定点突变提高β-木糖苷酶 Xln-DT 的酶活

李 琦，童欣怡，姜云鹏，蒋玉洁，李冬冬，赵林果*

（1. 南方现代林业协同创新中心，江苏 南京 210037；2. 南京林业大学 化学工程学院，江苏 南京 210037）

摘要：笔者在前期研究中已从嗜热菌 *Dictyoglomus thermophilum* 中克隆并异源表达了一种β-木糖苷酶 Xln-DT，通过获得高酶活、酶学性质优异的β-木糖苷酶 Xln-DT 突变体，进而提高其在生物燃料、食品和医药等行业中的应用价值。基于提高比酶活的目的，通过生物信息学方法确定了β-木糖苷酶 Xln-DT 可突变的关键氨基酸位点，在 161、202 和 231 位点处分别引入 HIS/LEU、PHE/LEU 和 TRP，获得 Xln-DT 比酶活明显提高的突变型酶 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU，并分析比较突变前后的酶学性质。突变型酶 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的酶活较 Xln-DT 分别提高了 3.28 和 2.97 倍，比酶活分别提高了 2.86 和 2.54 倍。Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的最适 pH 下降明显，由 6.0 分别下降至 4.5 和 5.0。Xln-DT-202LEU 在 75 ℃下保温 2 h 酶活维持不变，较 Xln-DT 在 75 ℃下的温度稳定性相比有明显提高。Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 在 pH 4.0~7.0 的范围内保温 24 h，仍能保持 80%以上的剩余酶活力。突变型酶不但显著提高了酶的活力，而且热稳定性得到了极大的改善，为其在食品热加工等领域中的应用奠定了基础。

关键词：β-木糖苷酶；分子生物学；定点突变；酶活；热稳定性

中图分类号：Q 814　**文章编号：**1673-1689(2021)02-0041-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.006

Activity of β-Xylosidase Xln-DT Improved by Site-Directed Mutagenesis

LI Qi，*TONG Xinyi*，*JIANG Yunpeng*，*JIANG Yujie*，*LI Dongdong*，*ZHAO Linguo**

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, China; 2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: A β-xylosidase Xln-DT has been cloned and heterologously expressed from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* in the previous studies. A mutant of β-xylosidase Xln-DT with high enzyme activity and excellent enzymatic properties was obtained, in order to improve its vital application value in bio-fuel, food and medicine industries. The key amino acid mutation sites of β-xylosidase Xln-DT were obtained through bioinformatics methods to improve the specific enzyme activity. Amino acids HIS/LEU, PHE/LEU and TRP were introduced at sites 161, 202 and 231, respectively, and the constructed mutant enzymes Xln-DT-202PHE and Xln-DT-202LEU obtained significantly increased β-xylosidase activity. In addition, the enzymatic

收稿日期：2020-05-14

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2017YFD0601001)；南京林业大学大学生创新训练计划项目(201910298081Y)。

作者简介：李 琦(1988—)，女，博士，实验师，主要从事酶工程方面研究。E-mail：amanadahere@sina.com

*** 通信作者：**赵林果(1965—)，男，教授，博士研究生导师，主要从事林产资源生物化学品加工方面的研究。E-mail：njfu2304@163.com

properties before and after the mutation were analyzed and compared. The expressed enzyme activities of Xln-DT-202PHE and Xln-DT-202LEU were 3.28 and 2.97 times higher than that of Xln-DT, respectively, while their specific activities were 2.86 and 2.54 times higher than that of Xln-DT, respectively. The optimal pH of mutant enzyme Xln-DT-202PHE and Xln-DT-202LEU decreased significantly from pH 6.0 to pH 4.5 and pH 5.0, respectively. The enzyme activity of Xln-DT-202LEU remained unchanged when incubated at 75 ℃ for 2 h, which indicated significantly improved thermal stability compared with that of Xln-DT under 75 ℃. Xln-DT-202PHE and Xln-DT-202LEU could maintain more than 80% of the residual enzyme activity in the range of pH 4.0~7.0 after 24 h incubation. The mutant enzyme not only significantly improved the enzyme activity, but also greatly improved its thermal stability, laying a foundation for its wide application in food thermal processing and other fields.

Keywords: β-xylosidase, molecular biology, site-directed mutagenesis, enzyme activity, thermal stability

β-木糖苷酶（1,4-β-D-xylan xylohydrolase,EC 3.2.1.37)常与内切木聚糖酶联用,降解富含木聚糖的农林植物纤维原料,继而将木糖开发成可用于燃料、食品等行业中的系列化学品[1-2]。此外,β-木糖苷酶也被越来越多地应用于植物资源中带有木糖基的天然活性物质(如萜类、黄酮类、甾体类化合物)的生物转化,进而获得更强药理活性的天然产物衍生物[3-5]。无论是木聚糖的降解还是天然活性物质的生物转化,获得活性高、专一性强、酶学性质优异的β-木糖苷酶是关键的技术。

近年来,学者们已就β-木糖苷酶的来源、优良菌种的筛选、基因克隆和表达等方面进行了大量的深入研究[6-7]。然而,现有的β-木糖苷酶仍存在着含量少、酶活低、稳定性差、底物特异性不佳等缺点,远不能满足工业应用的需求。随着现代生物技术的不断革新,酶分子的体外定向进化技术已成为蛋白酶分子改造的有力工具[8]。周海岩等[9]利用定点饱和突变技术将L-脯氨酸-4-羟化酶(P4H)的酶活提高了58%。秦海彬等[10]在α-酮戊二酸半醛脱氢酶E120位点处引入了天冬氨酸后，酶活提高了322%。蔡刘滕子等[11]利用定点突变技术对黑曲霉来源的木聚糖酶进行热稳定性改造,突变酶的最适温度提高了5 ℃,45 ℃下的半衰期由7 min提高到15 min。李琦等[12]通过定点突变技术在木聚糖酶MxynB的相应位置引入二硫键，并通过基因融合技术在N端融合了来源于嗜热菌的纤维素结合域CBD,使原酶的温度稳定性显著提高。

由于嗜热菌 *D. thermophilum* 来源的β-木糖苷酶Xln-DT[13]在大肠杆菌中的表达量较低,笔者通过蛋白质结构模拟和分子对接等手段确定了β-木糖苷酶Xln-DT可突变的位点。利用反向PCR技术扩增突变基因、构建重组表达载体并获得突变酶,并对比分析了突变前后的酶学性质，旨在获得酶活高、耐热性能强的优势突变酶,为后续的实际应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10F′、*E.coli* BL21(DE3)和重组质粒pET28a-*xln-DT*:均由南京林业大学化学工程学院微生物技术研究室保藏;表达质粒pET28a(卡那霉素(kana)抗性):购自美国Novagen公司。

1.2 培养基

Lysogeny broth(LB)培养基:蛋白胨1 g、酵母提取物0.5 g、NaCl 1 g,溶于100 mL蒸馏水中,121 ℃灭菌20 min后备用,主要用于大肠杆菌菌种的活化及重组基因工程菌株的诱导表达。LB固体培养基则在液体培养基中加入质量分数2%的琼脂。

1.3 酶和化学试剂

Prime STAR HS DNA聚合酶、T4 DNA磷酸化激酶、T4 DNA连接酶、dNTP、DL 5 000 DNA Marker等:购自日本TaKaRa公司;蛋白质相对分子质量标准Marker：购自美国Promega公司；质粒小提试剂

盒、凝胶回收试剂盒、卡那霉素等:购自美国 Axygen 公司;胰蛋白胨、酵母提取物:购自英国 Oxoid 公司;对硝基苯基-β-L-木糖苷(*p*NPX):购自美国 Sigma 公司;其它常规试剂均为国产分析纯。引物合成及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 主要仪器

PCR 仪:德国 Eppendorf 公司产品;5415R 台式高速冷冻离心机、SX-500 全自动高温高压蒸汽灭菌锅:日本 Tomy 产品;凝胶成像仪:美国 Bio-rad 公司产品;ZHWY-2102C 摇床:上海智诚产品;SpectraMax190 全波长酶标仪:美国 Molecular Devices 公司产品。

1.5 蛋白质三维结构的预测和相关软件

利用分子生物学软件 DNAMAN 6.0 进行氨基酸序列分析并进行 Blast 比对。利用 PyMOL、Swiss Model 和 I-TASSER Server 软件进行 Xln-DT 蛋白结构模拟和活性催化中心预测。

基于 I-TASSER Server 对 Xln-DT 蛋白结构进行预测[14],在 I-TASSER Server 在线网站(https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)上输入β-木糖苷酶 Xln-DT 的氨基酸序列,得到蛋白质的三维预测结果及配体结合位点的具体信息。

1.6 酶与底物的分子对接

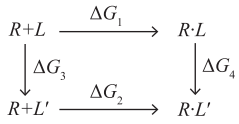
从 Pubchem 下载 *p*NPX 分子 2D 结构[15],并以 Sdf 格式保存,使用 Schrodinger 2015 对 *p*NPX 和β-木糖苷酶 Xln-DT 的蛋白质结构进行预处理,并使用 Glide 6.6[16]在该蛋白质的配体结合位点处准备晶格文件,根据 1.5 中获得的配体结合位点,将晶格中心坐标设置为 x:80.92,y:91.18,z:82.72,配体对接框长度 2.0 nm,蛋白质的范德华半径比例因子设为 0.8,绝对部分电荷的截断值设为 0.15。最后将预处理好的小分子 *p*NPX 在晶格文件中进行对接,软件运行后获得优化的预测对接构象。

1.7 氨基酸亲和性提高突变位点预测

基于分子对接的结果,使用 BioLuminate 1.8[17]对 *p*NPX 周围的氨基酸(活性口袋处的氨基酸)进行饱和突变,计算突变前后的亲和力变化,具体原理见图 1。根据突变能由高到低排序,挑选出突变能排序靠前的突变位点进行后续突变实验。计算时,将突变的氨基酸看作配体,余下的所有氨基酸看作受体。在此情况下,亲和力的改变可以用突变能 $\Delta\Delta G$(bind)来表征,该数值的负值代表着突变体比母体对小分子结合的更紧密。具体计算公式为:

$$\Delta\Delta G(\text{bind})=\Delta G_2-\Delta G_1=\Delta G_4-\Delta G_3 \quad (1)$$

式(1)中,ΔG_1 为非突变体自由能变化,kJ/mol;ΔG_2 为突变体自由能变化,kJ/mol;ΔG_3 为 BioLuminate 1.8 软件计算得出的非突变体和突变体之间的自由能变化,kJ/mol;ΔG_4 为 BioLuminate 1.8 软件计算得出的结合配体后非突变和突变体之间的自由能变化,kJ/mol。



R:蛋白质受体;L:配体;L':突变后的配体;$R+L/R+L'$:蛋白质分离的受体和配体;$R\cdot L/R\cdot L'$:蛋白质结合的受体和配体。

图 1 蛋白质亲和力改变的突变能计算原理图

Fig. 1 Schematic diagram of mutation energy calculation for protein affinity change

1.8 实验方法

1.8.1 定点突变引物设计 利用同源建模、生物信息学分析、分子对接等手段,改变β-木糖苷酶 Xln-DT 的部分氨基酸,设计突变位点,以嗜热菌 *D. thermophilum* DSM 3960 的 GH39 家族的β-木糖苷酶基因序列 *xln-DT* 为模板,设计带有酶切位点的引物,每个突变位点设计正反向两条寡核苷酸序列,见表 1。利用反向 PCR 技术获得突变序列。

表 1 定点突变引物表

Table 1 Nucleotide sequences of used primers

目标位点	核苷酸序列(5′-3′)
GLU161LEU	F1:CTCCCCAATTTAACCGTATTTTGGA R1:ATTCCAAATCTCAAAAGGCCATTGAGTAACC
GLU161HIS	F2:CATCCCAATTTAACCGTATTTTGGA R2:ATTCCAAATCTCAAAAGGCCATTGAGTAACC
PHE167ALA	F3:GCGTGGAAAGATGCAAATCAGGCAGAATAC R3:TACGGTTAAATTGGGCTCATTCCAAATCTCAA
CYS202PHE	F4:TTCGGTGGATCAGACTATTGGATAACTGATTT R4:GATTGCAGGTCCTCCAACCTTTATGTTTTC
CYS202LEU	F5:CTCGGTGGATCAGACTATTGGATAACTGATTT R5:GATTGCAGGTCCTCCAACCTTTATGTTTTC
TYR231TRP	F6:TGGACAGGCAAACCTCCTATATATACCCCT R6:GGCATGTCGAGTTAAAAAGTCTACAGGTAC

注:下划线部分为引入的突变氨基酸碱基序列。

1.8.2 定点突变实验方案 将上、下游引物用 TE

缓冲溶液稀释成 10 μmol/L 工作液,以 pET28a-*xln-DT* 为模板,利用反向 PCR 技术获得重组突变表达质粒。

PCR 反应体系如下:0.5 μL pET28a-*xln-DT*,各 1.0 μL 的引物 F 和引物 R,4.0 μL dNTP Mixture,10.0 μL 5×PS 缓冲液,0.5 μL Prime STAR HS DNA 聚合酶,44 μL 蒸馏水。

PCR 反应条件如下:98 ℃保温 5 min,98 ℃变性 0.5 min,60 ℃退火 0.5 min,72 ℃延伸 4.5 min,18 个循环,72 ℃延伸 10 min 后于 4 ℃保持。将扩增后 PCR 片段于 37 ℃下磷酸化反应 1 h,加入 1 μL T4 ligase 连接酶,于 16 ℃下连接 3 h 后在 42 ℃水浴锅中热击转化至大肠杆菌 *E.coli* Top 10F′感受态细胞中,挑取单菌落接入到含有 Kana 抗性的 LB 培养基中过夜培养,提取质粒后进行测序鉴定。

1.9 突变酶的酶活测定、纯化及 SDS-PAGE 分析

将测序正确的重组表达质粒 pET-28a-xln-DT-161、pET-28a-xln-DT-167、pET-28a-xln-DT-202 和 pET-28a-xln-DT-231 热击转化至大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中。挑取单菌落至 5 mL 的 LB 液体培养基中,加入 0.01 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)过夜诱导表达后离心,沉淀加入柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.0)重悬,经超声破碎后离心 10 min,上清液即为粗酶液。将收集的粗酶液进行酶活测定,以 pNPX 为底物,根据文献[18]进行酶活测定。酶活定义如下:75 ℃、pH 6.0 时每分钟产生摩尔质量为 1 mmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个酶活单位。

酶的纯化方式如下:Ni^{2+}亲核层析柱平衡后,将粗酶液以 1 mL/min 上样,将 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液以同流速洗去未吸附的酶蛋白及杂质;随后用 200 mmol/L 的咪唑缓冲液进行洗脱,并收集蛋白质;纯化后的酶液经透析除盐后进行 SDS-PAGE 分析。目的蛋白质采用 Bradford 法进行蛋白质浓度的测定。酶活(A)以及比酶活(B)的计算公式如下:

$$A\,(\mathrm{U/mL}) = c\times V_1\times N/(t\times V_2) \quad (2)$$

$$B\,(\mathrm{U/mg}) = A/C \quad (3)$$

式中:c 为由对硝基苯酚标准方程计算出的酶反应后的对硝基苯酚的量,μmol;t 为酶与底物反应时间,min;V_1 为反应体系总体积,mL;V_2 为酶液体积,mL;N 为酶液稀释倍数;C 为蛋白质质量浓度,mg/mL。

1.10 突变酶的酶学性质分析

最适温度:在 pH 6.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液中,分别测定突变酶和 Xln-DT 在 65、70、75、80、85 ℃下的酶活,以测定的最高酶活为 100%计算相对酶活,最高酶活对应的温度即为最适温度。

最适 pH:在各自的最适温度下,分别测定突变酶和 Xln-DT 在 pH 值为 4.5、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 下的酶活,以测定的最高酶活为 100%计算相对酶活,最高酶活对应的 pH 即为最适 pH。

温度稳定性:将酶质量浓度分别为 1.10、1.25、1.29、1.09 mg/mL 的野生型酶 Xln-DT、突变酶 Xln-DT-202PHE、Xln-DT-202LEU、Xln-DT-167ALA 在 75、85 ℃下分别保温 30、60、90、120、180、240 min,以未育温的酶液所测定的酶活为 100%计算剩余酶活力,即为温度稳定性。

pH 稳定性:在 4 ℃下,分别将突变酶和 Xln-DT 置于不同 pH 值(4.0~7.0)的柠檬酸-磷酸盐缓冲液中保存 24 h,在最适温度及最适 pH 下测定其残余酶活力,以未经 pH 缓冲液处理的酶液所测定的酶活为相对 100%,即为 pH 稳定性。

耐木糖系数 K_i:在添加不同浓度木糖的反应体系中,在最适温度和 pH 下测定突变酶和 Xln-DT 的酶活力值,以不加糖所测的酶活力值为 100%,计算并获得不同木糖浓度下重组酶的相对酶活力值,以相对酶活力值为 50%时所对应的木糖浓度即为 K_i。

动力学常数:以 *p*NPX 为底物,底物浓度范围为 0.01~3.00 mmol/L,分别测定纯化后的突变酶和 Xln-DT 的酶活。采用双倒数作图法[19]计算突变酶和 Xln-DT 的动力学参数(V_{max},K_m,V_{max}/K_m)。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的选择

由于嗜热菌 *D. thermophilum* 来源的 Xln-DT 蛋白结构尚未解析,基于 PDB 在线数据库中来源于 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* 的 GH 39 家族的 β-木糖苷酶 XynB (1UHV)[20] 与 Xln-DT 具有 70.18%的同源性。利用 Swiss-Model 在线软件对 Xln-DT 进行同源建模,使用可视化工具 PyMOL 对 Xln-DT 进行结构模拟,结果见图 2。利用Glide 6.6 软件对人工底物 *p*NPX 与 β-木糖苷酶Xln-DT 进行分子对接,计算筛选出 3 个正相关的关键突变位点(GLU161、CYS202 和 TYR231)和 1 个阴性对照位

点(PHE167)，见表 2。

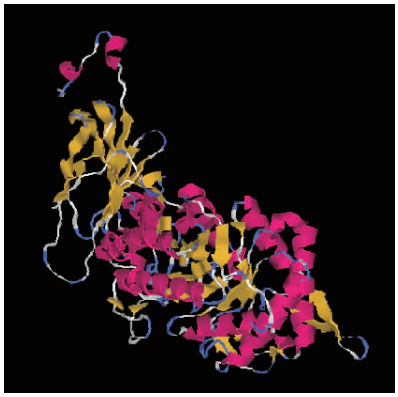


图 2　β-木糖苷酶 Xln-DT 的分子模型

Fig. 2　Molecular model of Xln-DT

表 2　Xln-DT 突变能计算

Table 2　Calculation of Xln-DT mutation energy (binding)

排序	突变体	ΔΔ*G* /(kJ/mol)	效果
1	CYS202PHE	−5.10	+
2	GLU161HIS	−4.81	+
3	CYS202LEU	−4.81	+
4	TYR231TRP	−4.35	+
5	GLU161LEU	−3.39	+
316	PHE167ALA	5.56	−

注：ΔΔ*G* 表示突变前后的亲和力大小差值；+为正突变；−为负突变。

2.2　突变体重组表达质粒的构建和表达

以重组表达质粒 pET-28a-Xln-DT 为模板，通过反向 PCR 引入 6 个位点的氨基酸基因，经测序验证所有点突变编码正确。将突变正确的质粒转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞，随机挑取转化子进行诱导表达，诱导表达结果见图 3。当 GLU161 突变成 HIS 和 LEU、TYR231 突变成 TRP 之后，酶活丧失，而 CYS202 突变成 PHE 和 LEU 后酶活分别提高了 3.28 和 2.97 倍，而 PHE167 突变成 ALA 之后酶活降低了 50%。结合表 2 中突变能的预测数值可知，除去经试验验证的酶活丧失的阴性突变体 GLU161HIS、TYR231TRP、GLU161LEU 外，突变体 CYS202PHE、CYS202LEU、PHE167ALA 的 ΔΔ*G* 逐次升高，分别为−1.22、−1.15、1.33，而实验结果显示这 3 个突变体表达的酶活则依次降低，由此可见 ΔΔ*G* 的数值为负值且数值越小，突变体比野生型原酶对小分子的结合越紧密，理论上较野生型原酶的亲和力就越强，从而可通过提高突变体的比酶活来提高表达的酶活力。因此，为了验证此猜想，作者对各突变体及野生型原酶进行了纯化，以比较其比酶活、动力学参数等。

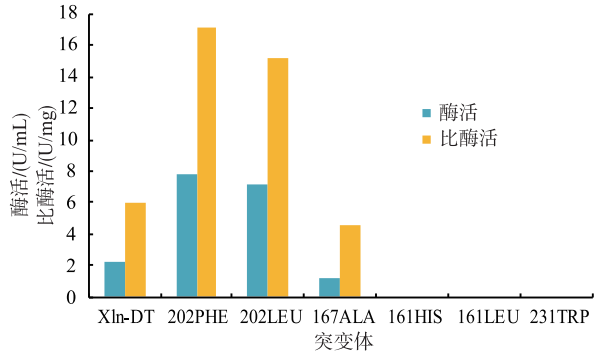
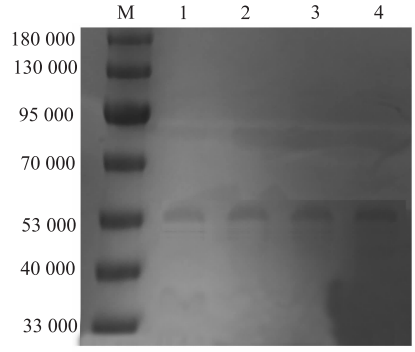


图 3　酶活提高关键位点突变后的酶活

Fig. 3　Enzyme activity after mutation of key site for enzyme activity improvement

收集发酵后的 Xln-DT 及突变体经镍柱纯化后，获得电泳纯的 Xln-DT、Xln-DT-202PHE、Xln-DT-202LEU 和 Xln-DT-167ALA 多位点突变体，见图 4。将纯化后的 Xln-DT 和突变体分别测定蛋白质质量浓度和比酶活，其中，CYS202 突变成 PHE 和 LEU 后，比酶活分别提高了 2.86 和 2.54 倍，由此可知，202 位点为酶活提高的关键氨基酸位点。



M：蛋白质 Marker；1：Xln-DT；2：Xln-DT-202PHE；3：Xln-DT-202LEU；4：Xln-DT-167ALA。

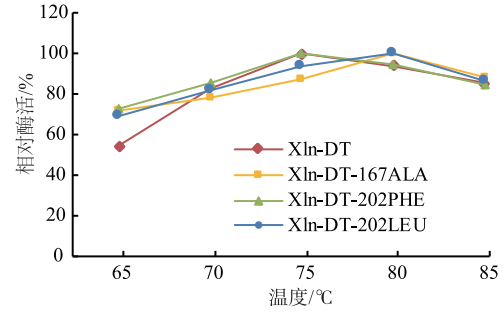
图 4　重组酶 Xln-DT 及突变体的蛋白质电泳图

Fig. 4　SDS-PAGE of recombinant protein Xln-DT and 202/167 mutants

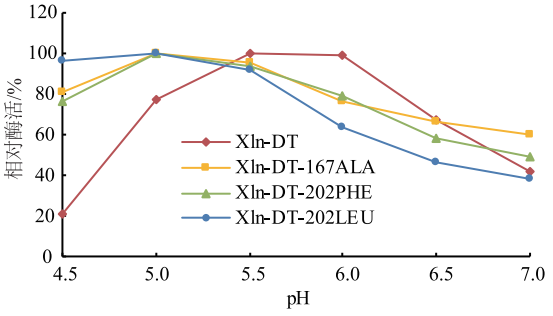
2.3　突变体的酶学性质研究

2.3.1　*突变体的最适温度和最适 pH*　突变体酶和 Xln-DT 的最适温度见图 5(a)。Xln-DT 的最适温度为 75 ℃，突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-167ALA 的最适温度维持不变，而 Xln-DT-202LEU 则升高至 80 ℃。

突变体酶和 Xln-DT 的最适 pH 见图 5(b)。Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的最适 pH 由原酶的 6.0 分别下降至 4.5 和 5.0，而 Xln-DT-167ALA 则降为 5.0。



(a)最适温度

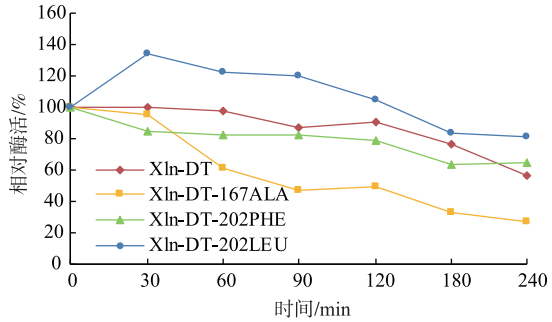


(b)最适pH

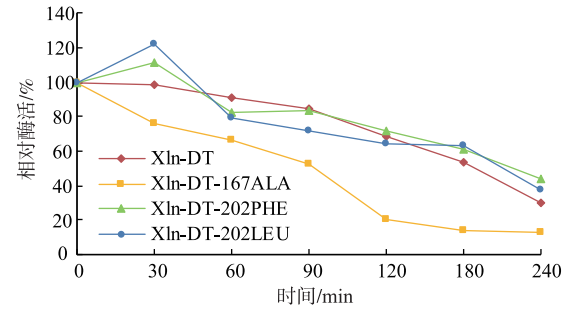
图 5　202/167 突变体的最适温度和最适 pH

Fig. 5　Optimal temperature and pH values of 202/167 mutants

2.3.2　*突变体的温度稳定性和 pH 稳定性*　对突变体酶和 Xln-DT 在 75、85 ℃下的热稳定性进行研究，结果见图 6。突变体 Xln-DT-202PHE 在 75 ℃下的温度稳定性有显著提高，保温 2 h 后，剩余酶活力仍能保持 100%。而突变体 Xln-DT-167ALA 在 75、85 ℃下的温度稳定性均有明显下降。由图 1 可知，配体的自由能不变，所以当突变体的 $\Delta\Delta G$ 为负值时，可理解为突变酶蛋白质的自由能均小于野生型酶蛋白的自由能，而自由能越小酶越稳定，因此表现为突变酶的热稳定性提高。



(a) 75 ℃



(b) 85 ℃

图 6　202/167 突变体的温度稳定性

Fig. 6　Temperature stability of mutants 202/167

突变体酶和 Xln-DT 的 pH 稳定性结果见图 7。突变体 Xln-DT-202PHE、Xln-DT-202LEU 和 Xln-DT-167ALA 在 pH 值为 4.0~7.0 的范围内稳定性较原酶略有下降，但仍能保持 80%以上的相对酶活力。

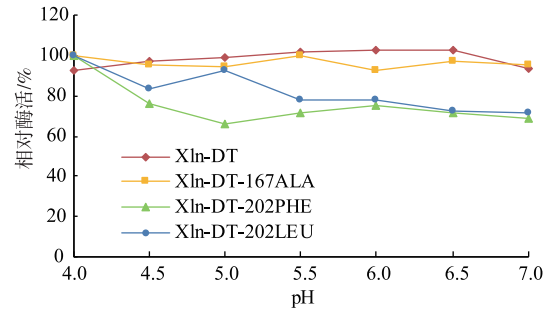


图 7　202/167 突变体的 pH 稳定性

Fig. 7　pH stability of 202/167 mutants

2.3.3　*突变体的耐糖系数 K_i 和动力学参数*　将纯化后的 Xln-DT 和突变体 Xln-DT-202PHE、Xln-DT-202LEU、Xln-DT-167ALA 分别测定耐糖系数 K_i 和动力学常数，结果见表 3。其中，突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的 K_m 值较原酶 Xln-DT 相比下降明显，说明其对 *p*NPX 的亲和力提高了，这与预测的 $\Delta\Delta G$ 结果一致，见表 2。突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 突变后 $\Delta\Delta G$ 为负值，对配体的亲和力更强；突变后的 K_i 系数显著降低，由原酶的 3 394 mmol/L 降低到 249 mmol/L 和 592 mmol/L，但仍要高于已报道的 β-木糖苷酶，尤其是 GH 3 家族来源的 β-木糖苷酶[18]。而突变体 Xln-DT-167ALA 动力学常数 K_m、V_{max} 变化不大，耐糖系数 K_i 则下降至 1 023 mmol/L。

表 3 202/167 突变体耐糖系数和动力学参数

Table 3 Xylose tolerance coefficient and kinetic parameters of 202/167 mutants

突变体	参数			
	K_i/(mmol/L)	K_m	V_{max}/(U/mg)	V_{max}/K_m
Xln-DT	3 394	2.54	13.58	5.35
Xln-DT-202PHE	249	1.78	11.92	6.37
Xln-DT-202LEU	592	1.41	8.29	5.88
Xln-DT-167ALA	1 023	2.56	12.62	4.93

3 结 语

以来源于 *D. thermophilum* 的β-木糖苷酶 Xln-DT 为研究对象，通过分子对接、定点突变和酶学性质分析等手段，对 Xln-DT 的酶活提高关键位点进行研究，主要结论如下：

1）利用 I-TASSER Server 在线软件对 Xln-DT 进行蛋白质结构预测，利用 *p*NPX 与 Xln-DT 分子对接计算筛选出基于酶活提高的关键氨基酸位点 202，并获得突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU。

2）与 Xln-DT 相比，突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的酶活分别提高了 3.28 和 2.97 倍，比酶活分别提高了 2.86 和 2.54 倍。K_m 值也较原酶小，说明突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 对 *p*NPX 的亲和力提高，但突变后的 K_i 系数显著降低。

3）与 Xln-DT 相比，突变体 Xln-DT-202PHE 和 Xln-DT-202LEU 的最适温度维持不变；最适 pH 则下降明显。突变体 Xln-DT-202LEU 的温度稳定性有显著提高；而所有突变体的 pH 稳定性均有不同程度下降，但仍能保持 80%以上的相对酶活力。

研究结果不但显著提高了酶的活力，而且热稳定性也得到显著改善，从而为该酶的进一步改造和实际应用奠定了基础。

参考文献：

[1] ALVAREZ C，REYES-SOSA F M，DIEZ B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood[J]. **Microbial Biotechnology**，2016，9(2)：149-156.

[2] 汤勇，蔡俊. β- 木糖苷酶的研究进展[J]. 中国酿造，2018，37(10)：14-19.

[3] LI N，HAN X W，XU S J，et al. Glycoside hydrolase family 39 β-xylosidase of *Sphingomonas* showing salt/ethanol/trypsin tolerance，low-pH/low-temperature activity，and transxylosylation activity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2018，66(36)：9465-9472.

[4] LI Q，WU T，ZHAO L G，et al. Highly efficient biotransformation of astragaloside IV to cycloastragenol by sugar-stimulated β-glucosidase and β-xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**，2019，29(12)：1882-1893.

[5] SHIN K C，SEO M J，OH D K. Characterization of β-xylosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and its application to the production of ginsenosides Rg1 and Rh1 from notoginsenodises R1 and R2[J]. **Biotechnology Letters**，2014，36(11)：2275-2281.

[6] CORREA J M，CHRISTI D，TORRE C L D，et al. High levels of β-xylosidase in *Thermomyces lanuginosus*：potential use for saccharification[J]. **Brazilian Journal of Microbiology**，2016，47(3)：680-690.

[7] KNOB A，TERRASAN C R F，CARMONA E C. β-Xylosidases from filamentous fungi：an overview[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**，2010，26(3)：389-407.

[8] 平丽英，柳志强，薛亚平，等. 酶的分子定向进化及其应用[J]. 基因组学与应用生物学，2009，28(5)：1020-1025.

[9] 周海岩，李会帅，王培，等. 定点饱和突变提高 L- 脯氨酸 -4- 羟化酶的酶活[J]. 发酵科技通讯，2018，47(4)：193-198.

[10] 秦海彬，熊涛，张博，等. α- 酮戊二酸半醛脱氢酶的定点突变及酶学性质变化[J]. 生物技术通报，2017，33(8)：180-185.

[11] 蔡刘滕子，张米帅，何优，等. V1C、G116D、N171H 定点突变对黑曲霉(*Aspergillus niger*)XZ-3S 木聚糖酶 XynZF-2 热稳定性的影响[J]. 生物技术，2018，28(3)：249-254.

[12] 李琦，蒋雯怡，孙雨薇，等. *Aspergillus niger* NL-1 来源的木聚糖酶的耐热性能改造及其在水解木聚糖中的应用[J]. 化工进

展,2019,38(2):1038-1044.
[13] LI Q,WU T,QI Z P,et al. Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39 β-xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*[J]. **BMC Biotechnology**,2018,18(1):29.
[14] YANG J,YAN R,ROY A,et al. The I-TASSER suite:protein structure and function prediction[J]. **Nature Methods**,2015,12:7-8.
[15] WANG Y L,XIAO J,SUZEK T O,et al. PubChem:a public information system for analyzing bioactivities of small molecules[J],**Nucleic Acids Research**,2009,37:623-633.
[16] HALGREN T A,MURPHY R B,FRIENSNER R A,et al. Glide:a new approach for rapid,accurate docking and scoring. 2. enrichment factors in database screening[J]. **Journal of Medicinal Chemistry**,2004,47(7):1750-1759.
[17] ZHOU J,BAO L,CHANG L,et al. Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from yak rumen metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2012,54:79-87.
[18] SHI H,LI X,GU H X,et al. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant β-xylosidase/α-arabinosidase from *Thermotoga thermarum*[J]. **Biotechnology for Biofuels**,2013,6(1):27.
[19] XUE F,LIU Z Q,WANG Y J,et al. Biochemical characterization and biosynthetic application of a halohydrin dehalogenase from *Tistrella mobilis* ZJB1405[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2015,115:105-112.
[20] YANG J K,YOON H J,AHN H J,et al. Crystal structure of β-D-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*,a family 39 glycoside hydrolase[J]. **Journal of Molecular Biology**,2004,335(1):155-165.

科　技　信　息

欧盟评估一种食品酶葡聚糖酶的安全性

2020 年 12 月 9 日,欧盟食品安全局就一种食品酶葡聚糖酶(dextranase)的安全性评价发布意见。

据了解,这种食品酶是由 *Collariella gracilis* 菌株 ATCC - 16153 生产的,旨在用于糖的生产和加工中。经过评估,专家小组认为,在预期的使用条件下,不能排除饮食暴露引起过敏和诱发反应的风险,但这种情况发生的可能性很低。根据提供的数据,小组得出结论,该食品酶在预期的使用条件下不会引起安全隐患。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估一种食品酶葡聚糖酶的安全性 [EB/OL]. (2020-12-10). http://news.foodmate.net/2020/12/579484.html