

基于结构基础的嗜热细菌贝斯其热解纤维素菌木聚糖酶 *CbXyn10C* 的热稳定性分子改良

张经纬¹, 刘晓青^{*2}, 田健¹, 罗会颖¹, 姚斌¹, 涂涛^{*1}

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 畜禽营养与饲养全国重点实验室, 北京 100193

2 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

张经纬, 刘晓青, 田健, 罗会颖, 姚斌, 涂涛. 基于结构基础的嗜热细菌贝斯其热解纤维素菌木聚糖酶 *CbXyn10C* 的热稳定性分子改良[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5261-5274.

ZHANG Jingwei, LIU Xiaoqing, TIAN Jian, LUO Huiying, YAO Bin, TU Tao. Improvement of the thermal stability of xylanase *CbXyn10C* from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* based on structural information[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5261-5274.

摘要: 【背景】作为降解木聚糖的核心酶种, 木聚糖酶可以有效促进木质纤维素的消化水解, 在动物养殖领域应用广泛。来源于嗜热细菌贝斯其热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor bescii*)的 GH10 家族木聚糖酶 *CbXyn10C* 最适温度为 85 °C, 在 80 °C 条件下具有良好的热稳定性, 具有饲料工业应用潜力。【目的】为满足饲料制粒尤其是水产饲料加工过程的工艺要求, 进一步提高木聚糖酶 *CbXyn10C* 的热稳定性并阐明其耐热机理。【方法】以 *CbXyn10C* 晶体结构为基础, 采用刚性氨基酸引入、疏水作用网络重排 2 种策略对其热稳定性进行理性设计, 获得在 100 °C 条件下比活提高的单点突变体后, 通过有益突变位点叠加策略进一步提升酶的热稳定性, 最后采用分子动力学模拟技术分析其热稳定性提高的分子机制。【结果】共获得了 4 个稳定性提高的单点突变体 A45P、T69P、F309V 和 A325P, 其中突变体 A45P 效果最优。随着在 A45P 基础上另外 3 个突变位点的叠加, 酶的热稳定性在不损失酶活的前提下得到了逐步提升。获得的四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 的耐热性最好, 其最适反应温度和熔解温度 T_m 值较野生型分别提高了 5 °C 和 6.8 °C。分子动力学模拟技术分析发现 4 个位点的突变引入了新的氢键作用力且优化了疏水作用网络, 进而导致酶的结构构象更加稳定。【结论】本研究不仅提高了木聚糖酶在饲料工业中的应用价值, 而且对基于酶蛋白结构的稳定性分子改造提供了理论支持。

关键词: 木聚糖酶; 晶体结构; 热稳定性; 理性设计

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2105502); 现代农业产业技术体系(CARS-41)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2105502) and the China Agriculture Research System of Ministry of Finance (MOF) and Ministry of Agriculture and Rural Affairs (MARA) (CARS-41).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Xiaoqing, liuxiaoqing@caas.cn; TU Tao, tutao@caas.cn

Received: 2023-05-30; Accepted: 2023-06-30; Published online: 2023-08-28

Improvement of the thermal stability of xylanase *CbXyn10C* from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* based on structural information

ZHANG Jingwei¹, LIU Xiaoqing^{*2}, TIAN Jian¹, LUO Huiying¹, YAO Bin¹, TU Tao^{*1}

1 State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] Xylanase, the core enzyme responsible for the degradation of xylan, can promote the digestion and hydrolysis of lignocellulose. Therefore, it has been widely used in animal breeding fields. The GH10 xylanase *CbXyn10C* derived from *Caldicellulosiruptor bescii* has good thermal stability at 80 °C with an optimum temperature of 85 °C. With this property, it demonstrates a promising prospect for application in the feed industry. [Objective] To improve the thermal stability of *CbXyn10C* for meeting the technological requirements of feed granulation, especially aquatic feed processing, and decipher its heat resistance mechanism. [Methods] Based on the crystal structure of *CbXyn10C*, mutations were designed by introducing rigid amino acids and rearranging the hydrophobic network. After a single-point mutant with increased specific activity at 100 °C was obtained, the thermal stability of the enzyme was further improved by the stacking of beneficial mutation sites. Molecular dynamics (MD) simulation was employed to decipher the mechanism of thermal stability improvement. [Results] Four single-point mutants A45P, T69P, F309V, and A325P with improved stability were obtained, among which the mutant A45P showed the greatest stability improvement. The stacking of other three mutation sites on A45P gradually improved the thermal stability of the enzyme without compromising the enzyme activity. The obtained four-point mutant A45P/F309V/A325P/T69P showed the best heat tolerance, and its optimum temperature and melting temperature T_m were increased by 5 °C and 6.8 °C, respectively, compared with those of the wild type. MD simulation showed that mutations at the four sites introduced new hydrogen bond forces and optimized the hydrophobic network, resulting in a more stable structure and conformation. [Conclusion] This study promotes the application of xylanase in the feed industry and provides theoretical support for molecular modification for improving enzyme stability based on its structure.

Keywords: xylanase; crystal structure; thermal stability; rational design

作为最重要的木聚糖水解酶之一, 木聚糖酶(EC 3.2.1.8)可以催化木聚糖中 β -1,4-糖苷键的水解, 产生木二糖、木三糖和木寡糖^[1]。基于结构域序列比对, 木聚糖酶可分为 6 个糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)家族, 其中大多数属

于 GH 第 10 和 11 家族^[2]。GH10 家族酶系统具有高度专一性和稳定性等特点, 能够水解木糖及其衍生物生成一系列低分子量寡聚物^[3]。木聚糖酶作为降解木聚糖的核心酶种, 可以有效促进木质纤维素的消化水解, 在纸浆处理、动物

饲料处理、食品制造业和生物燃料制造业中有广泛的运用前景^[4]。木聚糖酶能降解饲料中主要抗营养因子——木聚糖,且木聚糖的降解产物低聚木糖可以激发宿主肠道中益生菌的生长,提高宿主健康状态^[5]。然而,这些应用领域的许多工艺过程需要在高温条件下进行,这就对木聚糖酶的热稳定性提出了更高的要求。鉴于饲料制粒尤其是水产饲料加工制粒过程高达 90 °C,所以木聚糖酶的热稳定性分子改良成为饲用酶制剂研究领域的热点^[6]。

酶的热稳定性分子改良主要有两种策略:定向进化和理性(或半理性)设计^[7]。定向进化是模拟自然进化机制在体外改造酶的有效策略^[4],但定向进化技术需要构建大规模的突变体文库,依赖高通量筛选技术,耗费大量的人力物力资源。与筛选迭代突变体的定向进化不同,理性设计依赖酶的晶体结构或计算机的模拟信息对酶进行改造^[8]。近年来,随着越来越多的蛋白质晶体结构信息和越来越成熟的生物信息学技术,理性(或半理性)设计策略因其高效性被广泛运用。

目前已经有一部分学者对 GH10 家族的木聚糖酶进行了分子改造以提高酶的稳定性。de Souza 等^[9]改造了来自金黄色嗜热菌的 GH10 家族内切木聚糖酶,构建的五点突变体 4S1 (R25W/V29A/I31L/L43F/T58I)的 60 °C $t_{1/2}$ 的值延长了 30 min,由于存在更多的短螺旋和盐桥,突变体 H209N 成功地将最适温度从 65 °C 提高到 75 °C。Li 等^[10]将来自嗜热堆肥真菌烟曲霉 Z5 的 GH10 家族木聚糖酶 XynAF0 的多苏氨酸区引入另一个 GH10 家族木聚糖酶 XynAS9 的 C 末端,提高了其热稳定性。Li 等^[11]通过理性设计和饱和突变相结合的方法,获得了来自高温堆肥菌株烟曲霉 Z5 的嗜热 GH10 家族木聚糖酶 XynAF1 热稳定性提高 6 倍的整合突变体 XynAF1-AC。Suzuki 等^[12]以芽孢杆菌 TAR-1 菌株 GH10 木聚

糖酶 XynR 为材料,构建了突变体 S92E,后经晶体学分析表明,该突变抑制了 92–95 位氨基酸残基的波动,提高了 XynR 的热稳定性质。邓巧平等^[13]将 GH10 家族的木聚糖酶 Umxyn10A 第 31 位 Ala 突变为 Phe,使其蛋白结构内部疏水相互作用增强,最终使 65 °C 条件下的半衰期提高 6 倍。然而更多的嗜热木聚糖酶亟须被开发,以满足工业生产需求。

来源于嗜热细菌贝斯其热解纤维素菌 (*Caldicellulosiruptor bescii*) 的 GH10 家族木聚糖酶 *CbXyn10C* 最适温度为 85 °C,在 80 °C 条件下具有良好的热稳定性,并且在 100 °C 仍具有一定的酶活,显示出极大的饲料工业应用潜力,但该酶在 90 °C 条件下处理 10 min 后完全丧失活性^[14],其热稳定性有待进一步地提高以适应饲料加工过程的高温工艺。在前期研究工作中,获得了木聚糖酶 *CbXyn10C* 的晶体结构[国际蛋白质结构数据库(Protein Data Bank) PDB ID: 5OFJ],分辨率高达 1.34 Å^[15],本研究在此基础上对其热稳定性进行理性设计,旨在获得热稳定性进一步提高的酶突变体,并阐明其耐热的机制,具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 和 *E. coli* BL21(DE3) 分别为克隆菌株和表达菌株,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。木聚糖酶表达质粒 pET-46 EK/LIC-*CbXyn10C* 及菌株由本实验室前期构建保存^[14]。

1.2 主要试剂

IPTG, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 氢氧化钠, Thermo Fisher Scientific 公司; 蛋白分子量 Marker, GenStar 公司; 胶回收试剂盒, Omega Biotek 公司; 山毛榉木木聚糖和木糖,

Sigma-Aldrich 公司; 蛋白定量试剂盒, TransGen Biotech 公司; *Dpn* I 和 DNA 聚合酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, HITACHI 公司; 分光光度计, 耶拿分析仪器(北京)有限公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 生化培养箱, 北京利康达圣科技发展有限公司。

1.4 突变体的构建

以 pET-46 EK/LIC-*CbXyn*10C 质粒为模板, 如表 1 所示引物进行全质粒 PCR 扩增。PCR 反

应总体系(50 μ L): 模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, DNA 聚合酶 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 无菌水 20 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。在 PCR 结束后取 10 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 验证正确的 PCR 产物中加入 1 μ L *Dpn* I, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h, 取 10 μ L 消化后的 PCR 产物热激转化到大肠杆菌克隆宿主 Trans1-T1 中, 随后筛选阳性克隆子, 送至北京六合华大基因科技有限公司测序, 将测序正确的重组质粒转化到大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3) 中, 获得 *CbXyn*10C 突变体表达菌株。

表 1 定点突变所用引物

Table 1 Primers used by site-directed mutagenesis

Genes name	Primers name	Primers sequences (5'→3')
A45P	A45P-F	CAGTATAACAC <u>CCGG</u> GAGAATGAAATGAAGCCAGA
	A45P-R	TTTCATTCTCCGGTGTATACTGTAAAATGTT
A56P	A56P-F	TTTCATTCTCCGGTGTATACTGTAAAATGTT
	A56P-R	GTTTGCCCCGGTAATAAACTTTCTGGCTTC
T69P	T69P-F	GATTTAGCCCGGCTGATACCTTTGTAGAC
	T69P-R	GTATCAGCCGGGCTAAATCTATAATTTAAGCC
Y245P	Y245P-F	GAGTTTACCGAATTACGGATCAAGCG
	Y245P-R	CGTAATTCGGTAAACTCATATCAAGCTCTG
TN288P	TN288P-F	GAAGTATCCGGTTGTAAATGTGTAAC
	TN288P-R	CATTTAACAACCGGATACTTCTTTAACATTG
R307P	R307P-F	CATGGTTACCGTCTTTTAACGGCAAAAATG
	R307P-R	GTAAAAGACGGTAACCATGAATAATCATC
F309V	F309V-F	GTAAAGATCTGTTAACGGCAAAAATGATTGG
	F309V-R	GCCGTTAACAGATCTTAA <u>CC</u> CATGAATAATC
A325P	A325P-F	GATTACAGTCCGAAACCAGCTTATTGGGCA
	A325P-R	CTGGTTTCCGGACTGTAATCCTCAAAAAGC
V20F	V20F-F	GGATAGGTTTTGCAATACCTGCAAAAATGTT
	V20F-R	CAGGTATTGCAAAACCTATCCTAAAATCATTC
D32Y	D32Y-F	CAACGATACATATAGAAAGGATGGTATTGAAAC
	D32Y-R	ATACCATCCTTCTATATGTATCGTTGCTCAAAC
L299F	L299F-F	TTGGGGATTTGATGATTATTCATGGTTAAG
	L299F-R	ATGAATAATCATCTTTAAACCAAAAATGTTAC
L319F	L319F-F	CATTATTGTTTTTTGAGGATTACAGTGCAAAAACC
	L319F-R	CACTGTAATCCTCAAAAACAATAATGGCCAATCAT

下划线标记突变碱基

The underline represents the mutated base.

1.5 *CbXyn10C* 及其突变体的表达及纯化

将 *CbXyn10C* 及其突变体的表达菌株接种于 40 mL 的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。随后以 2% 的接种量接种到 400 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值达 0.6–0.8 后, 加入 0.1% (体积分数) IPTG (1 mmol/L), 25 °C 诱导过夜。

由于蛋白在 80 °C 具有良好的稳定性, 所以本研究采用热沉淀法纯化蛋白。将诱导过夜的菌液以 6 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 重悬于 20 mL 裂解缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6) 中进行超声破碎 (400 W, 工作时间 4 s, 间歇时间 3 s, 总时间 40 min), 破碎液以 12 000 r/min 离心 40 min 获得粗酶液。将粗酶液置于 50 mL 离心管中, 于 80 °C 水浴锅中加热 20 min, 其间不停晃动离心管使粗酶液加热均匀, 加热后的粗酶液经 12 000 r/min 离心 20 min 获得纯酶液。

1.6 *CbXyn10C* 及其突变体 100 °C 的比活测定

测定酶活的反应体系为 1 mL, 其中包括 100 μ L 酶和 900 μ L 1% 的榉木木聚糖溶液, 在 100 °C 条件下反应 10 min, 反应结束后加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 终止反应, 100 °C 显色 5 min 后取 250 μ L 在 OD_{540} 下测定吸光值, 每个反应做 3 组平行试验。木聚糖酶酶活单位定义为: 在最适条件下 1 min 释放 1 μ mol 还原糖所需要的酶量为 1 U。

1.7 *CbXyn10C* 及其突变体酶学性质的测定

1) 最适温度的测定

在 70、80、85、90、95 和 100 °C 的温度条件下按照 1.6 所述方法测定酶活力, 将最高酶活力定义为 100%, 计算其余各个温度下的相对酶活力, 绘制折线图。

2) 热稳定性的测定

将酶分别置于 80 °C 和 85 °C 条件下保温 2、5、10、20、40 和 60 min (pH 6.5), 90 °C 和 95 °C 条件下保温 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 min (pH 6.5), 然后冰浴 60 min, 按照 1.6 所述方法测定酶活力, 将未处理过的酶 (冰浴放置) 活定义为 100%, 计算其余各个处理时间下的相对酶活力, 绘制折线图。

3) 酶促动力学参数的测定

将底物设置 11 个不同浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、2.0、5.0、8.0、10.0、12.0 和 15.0 mg/mL), 在 50 mmol/L、pH 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液条件下 85 °C 反应 5 min, 按照 1.6 所述方法测定酶活力, 最后运用软件 GraphPad Prism 9 计算出 K_m 和 k_{cat} 。

1.8 *CbXyn10C* 及其突变体 T_m 值的测定

采用差式扫描量热法 (different scanning calorimetry, DSC) 测定蛋白质的熔解温度 (T_m), 将所有样品用脱盐柱置换缓冲液, 置换为 pH 6.0 的 20 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液并进行抽真空脱气。预处理完的样品用 DSC 专用的 96 孔板进行盛放, 扫描温度范围设置为 25–110 °C, 升温速率为每小时 120 °C。在样品开始测量前, 先用 3 组缓冲液的样进行预扫描, 平衡体系。

1.9 分子动力学模拟

使用 Amber 14 对木聚糖酶在 360 K 下进行 20 ns 分子动力学模拟 (molecular dynamics simulation)^[16]。模拟采用 ff12SB 力场, 盒子形状选择正八面体, 水分子类型选用 TIP3P, 添加钠离子和氯离子并中和多余电荷。先分别用共轭梯度法和最陡下降法对体系进行能量最小化, 之后进行无限制模拟。模拟过程中使用 2 fs 的时间步长, 每 10 ps 保存一次轨迹结构。蛋白质结构图使用 Pymol 软件进行绘制。运

用 Discovery Studio 2017 软件分析氨基酸相互作用。

2 结果与分析

2.1 突变位点的设计

分析耐热酶的结构特征将有助于挖掘用于提升木聚糖酶 *CbXyn10C* 热稳定性的改造位点及策略。目前耐热性质最好的木聚糖酶是来源于 *Thermotoga maritima* MSB8 的 GH10 家族木聚糖酶 TmxB, 其最适反应温度为 90 °C, 且在 105 °C 时仍有活性^[17]。因此本研究选取 TmxB 作为对比的研究对象。通过分析 TmxB 的晶体结构(PDB ID: 1VBR)发现, TmxB 蛋白序列含有 3.7% 的脯氨酸, 高于其他木聚糖酶脯氨酸含量的平均水平。脯氨酸残基的刚性构象会限制蛋白质结构的主链柔性, 可以在合适位置通过控制蛋白质折叠来增强蛋白质的热稳定性^[18], 高含量的脯氨酸可能有助于 TmxB 在高温条件下保持折叠。因此, 本研究将 *CbXyn10C* 与 TmxB 的结构进行比对(图 1A), 将位于 loop 区

域的部分氨基酸替换为脯氨酸, 构建了 7 个突变体 A45P、A56P、T69P、Y254P、TN288P、R307P 和 A325P。同时将位于催化口袋附近的 F309 替换成来源于 *Streptomyces* sp. 9 的 GH10 家族木聚糖酶 XynAS9^[10] 中第 309 个氨基酸 V, 构建了突变体 F309V (图 1B)。

芳香族簇是指蛋白质中的芳香族氨基酸, 如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等聚集在一起形成的结构。这些氨基酸侧链中含有芳香环结构, 可以形成疏水堆积作用, 增加蛋白质的疏水性和稳定性^[19]。因此本研究将两两分布在蛋白质 N 端和 C 端的 4 个位点 V20、D32、L299 和 L319 (图 1C) 分别突变成芳香族氨基酸, 构建突变体 4M (V20F/D32Y/L299F/L319F), 使它们之间形成 π 堆积作用, 从而增加蛋白质的热稳定性。

2.2 *CbXyn10C* 及其单点突变体 100 °C 的比活测定结果

热稳定性提升的突变体势必提升酶在高温条件下的酶活力, 因而本研究以 100 °C 的比活作为指标来评估和筛选耐热突变体。如图 2 所

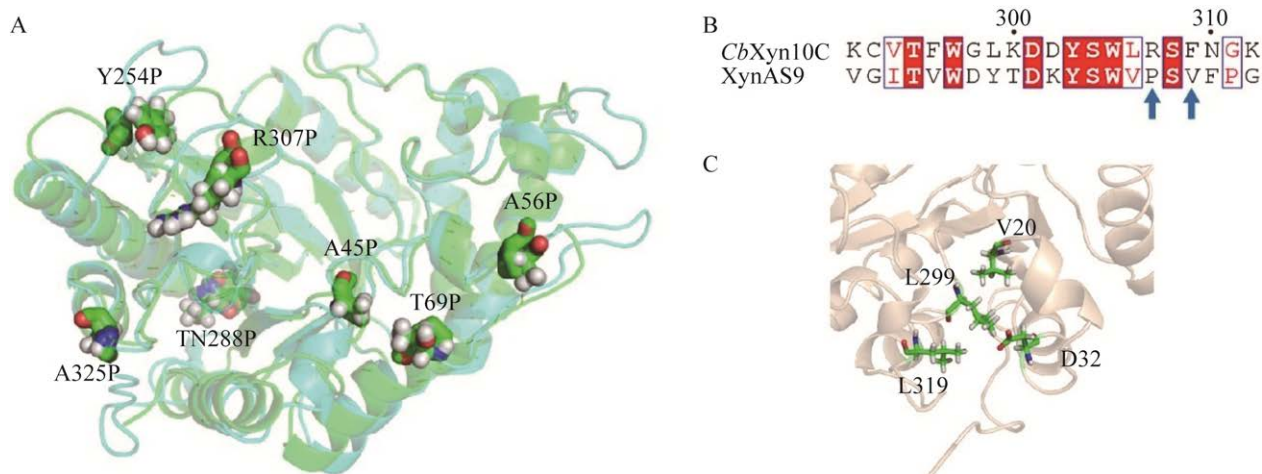


图 1 突变体设计策略图 A: *CbXyn10C* 与 TmxB 结构比对图. 蓝色: *CbXyn10C*; 绿色: TmxB. B: R307 和 F309 在蛋白质中的位置. C: 芳香族簇位点在蛋白质中的位置

Figure 1 Mutant design strategy. A: Comparison diagram of *CbXyn10C* and TmxB structure. Blue: *CbXyn10C*; Green: TmxB. B: Position of R307 and F309 in proteins. C: Position of aromatic cluster sites in proteins.

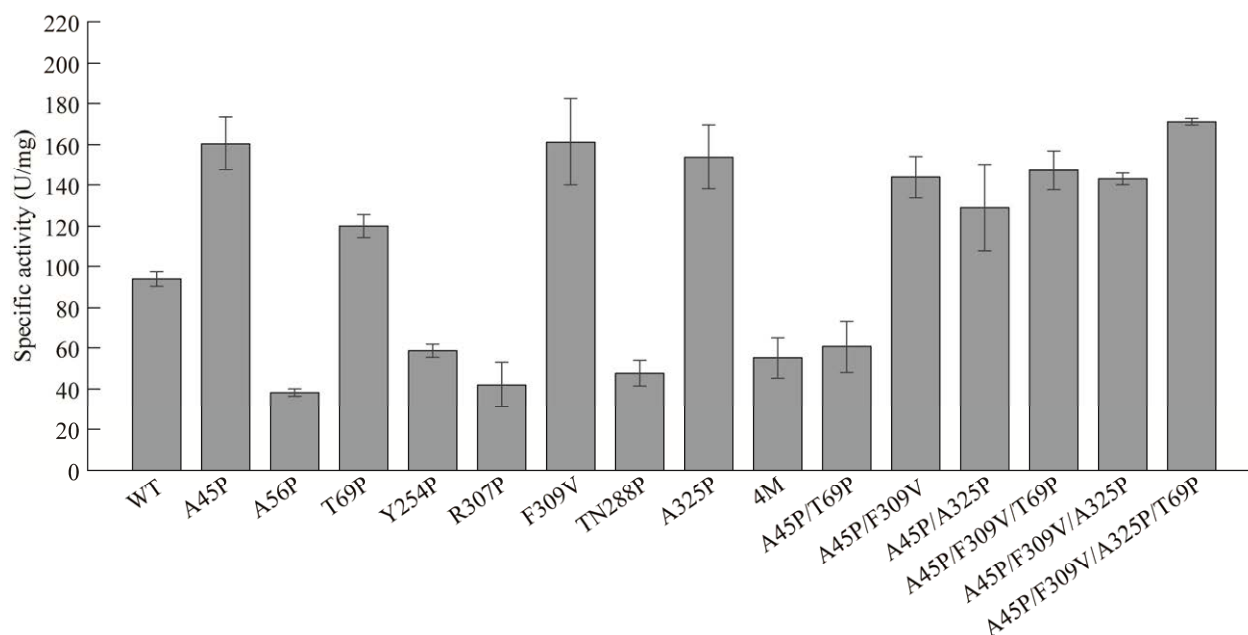


图2 *CbXyn10C* 及其突变体 100 °C 的比活

Figure 2 Specific activity of *CbXyn10C* and its mutants when measured at 100 °C.

示, 在构建的 9 个突变体中, 突变体 A45P、T69P、F309V 和 A325P 在 100 °C 的比活得到提升, 其余突变体比活都呈现不同程度的降低。相较于野生型 *CbXyn10C* [(93.8±3.6) U/mg], 突变体 A45P [(160.4±12.9) U/mg]、T69P [(120.1±5.7) U/mg]、F309V [(161.2±21.2) U/mg] 和 A325P [(153.8±15.6) U/mg] 比活力分别提高 71.0%、28.0%、71.8% 和 64.0%。

2.3 *CbXyn10C* 及其单点突变体的最适温度和热稳定性

为确定 100 °C 比活提高的突变体的热稳定性改良效果, 本研究测定了野生型 *CbXyn10C* 及其突变体 A45P、T69P、F309V 和 A325P 的最适温度及温度稳定性, 结果如图 3 所示。野生型在 85 °C 时具有最高酶活, 在 100 °C 时下降到 13.7%。突变体 A45P、T69P 和 F309V 的最适温度均提高到 90 °C, 相较野生型提高了 5 °C, A45P 和 A325P 的提升效果最明显, 在 100 °C 的时候相对酶活分别达到 33.3% 和 30.6%

(图 3A)。所有的酶在 80 °C 条件下处理 40 min 后酶活均未损失(图 3B)。在 85 °C 处理 40 min 后, 野生型酶活仅剩 8.8%, 而突变体 A45P 和 F309V 的剩余酶活分别为 41.9% 和 68.3% (图 3C); 在 90 °C 处理 4 min 后, 野生型酶活仅剩 26.0%, 而突变体 A45P 剩余酶活为 54.5%; 在 90 °C 处理 6 min 后, 野生型酶活仅剩 9.5%, 而突变体 A45P 和 F309V 酶活还剩 19.0% 和 21.2% (图 3D)。由此可见, 突变体在 85 °C 和 90 °C 的热稳定性均有提升。

2.4 *CbXyn10C* 的叠加突变

叠加突变是一种通过多个氨基酸残基的突变来提高蛋白质热稳定性的方法^[20]。在蛋白质的特定区域内, 通过叠加两个或多个氨基酸突变可以增强蛋白质的稳定性, 提高其在高温条件下的活性和稳定性。本研究以热稳定性提升最明显的突变体 A45P 作为起始, 分别叠加其他 3 个有益突变位点, 构建了两点突变体 A45P/T69P、A45P/F309V 和 A45P/A325P, 三点突变体

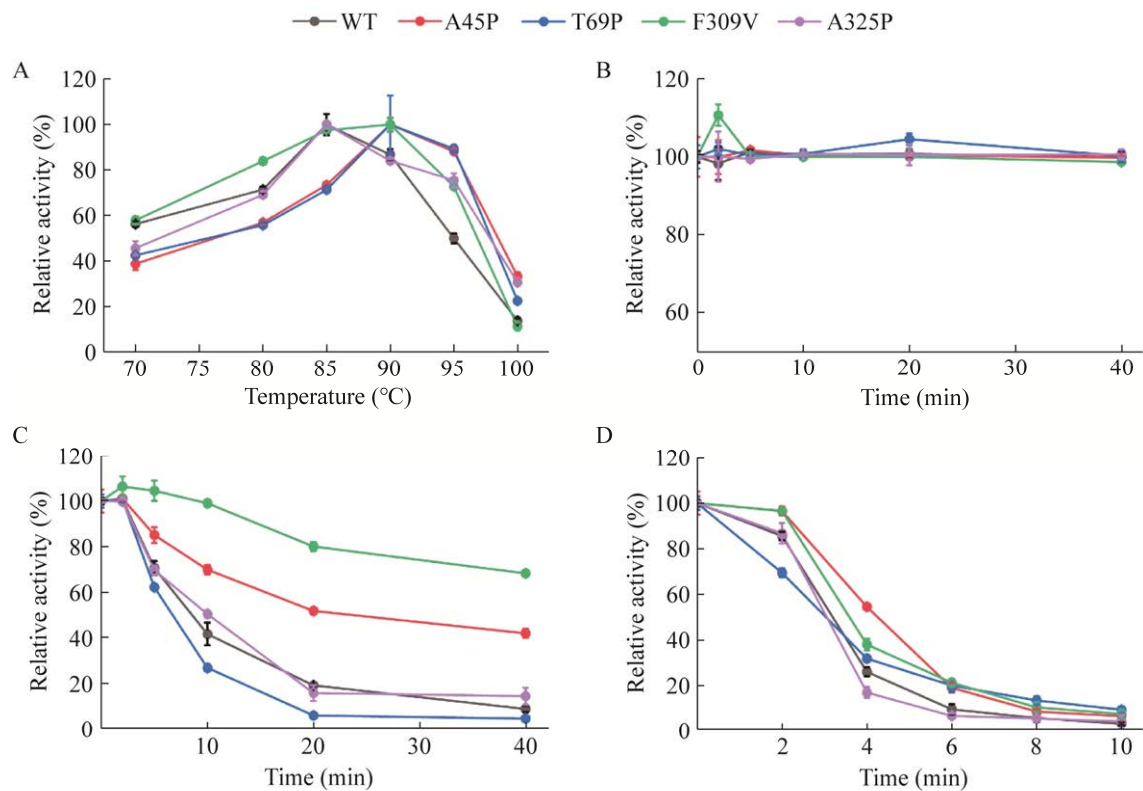


图3 *CbXyn10C* 及其单点突变体的酶学性质 A: 最适温度. B: 80 °C时的热稳定性. C: 85 °C时的热稳定性. D: 90 °C时的热稳定性

Figure 3 Characterization of enzymatic properties of *CbXyn10C* and single-point mutants. A: Optimal temperature. B: Thermal stability at 80 °C. C: Thermal stability at 85 °C. D: Thermal stability at 90 °C.

A45P/F309V/T69P 和 A45P/F309V/A325P, 以及四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P。如图 2 所示, 与野生型 *CbXyn10C* 的比活 $[(93.8 \pm 3.6) \text{ U/mg}]$ 相比, 两点突变体中仅突变体 A45P/T69P 的比活 $[(60.7 \pm 12.5) \text{ U/mg}]$ 降低 35.3%, 而 A45P/F309V $[(143.9 \pm 10.2) \text{ U/mg}]$ 、A45P/A325P $[(128.9 \pm 21.3) \text{ U/mg}]$ 的比活分别提高 53.4%和 37.4%, 三点突变体 A45P/F309V/T69P $[(147.3 \pm 9.7) \text{ U/mg}]$ 和 A45P/F309V/A325P $[(143.0 \pm 2.9) \text{ U/mg}]$ 的比活分别提高 57.0%和 52.4%, 四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P $[(171.0 \pm 1.7) \text{ U/mg}]$ 的比活提高 82.2%。

2.5 *CbXyn10C* 及其叠加突变体的酶学性质

为了确定叠加突变体的热稳定性改良效果, 本研究进一步测定了 100 °C比活提升显著

的两点突变体 A45P/F309V、三点突变体 A45P/F309V/T69P 和四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 的最适温度及温度稳定性, 结果如图 4 所示。这 3 种叠加突变体同单点突变体 A45P 的最适温度较野生型均提高了 5 °C (图 4A)。在 85 °C 处理 60 min 后, *CbXyn10C* 剩余酶活只有 6.7%, 单点、双点、三点和四点突变体的剩余酶活分别为 14.3%、37.2%、20.8%和 84.6% (图 4B); 在 90 °C 处理 10 min 后, 野生型酶活几乎全部丧失, 而单点、双点、三点和四点突变体的剩余酶活分别为 6.6%、17.3%、13.8%和 60.4% (图 4C); 在 95 °C 处理 3 min 后, 野生型剩余酶活只有 7.2%, 单点、双点、三点和四点突变体的剩余酶活分别为 23.6%、32.9%、39.7%和 30.3%

(图 4D)。由此可见, 叠加突变体的热稳定性显著提升, 其中四点突变体在 85 °C 和 90 °C 具有最好的热稳定性。

以榉木木聚糖为底物, 测定了野生型 *CbXyn10C* 及其突变体 A45P、A45P/F309V、A45P/F309V/A325P 和 A45P/F309V/A325P/T69P

的动力学参数, 结果如表 2 所示。相较于野生型, 两点、三点和四点突变体催化效率(k_{cat}/K_m) 分别提高 12.9%、87.4%和 11.4%。

2.6 *CbXyn10C* 及其突变体的 T_m 测定结果

为了进一步确认热稳定性的提升, 本研究测定了野生型以及耐热性最好的单点突变体、

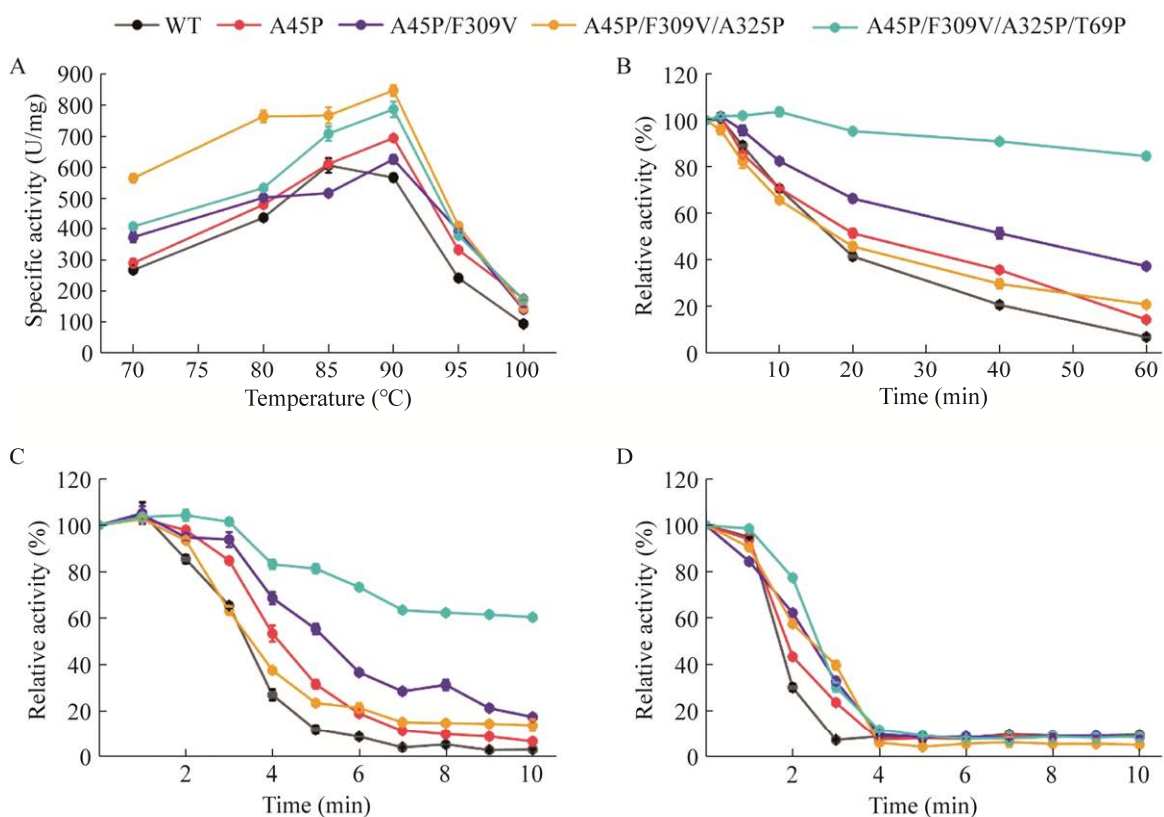


图 4 *CbXyn10C* 及其叠加突变体的酶学性质 A: 最适温度. B: 在 85 °C 时的热稳定性. C: 在 90 °C 时的热稳定性. D: 在 95 °C 时的热稳定性

Figure 4 Characterization of enzymatic properties of *CbXyn10C* and superimposed mutant. A: Optimal temperature. B: Thermal stability at 80 °C. C: Thermal stability at 85 °C. D: Thermal stability at 90 °C.

表 2 *CbXyn10C* 及其突变体的动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of *CbXyn10C* and its mutants

Enzyme	V_{max} (mL/(min·mg))	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mg/mL)	k_{cat}/K_m (mL/(s·mg))
WT	391.95±11.31	249.38±9.70	0.52±0.03	467.62±19.21
A45P	432.64±19.71	270.38±11.31	0.57±0.02	475.00±12.43
A45P/F309V	493.56±21.95	308.44±14.56	0.58±0.03	527.86±23.45
A45P/F309V/A325P	468.78±16.31	292.94±24.54	0.33±0.04	876.53±39.21
A45P/F309V/A325P/T69P	522.00±10.72	326.25±17.21	0.63±0.03	520.75±14.26

两点突变体、三点突变体和四点突变体的 T_m 值, 结果如图 5 所示, 突变体的 T_m 值都有不同程度的提高, *CbXyn10C*、A45P、A45P/F309V、A45P/F309V/A325P 和 A45P/F309V/A325P/T69P 的 T_m 值分别是 85.1、89.3、90.1、87.7 和 91.9 °C。其中四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 的 T_m 值最高, 相较于野生型提高了 6.8 °C。这个结果与热稳定性的测量结果一致, DSC 的扫描结果证明了突变体热稳定性的提高。

2.7 分子动力学模拟分析

为了解析突变体热稳定性提高的分子机制, 本研究对 *CbXyn10C* 及其四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 进行了 20 ns 的分子动力学模拟分析。对全时段的 root mean square deviation (RMSD) 的值进行分析发现, 四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 的 RMSD 值与野生型的 RMSD 值相似(图 6A), 说明两个体系趋于稳定, 可用于后续进一步分析。选择平衡阶段的轨迹(最后 10 ns)进行 root mean square fluctuation (RMSF) 分析发现(图 6B), 四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 在突变区域 RMSF 值与野生型相比未降低, 表明突变体 loop 结构的稳定性并未降低, 定点突变结果也指示在维持酶的催化活性前提

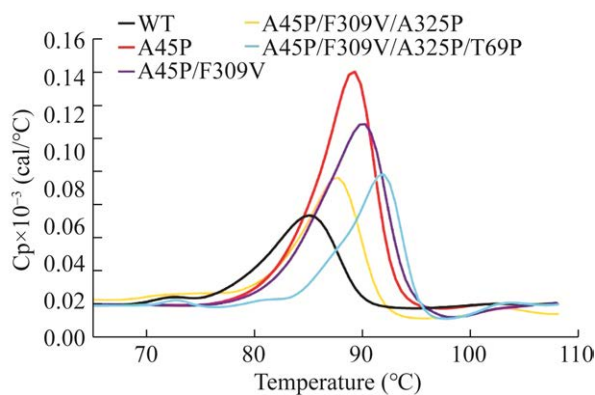


图 5 *CbXyn10C* 及其突变体的 DSC 检测峰图
Figure 5 DSC detection peak plot of *CbXyn10C* and its mutants.

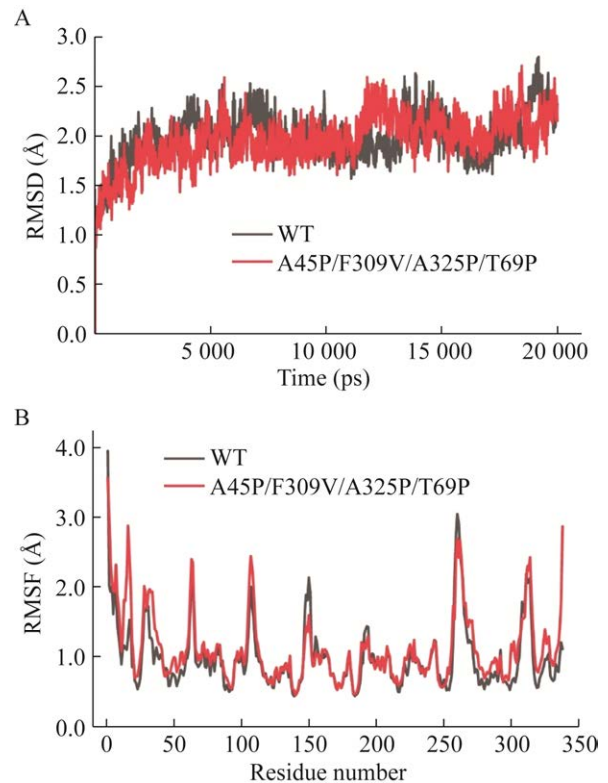


图 6 *CbXyn10C* 和 A45P/F309V/A325P/T69P 的 RMSD (A) 和 RMSF (B) 分析

Figure 6 RMSD (A) and RMSF (B) analysis of *CbXyn10C* and A45P/F309V/A325P/T69P.

下提高了酶的稳定性, 两个层面的分析结果相一致。

调取轨迹中 RMSD 数值最低的一帧构象, 通过软件 Discovery Studio 2017 对野生型和四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 进行氨基酸相互作用分析发现(图 7), 相较于野生型, 在突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 中预测到了更多的相互作用, 第 45 位丙氨酸突变成脯氨酸后导致 P45 与 H87 间多了一个氢键作用力, 在 309 位酪氨酸突变成缬氨酸后, V309 与 W305 间多了 π -烷基堆积作用力, 第 325 位丙氨酸突变成脯氨酸后导致 P325 与 I5 间增加了一个烷基作用力, 这 3 个作用力使得该木聚糖酶变得更加稳定。

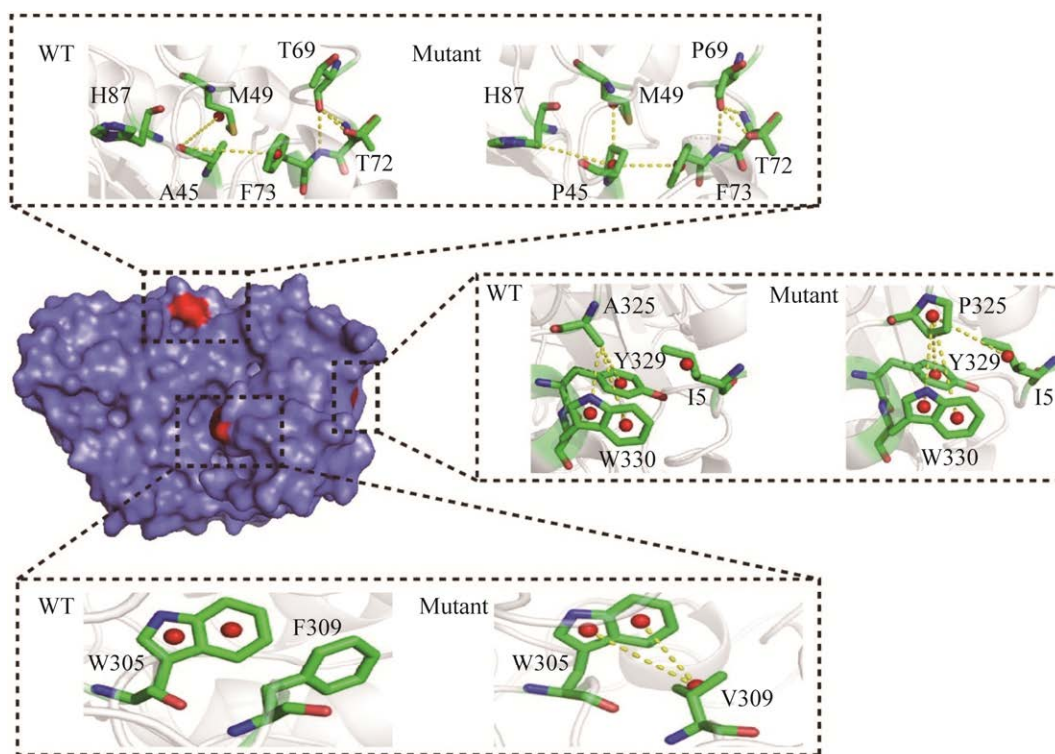


图 7 四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 突变位点氨基酸的相互作用网络

Figure 7 Interaction network of amino acids at four-point mutant A45P/F309V/A325P/T69P mutation sites.

3 讨论与结论

Loop 结构是蛋白质中的一种结构,它通常包含几个氨基酸残基,这些残基可以影响蛋白质的稳定性和功能^[21]。本研究通过将柔性氨基酸替换为刚性氨基酸脯氨酸构建的 7 个突变体 A45P、A56P、T69、Y254P、TN288P、R307P 和 A325P 中,与野生型相比,突变体 A45P 和 A325P 在 100 °C 的比活力分别提高 71.0% 和 64.0%,并且 A45P 在 85 °C 热处理 40 min 后的剩余酶活从 8.8% 提高到 41.9%,在 90 °C 热处理 4 min 后的剩余酶活从 26.0% 提高到 54.5%。结果表明将丙氨酸突变成脯氨酸会提高蛋白质的热稳定性,这可能是由于脯氨酸的侧链中含有更多的甲基基团,可以增加蛋白质的疏水性,从而提高其热稳定性。由于位点 Arg307 位于催

化口袋的活性 loop 区上,鉴于将该位点突变为脯氨酸后导致酶在 100 °C 的酶活降低,于是进一步设计了将邻近的苯丙氨酸突变为缬氨酸构建突变体 F309V,该位点的突变也提高了 *CbXyn10* 的热稳定性。缬氨酸比苯丙氨酸更稳定,它具有更高的疏水性和更强的氢键作用力,有助于增强蛋白质的稳定性^[22]。苯丙氨酸突变成缬氨酸可以改变蛋白质中的非极性官能团构成,从而影响蛋白质的稳定性和折叠状态^[23]。

芳香族簇是指具有芳香环结构的分子,它们的分子间作用力比较强,可以形成稳定的非共价键。通过在蛋白质的两端添加芳香族簇,可以增加蛋白质的稳定性,防止其在高温条件下因为蛋白质的折叠不稳定而失活^[24]。本研究通过这种策略构建的突变体在 100 °C 条件下的比活低于野生型,这可能是因为这 4 个突变位

点 V20F、D32Y、L299F 和 L319F 之间并未形成 π - π 堆积作用,反而将原来稳定的结构改变了,从而导致热稳定性降低。

为了提高 *CbXyn10C* 的耐热性,本研究在耐热性最好的单点突变体 A45P 的基础上,将获得的另外 3 个有益突变位点进行叠加。叠加突变是一种常用的改造酶性质的手法,可以同时调节酶分子内部的多个位点,从而提高其热稳定性和催化活性。随着突变位点的叠加,酶的热稳定性得到了逐步提升。四点突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 的耐热性最好,相较于野生型,在 100 °C 条件下的比活提高了 82.2%,最适温度提高了 5 °C,溶解温度 T_m 值提高了 6.8 °C,在 85 °C 处理 60 min 后剩余酶活分别从 6.7% 提高到 84.6%,在 90 °C 处理 10 min 后剩余酶活从 3.1% 提高到 60.4%。目前关于 GH10 家族木聚糖酶热稳定性的研究较少,其中,Abdul Wahab 等对 GH10 家族的木聚糖酶 CBMAI 756 (*XynA*) 进行改造,获得的突变体 H209N 的 T_m 值提高了 0.4 °C^[25]。Andrews 等对 GH10 家族的木聚糖酶 *CjXyn10A* 进行了定向改造,构建了三点突变体 D262N/A80T/R347C, T_m 值提高了 5.7 °C^[26]。由此可见,本研究构建的突变体 A45P/F309V/A325P/T69P 热稳定性大幅提高,其设计改造思路可以为改造 GH10 家族的木聚糖酶提供理论基础。

为了阐明突变体的耐热机制,本研究利用分子动力学模拟技术进行分析。经氨基酸相互作用力分析发现,4 个位点的突变引入了新的氢键作用力、 π - π 烷基堆积作用力和烷基作用力。局部作用力网络的改变优化了疏水作用网络(如苯丙氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸等),通过排斥水分子而相互靠近,进而导致酶的结构构象更加稳定^[27]。因此,由于突变引入的氢键作用力以及上述疏水作用网络的优化,使得酶的构

象更加稳定,这可能是突变体热稳定性提高的潜在原因。

本研究基于结构基础对嗜热木聚糖酶 *CbXyn10C* 进行热稳定性分子改良,有效地提高了其在 100 °C 的比活,极大地提升了其在 85 °C 和 90 °C 的热稳定性,不仅提高了木聚糖酶在饲料工业中的应用价值,而且为基于酶蛋白结构的稳定性分子改造提供了理论支持。

REFERENCES

- [1] CHANG XY, XU B, BAI YG, LUO HY, MA R, SHI PJ, YAO B. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171111.
- [2] CHENG YS, CHEN CC, HUANG CH, KO TP, LUO WH, HUANG JW, LIU JR, GUO RT. Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*: insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(16): 11020-11028.
- [3] DUARTE ME, ZHOU FX, DUTRA WM Jr, KIM SW. Dietary supplementation of xylanase and protease on growth performance, digesta viscosity, nutrient digestibility, immune and oxidative stress status, and gut health of newly weaned pigs[J]. Animal Nutrition, 2019, 5(4): 351-358.
- [4] CAPETTI CCM, VACILOTTO MM, DABUL ANG, SEPULCHRO AGV, PELLEGRINI VOA, POLIKARPOV I. Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(10): 169.
- [5] HAN NY, MA Y, MU YL, TANG XH, LI JJ, HUANG ZX. Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 131: 109422.
- [6] 黄志毅, 梁伟凡, 李阳源, 冯定远. 小麦型饲料中添加酸性木聚糖酶对肉鸡消化道食糜黏度的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(9): 5667-5679.
HUANG ZY, LIANG WF, LI YY, FENG DY. Effects of adding acid xylanase in wheat-type diet on viscosity

- of digestive tract chyme of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(9): 5667-5679 (in Chinese).
- [7] HAN HW, LING ZM, KHAN A, VIRK AK, KULSHRESTHA S, LI XK. Improvements of thermophilic enzymes: from genetic modifications to applications[J]. Bioresource Technology, 2019, 279: 350-361.
- [8] de SIMONE G, MONTI SM, ALTERIO V, BUONANNO M, de LUCA V, ROSSI M, CARGINALE V, SUPURAN CT, CAPASSO C, Di FIORE A. Crystal structure of the most catalytically effective carbonic anhydrase enzyme known, SazCA from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(9): 2002-2006.
- [9] de SOUZA AR, de ARAÚJO GC, ZANPHORLIN LM, RULLER R, FRANCO FC, TORRES FAG, MERTENS JA, BOWMAN MJ, GOMES E, Da SILVA R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 20-26.
- [10] LI GQ, CHEN XJ, ZHOU X, HUANG R, LI LB, MIAO YZ, LIU DY, ZHANG RF. Improvement of GH10 family xylanase thermostability by introducing of an extra α -helix at the C-terminal[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 515(3): 417-422.
- [11] LI GQ, ZHOU X, LI ZH, LIU YP, LIU DY, MIAO YZ, WAN Q, ZHANG RF. Significantly improving the thermostability of a hyperthermophilic GH10 family xylanase XynAF1 by semi-rational design[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(11): 4561-4576.
- [12] SUZUKI M, TAKITA T, KUWATA K, NAKATANI K, LI TY, KATANO Y, KOJIMA K, MIZUTANI K, MIKAMI B, YATSUNAMI R, NAKAMURA S, YASUKAWA K. Insight into the mechanism of thermostabilization of GH10 xylanase from *Bacillus* sp. strain TAR-1 by the mutation of S92 to E[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85(2): 386-390.
- [13] 邓巧平, 王龙, 谭曼利, 冯家勋, 刘君梁. 定点突变提高木聚糖酶 *Umxyn10A* 的热稳定性[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1137-1142.
DENG QP, WANG L, TAN ML, FENG JX, LIU JL. Site-specific mutation improves the thermal stability of *Umxyn10A*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(3): 1137-1142 (in Chinese).
- [14] XUE XL, WANG R, TU T, SHI PJ, MA R, LUO HY, YAO B, SU XY. The N-terminal GH10 domain of a multimodular protein from *Caldicellulosiruptor bescii* is a versatile xylanase/ β -glucanase that can degrade crystalline cellulose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(11): 3823-3833.
- [15] CHU YD, TU T, PENTTINEN L, XUE XL, WANG XY, YI ZL, GONG L, ROUVINEN J, LUO HY, HAKULINEN N, YAO B, SU XY. Insights into the roles of non-catalytic residues in the active site of a GH10 xylanase with activity on cellulose[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(47): 19315-19327.
- [16] DONG RY, LIAO M, LIU XQ, PENTTINEN L, HAKULINEN N, QIN X, WANG XL, HUANG HQ, LUO HY, YAO B, BAI YG, TU T. Effectiveness of ruminal xylanase with an extra proline-rich C-terminus on lignocellulosic biomass degradation[J]. Bioresource Technology, 2023, 372: 128695.
- [17] IHSANAWATI, KUMASAKA T, KANEKO T, MOROKUMA C, YATSUNAMI R, SATO T, NAKAMURA S, TANAKA N. Structural basis of the substrate subsite and the highly thermal stability of xylanase 10B from *Thermotoga maritima* MSB8[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2005, 61(4): 999-1009.
- [18] ZHOU C, XUE YF, MA YH. Enhancing the thermostability of α -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 by single proline substitution[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 12-17.
- [19] BURLEY SK, PETSKO GA. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization[J]. Science, 1985, 229(4708): 23-28.
- [20] PRIVETT HK, KISS G, LEE TM, BLOMBERG R, CHICA RA, THOMAS LM, HILVERT D, HOUK KN, MAYO SL. Iterative approach to computational enzyme design[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(10): 3790-3795.
- [21] 陈康太, 杨思文, 刁梦月, 王宵宵, 郭双, 李恩中, 李同彪. Loop 结构引入半胱氨酸对木聚糖酶 *XynASP* 热稳定性的影响[J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 106-112.
CHEN KT, YANG SW, DIAO MY, WANG XX, GUO S, LI EZ, LI TB. Effects of introducing cysteine into

- the loop structure on the thermal stability of xylanase XynASP[J]. *China Brewing*, 2022, 41(10): 106-112 (in Chinese).
- [22] HAGHANI K, KHAJEH K, NADERI-MANESH H, RANJBAR B. Investigation on the effects of three X→ histidine replacements on thermostability of alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(5): 592-599.
- [23] DIAO HW, ZHANG C, WANG SC, LU FX, LU ZX. Enhanced thermostability of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 by site-directed mutagenesis based on computer-aided rational design[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(7): 1339-1350.
- [24] HOBZA P. Stacking interactions[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008, 10(19): 2581.
- [25] ABDUL WAHAB MKHB, BIN JONET MA, ILLIAS RM. Thermostability enhancement of xylanase *Aspergillus fumigatus* RT-1[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 134: 154-163.
- [26] ANDREWS SR, TAYLOR EJ, PELL G, VINCENT F, DUCROS VMA, DAVIES GJ, LAKEY JH, GILBERT HJ. The use of forced protein evolution to investigate and improve stability of family 10 xylanases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 54369-54379.
- [27] PAL S, MITRA RK. Nonpolar hydrophobic amino acids tune the enzymatic activity of lysozyme[J]. *Biophysical Chemistry*, 2022, 288: 106842.