% 左右<sup>[17]</sup>。另外, Han 等报道, 基因来源于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)并在毕赤酵母中表达的重组弹性蛋白酶 rPAE, 含 N-糖基化的 rPAE 在 70 °C 的半衰期为 32.2 min, 而去除 N-多糖链后的 rPAE 在 70 °C 的半衰期仅为 23.1 min<sup>[18]</sup>。以上这些结果佐证了 N-糖基化可以提高蛋白质经各种变性条件(如变性剂、高温等)的稳定性<sup>[19]</sup>。

在体外模拟实验中, ReTMan26 抗胃蛋白酶与胰蛋白酶的消化性能比去除 N-糖基化后分别提高了 23.7% 及 25.6%, 造成这种现象的原因可能是毕赤酵母在表达外源蛋白时, 经翻译后修饰形成的 N-多糖链能包裹住蛋白分子中的某些蛋白酶水解位点或催化域中的一些重要位点, 如 ReTMan26 中的酸碱催化及亲核催化位点(Glu149、Glu283)等, 从而提高其对消化蛋白酶的抗性。

因此, N-糖基化可提高 ReTMan26 的 pH 稳定性、耐热稳定性, 及抗胃蛋白酶、胰蛋白酶的消化性能, 这对该酶的应用及深入研究具有重要意义。另外, 本研究结果也可为今后采用 N-糖基化方法提高蛋白质稳定性的定向改造提供参考。

## REFERENCES

- [1] Chauhan PS, Puri N, Sharma P, et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 1817-1830
- [2] Choct M, Annison G. The inhibition of nutrient digestion by wheat pentosans[J]. British Journal of Nutrition, 1992, 67(1): 123-132
- [3] Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining[J]. Microbial Cell Factories, 2007, 6: 9
- [4] Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis[A]//Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology[M]. Vol. 108. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007: 121-145
- [5] Luo ZC, Miao J, Li GY, et al. Screening and identification of a strain producing a highly thermostable  $\beta$ -mannanase[J]. Letters in Biotechnology, 2018, 29(2): 233-237 (in Chinese)  
罗长财, 缪静, 李国莹, 等. 一株产耐高温  $\beta$ -甘露聚糖酶菌株的筛选鉴定[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(2): 233-237
- [6] Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1108-1118
- [7] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270
- [8] Luo ZC, Miao J, Li GY, et al. A recombinant highly thermostable  $\beta$ -mannanase (ReTMan26) from thermophilic *Bacillus subtilis* (TBS2) expressed in *Pichia pastoris* and its pH and temperature stability[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 182(4): 1259-1275
- [9] Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(6): 741-750
- [10] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 31-39
- [11] Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(7): 2645-2653
- [12] Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Recent advances and prospect on structural biology of  $\beta$ -mannanase — a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(9): 1131-1137 (in Chinese)  
赵月菊, 薛燕芬, 马延和.  $\beta$ -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1131-1137
- [13] Hilge M, Gloor SM, Rypniewski W, et al. High-resolution native and complex structures of thermostable  $\beta$ -mannanase from *Thermomonospora fusca*-substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5[J]. Structure, 1998, 6(11): 1433-1444
- [14] Lv JN, Chen YQ, Pei HL, et al. Cloning, expression, and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(8): 2326-2340
- [15] Yoon KH, Chung S, Lim BL. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*[J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(3): 344-349
- [16] Puchart V, Vršanská M, Svoboda P, et al. Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2004, 1674(3): 239-250
- [17] Zou SP, Huang S, Kaleem I, et al. N-glycosylation enhances functional and structural stability of recombinant  $\beta$ -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(1): 75-81
- [18] Han MH, Wang XF, Ding HY, et al. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 54: 32-37
- [19] Kwon KS, Yu MH. Effect of glycosylation on the stability of  $\alpha_1$ -antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1997, 1335(3): 265-272