



新型甘露聚糖酶-乙酰酯酶双功能酶的功能和结构域协同研究

刘亮, 刘佳文, 王若楠, 张瑜, 李宝珍, 袁红莉*

中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 农业部土壤微生物学重点实验室, 北京 100193

摘要: 【目的】分析鉴定高效木质纤维素降解菌群 EMSD5 来源的新型甘露聚糖酶-乙酰酯酶双功能酶 44884, 解析催化域间的协同关系, 以及碳水化合物结合模块(CBM)对催化域特性的影响, 拓展对该类双功能酶的认识, 为甘露聚糖酶的升级改造和应用提供依据。【方法】通过大肠杆菌异源表达甘露聚糖酶-乙酰酯酶双功能酶 44884, 并构建截短和定点突变的突变体, 利用 TLC 和 DNS 法比较野生型和突变体的酶学性质。【结果】成功对 44884 全长和突变蛋白进行克隆表达, 并发现 44884 中 2 个催化域能够彼此促进各自产物的释放, 而且以双功能酶形式存在时, 这种促进效果更为明显。44884 中的 2 个 CBM65 均有甘露聚糖和结晶纤维素结合活性, 且 CBM65 的存在并不改变甘露聚糖酶和乙酰酯酶的最适反应条件和水解模式。虽然 CBM65 显著降低了 2 个催化域的热稳定性, 但水解天然底物时, 2 个 CBM65 对各自临近催化域的水解具有明显的促进效果。【结论】本研究首次发现并探究了新型甘露聚糖酶和乙酰酯酶形成的双功能酶 44884 的功能, 解析了催化域之间高效的协同效应, 以及新型甘露聚糖结合模块 CBM65 对双功能酶水解的促进作用。

关键词: 双功能酶, 甘露聚糖酶, 乙酰酯酶, 结构域协同, 碳水化合物结合模块

木质纤维素储量丰富且廉价的特性使其成为生产生物质能源和其他生物基产品的重要原料, 但木质纤维素复杂的组分和特殊的抗降解结构仍然是目前酶解转化面临的巨大挑战^[1]。其中半纤维素通过结合纤维素和木质素而对水解造成的阻碍是目前行业中面临的重大难题, 因此, 越来越多的研究通过挖掘高效的半纤维素酶制

剂来促进商业纤维素酶的水解效率^[2-4]。甘露聚糖是半纤维素的重要组成部分之一, 其在木质纤维素中的占比能够达到 15%–25%^[5]。甘露糖通过 β -1,4-糖苷键连接形成主链结构, 部分甘露糖可被葡萄糖单元取代或者发生半乳糖和高达 20%–30%的乙酰化修饰^[6-7], 这种侧链修饰极易对水解酶形成空间位阻, 影响酶与底物的结合, 水解效率下降

基金项目: 农业生物技术国家重点实验室开放研究重点课题(2018SKLAB6-28)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-82733349; E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-05-07; 修回日期: 2020-08-17; 网络出版日期: 2020-10-21

和甘露糖的可发酵性^[8]。利用预处理技术去除甘露聚糖及其侧链结构,提高木质纤维素的酶解效率是目前研究的普遍方法,但考虑到甘露聚糖较高的含量,以及对木质纤维素全组分高效转化的需求,最大化包括甘露聚糖在内的半纤维素的利用是目前生物质转化产业的重要目标。酶法转化甘露聚糖组分不仅可以提高木质纤维素的降解性,而且甘露寡糖等水解产物作为益生元可以进一步提高木质纤维素的商业价值^[9],是半纤维素资源高值、绿色转化的有效手段。

内切甘露聚糖酶是一类能够水解不同甘露聚糖主链的酶类,根据蛋白序列的相似性和结构特征,甘露聚糖酶主要分布在 4 个糖苷水解酶(glycosyl hydrolase, GH)家族,分别为 GH5、26、113 和 134^[10],大部分集中于 GH5 和 26 家族。目前甘露聚糖水解脱化的研究更多聚焦于主链的降解以及半乳糖侧链形成的位阻效应^[11],但乙酰基团在甘露聚糖水解脱过程中造成的阻碍作用却未获得足够的关注。在木聚糖的降解中,乙酰基团的去除能够同时促进木聚糖主链的水解^[12],而且该水解过程可以由木聚糖酶和酯酶形成的双功能酶一步完成^[13-14],然而同时包含甘露聚糖酶和乙酰酯酶催化域的双功能酶仍未见报道,其结构域间的协同模式仍有待进一步揭示。此外,基于对 *Cellvibrio* 属来源的甘露聚糖酶的分析,发现 GH26 家族甘露聚糖酶可能偏向于水解可溶性甘露聚糖,而 GH5 家族的甘露聚糖酶则更偏向于水解不溶性甘露聚糖^[15-16],这也暗示细菌来源的 GH5 家族甘露聚糖酶在木质纤维素水解转化中可能具有更高的实际应用价值。但是目前甘露聚糖酶促酶解研究几乎都集中于 *Trichoderma reesei*^[17]和其他真菌^[18]来源的酶,而针对细菌来

源的 GH5 家族的甘露聚糖酶的研究依然很少。

除了包含多个催化域,大量细菌来源的多功能酶同时含有多个碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM)^[19-20],并承担重要功能。高效双功能酶 CelA 中包含 3 个 CBM (GH9-CBM3-CBM3-CBM3-GH48),并发挥不同功能,其中 2 个 CBM 表现出极强纤维素结合能力,而另一个主要发挥辅助功能。当 3 个 CBM 同时存在时,该酶能够从主要水解底物表层转变为向深层降解,在底物中形成大量空腔结构^[21]。Gavrilov 等^[22]将来源于 *Thermococcus* sp.的多催化域酶 MDG 中的 2 个 CBM3 截掉后,发现该酶对葡聚糖、微晶纤维素、甘露聚糖和木聚糖的催化能力均显著下降。由此可见,多 CBM 在促进多催化域酶与底物的结合、改变酶的作用方式、提高酶的活性层面都发挥了重要作用,在木质纤维素的转化中具有巨大的应用潜力。细菌来源的甘露聚糖酶大部分携带一个或多个 CBM,但是多 CBM 在甘露聚糖酶及其构成的双功能酶中所发挥的功能仍然不明确,这也限制了高效甘露聚糖酶制剂的开发与应用。

本实验室前期从自然环境中富集得到了一个高效且稳定的木质纤维素降解菌群 EMSD5^[23]。宏基因组和蛋白组分析结果表明该菌群中含有大量多催化域酶和多 CBM 酶,以秸秆为唯一碳源诱导菌群时,发现一个包含甘露聚糖酶催化域、酯酶催化域和 2 个 CBM65 结构的多功能酶 44884 始终处于高表达的状态,暗示其在天然甘露聚糖转化过程中的重要作用。本文对该双功能酶进行异源表达,并通过构建截短和突变蛋白研究两个催化域间的协同关系,以及 2 个 CBM65 对 2 个催化域的影响。这也是首次报道包

含甘露聚糖酶催化域的双功能酶，并揭示了不同催化域间的协同作用和多 CBM 在该双功能酶中的功能，为高效多功能酶的构建及酶制剂的人工复配提供了实验和理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

棕榈粕由中国科学院过程工程研究所韩业君研究员惠赠，并进行汽爆处理^[24]；油松采集自中国农业大学校园，粉碎后过 50 目筛，于 60 °C 烘干备用。槐豆胶(locust bean gum, LBG)、瓜尔胶(guar gum, GG)、乙酸对硝基苯酯(4-nitrophenyl acetate, pNPAc)购自 Sigma 公司。魔芋葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM)购自合肥博美生物科技有限公司。乙酰化魔芋葡甘聚糖 A-KGM 的制备如文献[7]所述。TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 购自 Merck KGaA 公司。*Escherichia coli* DH5 α 和 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司。原核表达质粒 pET-30a(+)由本实验室保存。细菌菌株 EMSD5 由本实验室保存。

1.2 重组蛋白的表达及纯化

以 EMSD5 基因组 DNA 为模板，利用特异性引物(表 1)，扩增目的片段，连接至 pET-30a(+), 构建重组质粒。将含有正确目的片段的重组质粒转化至表达菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)进行诱导表达后收集菌体，采用超声破碎法获取胞内目的蛋白，进一步采用 Ni 柱亲和层析法对胞内上清液进行纯化，得到重组蛋白。蛋白浓度按照 5 \times Bradford Protein Assay Reagent 说明书进行测定。

1.3 酶学特性的测定

甘露聚糖酶活性测定：用 0.2 mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.5)配制 0.4% (W/V) KGM 底物，按以下体系进行反应：底物(90 μ L)，适当稀释的酶液(10 μ L)；涡旋混匀后于 50 °C 准确反应 5 min，加入 300 μ L DNS 试剂终止反应，混匀后短暂离心。沸水浴 5 min 显色，用冰水混合物终止反应。加入 800 μ L 水稀释，混匀，13523 \times g 离心 1 min，测量上清液的 OD₅₄₀。根据标曲计算还原糖释放量和酶活。

表 1. 引物名称和序列

Table 1. Primers used in this study

Names	Sequences (5'→3')
44884-F1	CGCGGATCCGCAACAGGTACAGCCGCTGGTTTCC
44884-F2	CGCGGATCCACTTTTTATGCCTTCTTCC
44884-F3	CGCGGATCCCAAGAGTCAAAGGTACC
44884-F4	CGCGGATCCGGAACATTAATAAGCGCAGAC
44884W362A-F	TGCATCTGCAGCGACAGATGTATTATCTTTCACAACCTGTA
44884-R1	CCGCTCGAGCCAGCCCATAACATCTTTGATATAT
44884-R2	CCGCTCGAGATAGTCTGCTGACTCTAAT
44884-R3	CCGCTCGAGATAATCAAATGATTTTAA
44884-R4	CCGCTCGAGAAAAACAGAACAGATATTAG
44884W362A-R	GATTTATTACCACTGA

酯酶活性测定: 称取 0.0181 g *p*NPAc, 用 1 mL 乙醇溶解后取 100 μ L 加入到 7.9 mL 0.2 mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.5)中作为底物工作液。按照以下体系进行反应: 950 μ L 底物, 适当稀释的酶液 (50 μ L), 涡旋混匀后于 50 $^{\circ}$ C 准确反应 15 min, 测量溶液的 OD_{405} 。根据标曲计算 *p*NP 释放量和酶活。

最适温度的测定: 用最适 pH 缓冲液配制底物溶液和酶溶液, 在梯度温度条件下测量酶活性, 确定最适温度。

最适 pH 的测定: 配制梯度 pH 值的底物溶液和酶溶液。在酶最适反应温度条件下测量酶活性, 确定最适 pH。

温度稳定性的测定: 将酶溶液置于 50 $^{\circ}$ C 条件下酶孵育不同的时间后, 在最适条件下测量酶活性。

1.4 酶动力学参数的测定

用最适 pH 值的缓冲液配制 0.1%–1.0% (*W/V*) 的底物溶液, 在最适温度条件下测量酶活。利用双倒数作图法计算 K_m 和 k_{cat} 。

1.5 水解产物的 TLC 分析

用去离子水配制 0.5% (*W/V*) 的底物溶液和 400 nmol/L 的酶溶液。底物和酶溶液各 5 μ L, 充分混匀后反应 0.5 h。反应结束后取 6 μ L 点样至硅胶板上, 按文献所述方法进行显色^[25]。

1.6 CBM65 的底物结合实验

利用亲和电泳的方法检测 CBM65 对可溶性底物的结合能力。蛋白总上样量 5 μ g, 以等量 BSA 作为对照样品。冰浴电泳后染色并脱色, 观察蛋白条带在无底物和含底物胶上的迁移。计算各蛋白相对于 BSA 的迁移率 R_f (R_f = 目的蛋白条带与分离胶上沿距离/BSA 条带与分离胶上沿距

离); 计算蛋白在含底物胶上的 R_f 与无底物分离胶上 R_f 的比值 R_s (R_s = 目的蛋白在含底物分离胶中的 R_f /无底物对照分离胶中的 R_f), $R_s > 0.95$ 时认为该蛋白与相应底物无结合能力, 标记为“-”; $0.95 \geq R_s > 0.8$ 时认为该蛋白与相应底物具有弱结合能力, 标记为“+”; $0.8 \geq R_s > 0.2$ 时认为该蛋白与相应底物具有中等结合能力, 标记为“++”; $R_s \leq 0.2$ 时认为该蛋白与相应底物具有强结合能力, 标记为“+++”。

1.7 天然底物及乙酰魔芋葡甘聚糖水解实验

天然底物水解反应的总体系为 1 mL, 底物为 20 mg, 酶量为 4000 nmol/L (终浓度), 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 孵育 24 h。乙酰魔芋葡甘聚糖 (A-KGM) 水解反应的总体系为 1 mL, 底物为 4 mg, 酶量为 100 nmol/L (终浓度), 于 50 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。15871 \times g 离心 5 min, 利用 DNS 法测量上清液的还原糖浓度。

乙酸产量测定: 取样于 18407 \times g 离心 5 min, 取 100 μ L 上清液用 2 mol/L 的 HCl (记下体积) 调节 pH 至 2 后用 0.22 μ m 滤器过滤。取 20 μ L 滤液上样, 利用 HPLC 测定样液中乙酸根浓度, 条件如下: 色谱柱(MARS MOA 保护柱, MARS MOA 10 U, 50 mm \times 7.8 mm), 流动相 (2.5 mmol/L H_2SO_4), 流速 (0.6 mL/min), 柱温 60 $^{\circ}$ C, 数据采集时间(20 min)。根据乙酸标准曲线计算样品中乙酸根浓度, 再根据所加 HCl 体积折算反应体系中的乙酸产量。

2 结果和分析

2.1 重组蛋白 r44884 及其截短蛋白的异源表达

利用 dbCAN 数据库对 44884 蛋白各结构域

进行注释,结果表明该蛋白从 N 端到 C 端依次是 GH5 甘露聚糖酶催化域、2 个 CBM65 结构域 (CBM65-1/2)和 CE2 乙酰酯酶催化域(图 1)。为了深入研究该蛋白的功能以及各模块间的协同关系,对不包含信号肽的基因片段进行扩增,在 C 端融合组氨酸标签后在大肠杆菌表达系统中对全长和突变蛋白进行异源表达。

2.2 44884 中甘露聚糖酶结构域和乙酰木聚糖酯酶结构域的协同作用

双功能酶在共同进化的过程中,往往能够在不同催化域间形成高效的协同效应,相较于单功能酶,能够表现出更高的酶解效率。本研究通过制备乙酰化的甘露聚糖底物(acetylated konjac glucomannan, A-KGM)分析了 44884 内部 2 个催化域间的协作关系。如图 2-A 所示, r44884-WT

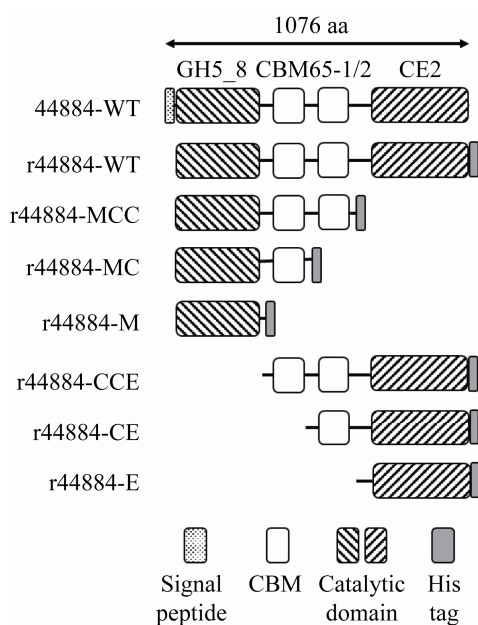


图 1. 44884 全长及截短蛋白模块结构展示
Figure 1. Domain organization of 44884 and its truncated mutants. M: the catalytic domain of mannanase; C: the domain of carbohydrate-binding module; E: the catalytic domain of esterase.

作用于 A-KGM 后,还原糖含量达到 376 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而当 r44884-MC 水解底物时,还原糖的产量仅能达到 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明乙酰酯酶催化域的存在对于还原糖的释放至关重要,并推测其能够水解底物上的乙酰基团,促进甘露聚糖酶结构域与底物的结合,从而提高酶解效率。将酯酶催化域 r44884-CE 补充到 r44884-MC 水解体系中时,还原糖的释放显著提高,但仍然难以达到 r44884-WT 的水平,说明甘露聚糖酶和乙酰酯酶同时游离存在时仍不足以应对复杂的底物结构,只有形成双功能酶才能充分发挥结构域间的协同作用。此外,研究还发现这种促酶解效果是双向的,甘露聚糖酶催化域的存在同样能够促进乙酰酯酶的酶解,而这两种结构域相互游离存在时所释放的乙酸量同样无法达到 r44884-WT 的水平(图 2-B)。

2.3 CBM65 底物结合能力分析

在木质纤维素降解酶中,CBM 的主要作用是通过与底物的特异性结合将酶富集在底物表面,增加局部酶浓度,从而提高催化域的降解效率^[26]。本研究利用亲和电泳分析了 44884 中 2 个 CBM65 与不同底物的结合能力。结果如表 2 所示,2 个 CBM65 无法与榉木木聚糖(beechwood xylan)和无定形纤维素类底物(CMC 和 β -glucan)结合。但均对甘露聚糖底物 LBG 表现出一定的结合能力,这与 44884 中甘露聚糖酶催化域 GH5 的功能相一致。GG 和 LBG 的主要成分同为半乳甘露聚糖,但 GG 中半乳糖侧链含量更高^[27],在本研究中的 2 个 CBM 都无法与 GG 相结合。进一步研究发现,2 个 CBM65 对于 KGM 的结合能力存在差异,其中 CBM65-1 无法与 KGM 结合,而 CBM65-2 与 KGM 具有一定的结合能力。KGM 主链同样由甘

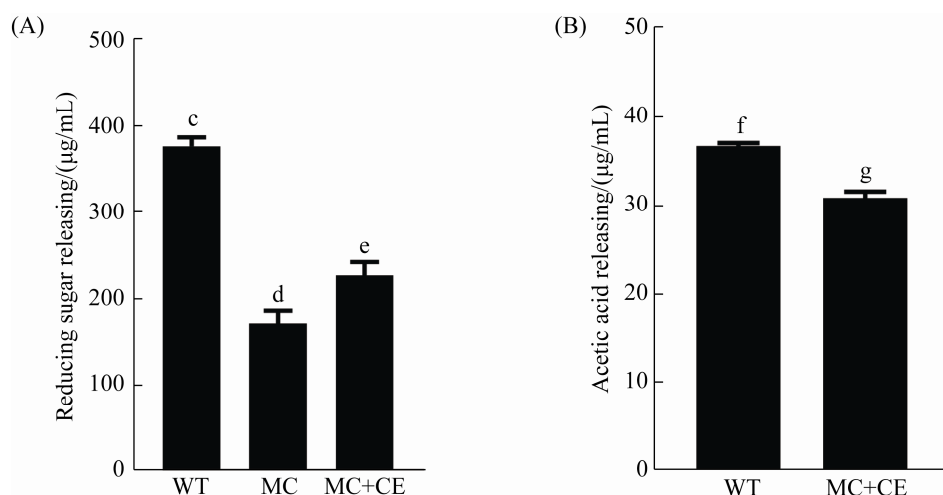


图 2. r44884-WT 及其截短蛋白水解 A-KGM 的还原糖

Figure 2. The release of reducing sugar (A) and acetic acid (B) from A-KGM hydrolyzed by r44884-WT and its mutants.

表 2. CBM65 与不同底物的结合能力

Table 2. Binding assay of CBM65 to different substrates

CBM65	CMC-Na	Beechwood xylan	β -glucan	GG	LBG	KGM	Avicel
CBM65-1	-	-	-	-	+	-	+
CBM65-2	-	-	-	-	+	+	+

露聚糖组成, 并含有少量葡萄糖单元, 而且几乎没有侧链。考虑到 2 个 CBM65 均无法与 β -glucan 结合, 这表明 CBM-1 与甘露聚糖的结合可能需要识别少量乙酰基团, 而 CBM65-2 与 KGM 的结合是通过其与甘露糖单元相结合而实现的。综上, 2 个 CBM65 的结合特性高度相似, 都是具有甘露聚糖和结晶纤维素结合活性的 CBM, 能够将甘露聚糖酶催化域带到底物附近, 促进其水解。

通过蛋白序列比对分析 44884 的 2 个 CBM65 中参与底物结合的氨基酸残基, 进一步解释其与不同底物结合的原因。Luis 等^[28]结合点突变和结构解析确定了来源于 *Eubacterium cellulosolvens*

的 *EcCBM65-1* 和 *EcCBM65-2* 参与 β -glucan 结合的关键残基分别为第 21 位和 22 位的色氨酸, 但是在 44884 的 2 个 CBM65 中, 对应位置的残基分别是丝氨酸和谷氨酸, 这可能也是这 2 个 CBM65 无法结合无定形纤维素的关键。此外, *EcCBM65-1* 第 68 位和 *EcCBM65-2* 第 72 位谷氨酸分别为参与纤维寡糖结合的关键残基, 上述残基在 44884 的 2 个 CBM65 中也未能找到, 表明这 2 个 CBM65 可能也无法结合纤维寡糖 (图 3)。由于目前 CBM65 家族中参与甘露聚糖结合的残基尚未见报道, 44884 中 CBM65-1 和 CBM65-2 与甘露聚糖结合的具体机制仍有待进一步研究。

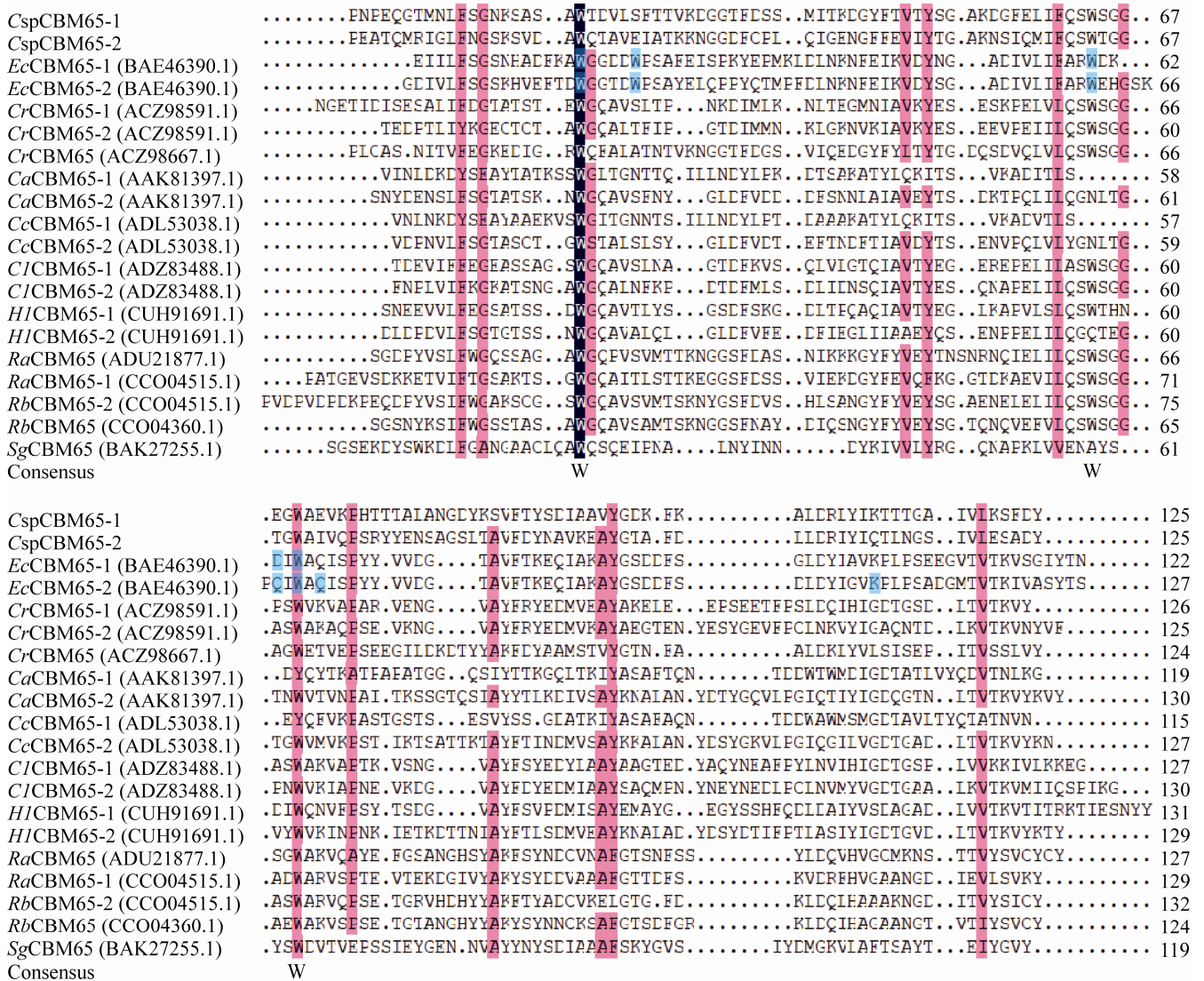


图 3. CBM65 家族蛋白序列比对

Figure 3. Sequence alignment of CBM65. The conserved tryptophan residues were marked under the sequence; the residues highlighted by dark blue and red were conserved amino acids; the residues marked by light blue were amino acids played a key role in binding substrate.

2.4 44884 中 CBM 对催化域酶学特性的影响

除了影响催化域与底物的结合, CBM 还可能影响酶学特性^[29-30]。通过对 44884 全长及其截短蛋白最适反应条件的分析, 探究了 CBM65 对 2 个催化域反应温度和 pH 的影响, 结果显示 r44884-WT 中甘露糖酶的最适反应温度为 50 °C,

属于中温酶, 最适 pH 为 6.5, 在 pH 5.0–7.0 能够保持 70%以上的酶活力(图 4-A、B)。与全长蛋白一致, 3 个截短蛋白 r44884-MCC、r44884-MC、r44884-M 的最适反应温度和 pH 均为 50 °C 和 6.5, 且酶活变化曲线也与全长蛋白相似(图 4-C、D)。上述结果表明, 44884 中 2 个

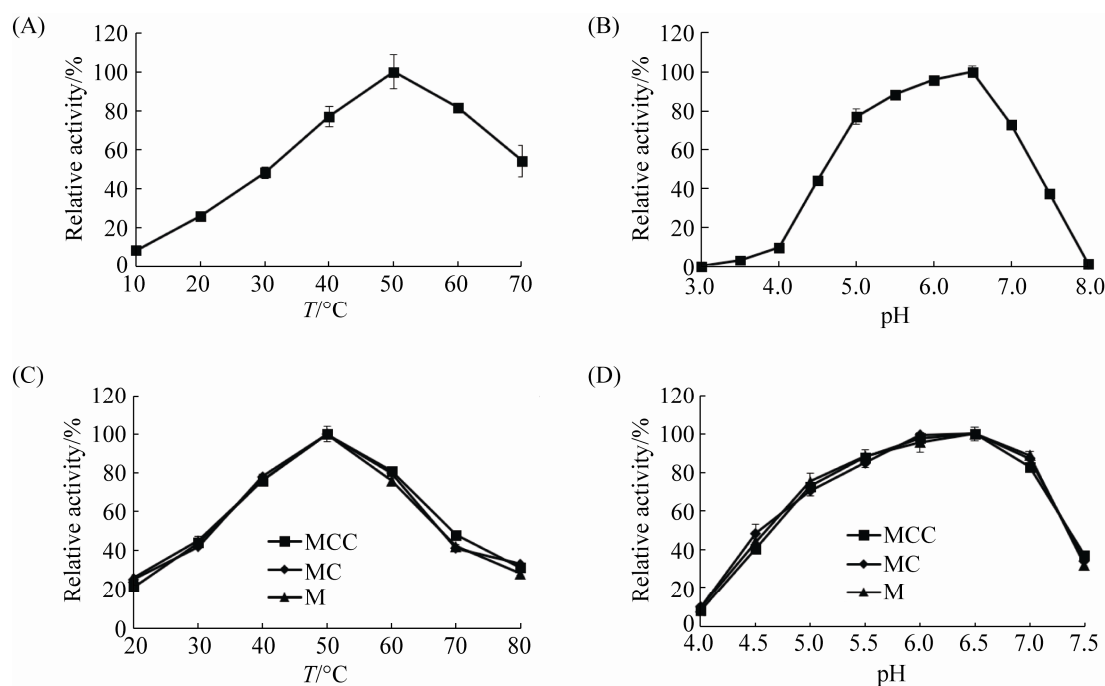


图 4. CBM65 结构域对甘露聚糖酶催化域最适反应温度和 pH 的影响

Figure 4. Optimal temperature and pH for mannanase activity of r44884-WT and its truncated mutants. A: The optimum temperature of r44884-WT; B: The optimum pH of r44884-WT; C: The optimum temperature of the mutants of r44884-WT; D: The optimum pH of the mutants of r44884-WT.

CBM65 的存在并不改变甘露聚糖酶催化域的最适反应温度和 pH。酯酶的最适反应条件则为 40 °C 和 pH 7.5, 且最适反应条件同样不受 CBM65 的影响(数据未展示)。

为了进一步研究 44884 中 CBM65 对 2 个催化域热稳定性的影响, 将截短蛋白 r44884-MCC、r44884-MC、r44884-M、r44884-CCE、r44884-CE 和 r44884-E 分别于 50 °C 孵育一段时间, 并测定其活性变化。如图 5-A 所示, r44884-M 在孵育 5 min 后, 活力下降至初始值的 79%, 孵育 60 min 后, 该酶活力剩余 47%。而 r44884-MCC 和 r44884-MC 在孵育 5 min 后, 酶活力显著下降, 分别剩余初始活力的 15%和 9%, 孵育 30 min 后, 二者完全失活。r44884-MCC 和 r44884-MC 的酶

活变化曲线相似, 表明临近甘露聚糖酶催化域的 CBM65 (CBM65-1)的存在对甘露聚糖酶热稳定性的影响更大, 同时也说明甘露聚糖酶催化域与 CBM 间的互作是 CBM65 影响酶稳定性的关键。与甘露聚糖酶不同, CBM65 的存在并不会大幅影响乙酰酯酶的活性, r44884-CCE、r44884-CE 和 r44884-E 在分别孵育 10 min 后, 酶活分别降至初始活力的 48%、54%和 61%, 延长孵育时间至 60 min, r44884-CCE、r44884-CE 和 r44884-E 分别保留了初始活力的 5%、8%和 13% (图 5-B), 即 2 个 CBM65 的存在都会降低乙酰酯酶的热稳定性, 但影响比较微弱。在同一个蛋白中, CBM65 对 2 个催化域热稳定性的影响具有明显差异, 这体现了 CBM 功能的多样性。

除了探究 CBM65 对不同催化域最适反应条件及热稳定性的影响,本研究进一步通过在 KGM 和 LBG 两种甘露聚糖底物上测定 r44884-WT 及其截短蛋白的 k_{cat}/K_m 分析 CBM65 对催化域酶活力的影响。结果如表 3 所示,失去 GH5 远端的 CBM65 后(CBM65-2),并不影响甘露聚糖酶在不同底物上的 k_{cat}/K_m 值,说明 CBM65-2 对甘露聚糖催化域的催化效率无显著影响。但失去靠近 GH5 的 CBM65 (CBM65-1)后, r44884-M 在 KGM 和 LBG 上的 k_{cat}/K_m 值相较于 r44884-MC 分别提高了 2.24 倍和 3.15 倍,表明 CBM65-1 的存在会显著抑制甘露聚糖酶在上述两种底物上的催化效率。考虑到 r44884-M 的热稳定性显著高于 r44884-MC (图 5-A),因此这种活性的提高可能是由于蛋白稳定性提高引起的。为了验证这种推测,我们构建了 r44884-MC 的突变蛋白 r44884-MC (W362A)来排除热稳定性对蛋白催化能力的影响,该突变蛋白虽

然保留了 CBM65-1 结构域,但是 CBM65-1 丧失了与底物的结合能力。与 r44884-MC 相比, r44884-MC (W362A)在两种底物上的 k_{cat}/K_m 值均下降了 24.4% 和 17.9%,表明 CBM65-1 的存在能够显著提高甘露聚糖酶的催化能力。

通过测定 r44884-CCE、r44884-CE 和 r44884-E 对于模式底物 pNPAc 的催化活性进一步分析 CBM65 对于酯酶活性的影响。结果表明,2 个 CBM65 的存在均不影响乙酰酯酶对 pNPAc 的催化能力(表 4),这可能是由于 CBM 无法与 pNPAc 结合,因而无法体现 CBM65 对酯酶催化能力的影响。值得注意的是,44884 中乙酰酯酶对于 pNPAc 的活力处于目前文献报道的最高水平。

研究表明 CBM 的存在可能会改变催化域的水解模式^[31]。为了探究 44884 中 GH5 甘露聚糖酶的水解模式和 CBM65 对甘露聚糖酶水解模式的影响,本文进一步探究了 r44884-MCC、r44884-MC

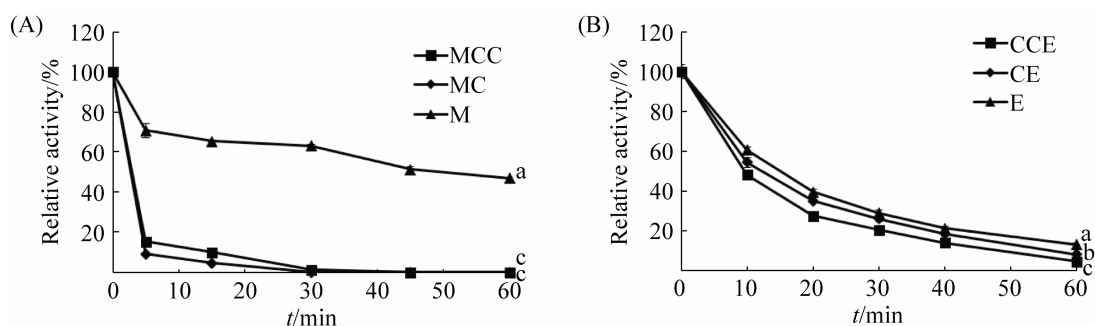


图 5. CBM65 对(A)甘露聚糖和(B)酯酶催化域热稳定性的影响

Figure 5. The influences of CBM65 on thermostabilities of mannanase (A) and esterase (B). The statistical significance indicated by different letters of numeric value was determined through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD test ($P < 0.05$). The same below.

表 3. CBM65 对甘露聚糖酶催化域 k_{cat}/K_m 值的影响

Table 3. The influence of CBM65 on the k_{cat}/K_m [L/(g·s)] of mannanase catalytic domain

Substrates	r44884-WT	r44884-MCC	r44884-MC	r44884-M	r44884-MC (W362A)
KGM	44.88±0.11 ^a	43.26±0.22 ^a	42.49±1.07 ^{ab}	95.09±3.77 ^d	32.11±0.42 ^c
LBG	41.29±0.73 ^{bc}	39.57±0.56 ^c	39.62±0.61 ^c	124.7±4.06 ^f	32.51±1.67 ^c

表 4. CBM65 对乙酰木聚糖酯酶比活力 (U/ μ mol) 的影响

Table 4. The influence of CBM65 on the specific activity (U/ μ mol) of acetylxylan esterase catalytic domain

Substrate	r44884-CCE	r44884-CE	r44884-E
pNPAc	2782.5 \pm 26.8 ^a	2724.7 \pm 26.7 ^a	2741.2 \pm 15.9 ^a

和 r44884-M 对不同甘露寡糖的水解情况。结果如图 6-A、B 和 C 所示, 3 个蛋白分别与甘露二糖和三糖共孵育后, 底物组分并无变化, 表明 3 个蛋白均无法水解二糖和三糖。当底物为甘露四糖时, 3 个蛋白的产物组成主要以三糖为主, 并伴有少量的二糖和单糖, 表明甘露聚糖催化域与底物结合至少需要 4 个糖单元, 且水解四糖时

水解位点主要位于第 3 个和第 4 个糖单元之间, 从第 2 个和第 3 个糖单元间断裂的概率较低。对于甘露五糖, 3 个蛋白的水解产物主要以二糖和三糖为主, 同时有少量单糖和四糖, 综合水解四糖时的产物组成, 表明 3 个蛋白主要从五糖的第 3 和第 4 个糖单元间断裂糖苷键, 少量蛋白从第 4 和第 5 个糖苷键间进行水解 (图 6-D)。上述结果说明 CBM65 的存在并不改变甘露聚糖酶的水解模式, 但是从 2 个蛋白水解甘露五糖的结果来看, r44884-MCC 和 r44884-MC 的产物浓度要高于 r44884-M, 表明 CBM65 的存在能够提高甘露聚糖酶的催化效率, 尤其是 CBM65-1, 这也与表 3 得出的结论一致。

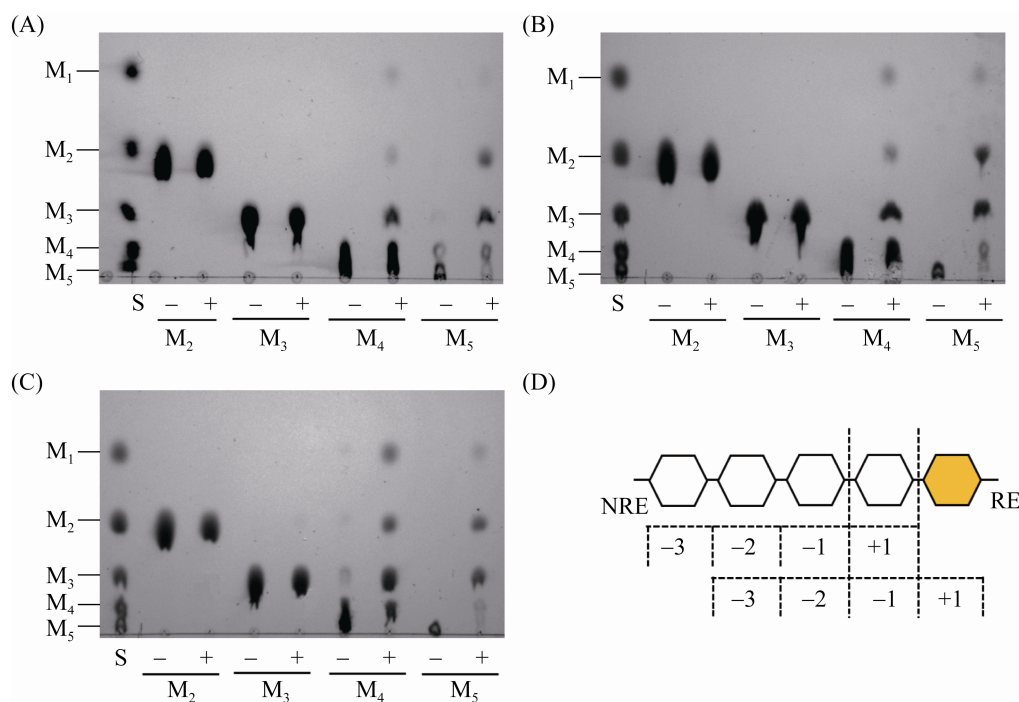


图 6. r44884-MCC (A)、r44884-MC (B)和 r44884-M (C)水解甘露寡糖后产物分析及甘露聚糖水解模式推测(D)
Figure 6. TLC analyses of hydrolysis products by r44884-MCC (A), r44884-MC (B) and r44884-M (C), and the hypothetical hydrolytic pattern (D). M₁: mannose; M₂: mannobiose; M₃: mannotriose; M₄: mannotetraose; M₅: mannopentaose; NRE: non-reducing end of mannan oligosaccharides; RE: reducing end of mannan oligosaccharides.

由于天然底物的结构和组分的复杂性,基于模式底物的分析并不能准确揭示 CBM 在水解天然底物时的真实功能。棕榈粕是甘露聚糖含量最高的木质纤维素原料之一,可以代表甘露聚糖在天然底物中的状态。因此本研究以汽爆后的棕榈粕为底物,分析 r44884-MCC、r44884-MC 和 r44884-MC (W362A)对其水解情况,准确探究在天然底物上 CBM65 对甘露聚糖水解脱效果的影响。如图 7 所示,随着 CBM65 数量的增加,甘露聚糖酶水解能力逐渐提高,而且随着反应时间的延长,临近甘露聚糖酶催化域的 CBM65 (CBM65-1)对于甘露聚糖酶的水解促进作用更加显著,这与上述结论相一致。

在天然底物上,CBM65 对乙酰木聚糖酯酶的酶解促进作用同甘露聚糖酶。r44884-CCE 和 r44884-CE 对于油松中乙酸的释放速率分别达到 $6.95 \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 和 $6.73 \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$,但 r44884-E 的乙酸释放速率仅有 $4.58 \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$,显著低于携带 CBM65 的乙酰木聚糖酯酶(表 5)。与甘露聚糖酶一样,临近乙酰木聚糖酯酶结构域的 CBM65 (CBM65-2)

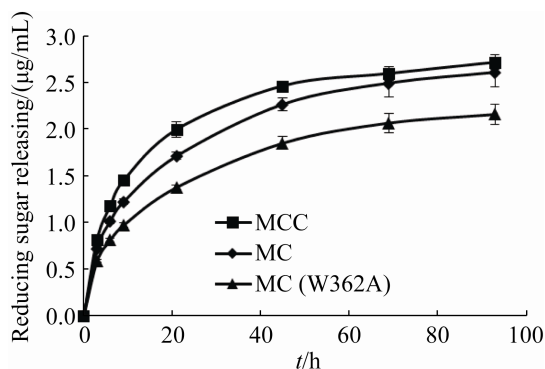


图 7. CBM65 对甘露聚糖酶水解棕榈粕的影响
Figure 7. The influence of CBM65 on hydrolysis of palm meal by mannanase.

表 5. CBM65 对酯酶释放油松中乙酸速率的影响
[($\mu\text{g}\cdot\text{h}$)/mL]

Table 5. The influence of CBM65 on the release of acetic acid from pine by eaterase [($\mu\text{g}\cdot\text{h}$)/mL]

r44884-CCE	r44884-CE	r44884-E
6.95 ± 0.13^a	6.73 ± 0.17^a	4.58 ± 0.03^b

对酶解的促进效果更为显著。由于在模式底物 pNPAc 上未观察到 CBM65 的促酶解效果,表明 CBM65-2 是通过与底物结合,增加底物上局部的酶浓度来促进酯酶的水解。

3 讨论

甘露聚糖作为重要的生物质资源,其酶法转化受到越来越多的关注。从菌株筛选、诱变到蛋白表达、纯化,再到基因工程、蛋白质工程改造,研究人员围绕甘露聚糖酶作了大量且深入的研究。但是这些研究大部分集中于对甘露聚糖主链的水解,甘露聚糖中独特的乙酰化结构及其产生的抗酶解屏障却未获得足够的重视。在木聚糖酶研究中,乙酰木聚糖酯酶和木聚糖酶间的协同水解作用已被广泛报道^[12-14]。在利用甘露聚糖酶水解魔芋葡甘聚糖时,乙酰酯酶的加入同样能够有效提高体系中还原糖的得率^[7],这表明甘露聚糖酶和乙酰酯酶间同样存在协同作用,但是类似的双功能酶却未见报道。此外,大部分报道的双功能酶都是细菌来源,但目前研究更多集中于真菌来源的甘露聚糖酶,这可能也是该类双功能酶研究滞后的原因之一。除了催化域本身,大部分细菌来源的甘露聚糖酶都携带有 CBM,这种非催化域结构对于催化域的水解效率、模式和稳定性都有巨大的影响^[26,30]。截止到目前,数据库中已收录的与甘露聚糖结合相关的 CBM 分别分布在

CBM16、23、27、29、35、59、62、72、76 和 80 家族, 有晶体结构解析的仅有 CBM16、23、27、29、35、59、62 和 80 家族。相较于纤维素酶和木聚糖酶的 CBM, 甘露聚糖酶的 CBM 及其对催化域影响的研究仍然稍显滞后。

本研究从前期富集的高效木质纤维素降解细菌菌群中克隆表达了一个双功能酶 44884, 注释结果表明该蛋白包含 2 个分别来源于 GH5 家族和 CE2 家族的催化域, 以及 2 个 CBM65。通过比较全长蛋白和截短蛋白对于 A-KGM 的水解效率, 发现 44884 中甘露聚糖催化域和乙酰酯酶催化域具有明显的协同效应, 都能促进其各自产物的释放, 而且当 2 个催化域相互连接形成双功能酶后, 这种协同效果要显著优于 2 个催化域同时游离存在的情况。这一结果表明细菌作为潜在的双功能酶资源库, 有大量新型酶系资源和水解协同机制值得深入挖掘。甘露聚糖酶和乙酰酯酶间形成双功能酶尚属首次发现, 在该双功能酶 44884 中甘露聚糖酶催化域的活力与目前已经报道的文献相比处于中等水平, 而乙酰酯酶的活力则处于最高水平, 这一结果说明在甘露聚糖酶法转化过程中, 提高侧链水解酶的催化能力可能是提高甘露聚糖转化效率的关键, 这也为后续甘露聚糖酶的改造和酶系间的复配提供了依据, 助力木质纤维素的充分转化利用。

通过对 2 个 CBM65 结合活性的分析, 发现其与甘露聚糖底物 LBG 和结晶纤维素具有结合能力, 这也是首次发现该家族的 CBM 能够与甘露聚糖底物结合, 其参与结合的残基仍需进一步分析, 这一结果进一步丰富了数据库中与甘露聚糖结合的 CBM 家族。44884 中 2 个 CBM65 在不

影响催化域最适反应条件的情况下却降低了 2 个催化域的热稳定性。Meng 等^[32]同样发现 CBM 的存在会降低木聚糖酶 XynA 的热稳定性, 但也有研究指出 CBM 的存在能够提高酶的稳定性, Pham 等^[29]在来源于 *Aspergillus aculeatus* 的甘露聚糖酶 C 端融合一个 CBM1 后, 该蛋白在 65 °C 孵育 6 h 后仍能保留 70% 的活力, 而野生型蛋白几乎失活。可见 CBM 对酶学性质的影响没有明显规律可循, 需要具体问题具体分析。近年来, 一些研究发现 CBM 的存在可能会延伸催化域与底物的结合范围从而导致酶催化模式的改变。Pan 等^[31]发现 CBM 会提高酶反应的持续性, 从而使得产物中高聚合度寡糖的含量明显提高。在本研究中, 2 个 CBM65 并不改变催化域水解模式, 但是均能提高各自临近催化域的水解效率, 即 CBM65-1 能够提高其临近的甘露聚糖酶的催化效率, 而 CBM65-2 可以提高其临近的乙酰酯酶的催化效率, 而且这种提升效果在天然底物中更为明显, 这有利于该酶在木质纤维素转化中的实际应用。

参考文献

- [1] Khatri V, Meddeb-Mouelhi F, Beaugard M. New insights into the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polymers by using fluorescent tagged carbohydrate-binding modules. *Sustainable Energy & Fuels*, 2018, 2(2): 479–491.
- [2] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, Okunev O, Gusakov A, Maximenko V, Gregg D, Sinitsyn A, Saddler J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(2): 175–184.
- [3] Várnai A, Huikko L, Pere J, Siika-aho M, Viikari L.

- Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9096–9104.
- [4] Zhu N, Liu JW, Yang JS, Lin YJ, Yang Y, Ji L, Li M, Yuan HL. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 42.
- [5] Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(2): 165–178.
- [6] Michalak L, La Rosa SL, Leivers S, Lindstad LJ, Røhr ÅK, Aachmann FL, Westereng B. A pair of esterases from a commensal gut bacterium remove acetylations from all positions on complex β -mannans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America*, 2020, 117(13): 7122–7130.
- [7] Bååth JA, Martínez-Abad A, Berglund J, Larsbrink J, Vilaplana F, Olsson L. Mannanase hydrolysis of spruce galactoglucomannan focusing on the influence of acetylation on enzymatic mannan degradation. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 114.
- [8] Tester RF, Al-Ghazzewi FH. Mannans and health, with a special focus on glucomannans. *Food Research International*, 2013, 50(1): 384–391.
- [9] Yang JX, Wang HM, Lu FP. Expression in *Aspergillus niger* and characterization of β -mannanases from *Stachybotrys chartarum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8): 1242–1255. (in Chinese)
杨家兴, 王华明, 路福平. 葡萄穗霉中 β -甘露聚糖酶基因在黑曲霉中的表达及酶学性质. *微生物学报*, 2016, 56(8): 1242–1255.
- [10] Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D490–D495.
- [11] Malgas S, van Dyk SJ, Pletschke BI. β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism-A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 70: 1–8.
- [12] Wefers D, Cavalcante JJV, Schendel RR, Deveryshetty J, Wang K, Wawrzak Z, Mackie RI, Koropatkin NM, Cann I. Biochemical and structural analyses of two cryptic esterases in *Bacteroides intestinalis* and their synergistic activities with cognate xylanases. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(16): 2509–2527.
- [13] Pai CK, Wang HT, Guo RT, Liu JR. The construction of bifunctional fusion xylanolytic enzymes and the prediction of optimum reaction conditions for the enzyme activity. *Bioresources*, 2012, 7(4): 5647–5665.
- [14] Wang RN, Yang JS, Jang JM, Liu JW, Zhang Y, Liu L, Yuan HL. Efficient ferulic acid and xylo-oligosaccharides production by a novel multi-modular bifunctional xylanase/feruloyl esterase using agricultural residues as substrates. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122487.
- [15] Tailford LE, Ducros VMA, Flint JE, Roberts SM, Morland C, Zechel DL, Smith N, Bjornvad ME, Borchert TV, Wilson KS, Davies GJ, Gilbert HJ. Understanding how diverse β -mannanases recognize heterogeneous substrates. *Biochemistry*, 2009, 48(29): 7009–7018.
- [16] Zhang XY, Rogowski A, Zhao L, Hahn MG, Avci U, Knox JP, Gilbert HJ. Understanding how the complex molecular architecture of mannan-degrading hydrolases contributes to plant cell wall degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4): 2002–2012.
- [17] von Freiesleben P, Spodsberg N, Stenbæk A, Stålbrand H, Krogh KBRM, Meyer AS. Boosting of enzymatic softwood saccharification by fungal GH5 and GH26 endomannanases. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 194.
- [18] Inoue H, Yano S, Sawayama S. Effect of β -Mannanase and β -Mannosidase supplementation on the total hydrolysis of softwood polysaccharides by the *Talaromyces cellulolyticus* cellulase system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(6): 1673–1686.
- [19] Conway JM, Crosby JR, Hren AP, Southerland RT, Lee LL, Lunin VV, Alahuhta P, Himmel ME, Bomble YJ, Adams MWW, Kelly RM. Novel multidomain, multifunctional glycoside hydrolases from highly lignocellulolytic *Caldicellulosiruptor* species. *AIChE Journal*, 2018, 64(12): 4218–4228.
- [20] Kolinko S, Wu YW, Tachea F, Denzel E, Hiras J, Gabriel R, Bäcker N, Chan LJG, Eichorst SA, Frey D, Chen QS, Azadi

- P, Adams PD, Pray TR, Tanjore D, Petzold CJ, Gladden JM, Simmons BA, Singer SW. A bacterial pioneer produces cellulase complexes that persist through community succession. *Nature Microbiology*, 2018, 3(1): 99–107.
- [21] Brunecky R, Alahuhta M, Xu Q, Donohoe BS, Crowley MF, Kataeva IA, Yang SJ, Resch MG, Adams MWW, Lunin VV, Himmel ME, Bomble YJ. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. *Science*, 2013, 342(6165): 1513–1516.
- [22] Gavrilov SN, Stracke C, Jensen K, Menzel P, Kallnik V, Slesarev A, Sokolova T, Zayulina K, Bräsen C, Bonch-Osmolovskaya EA, Peng X, Kublanov IV, Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1 and its unusual multidomain glycosidase. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 552.
- [23] Lv ZW, Yang JS, Yuan HL. Production, purification and characterization of an alkaliphilic endo- β -1,4-xylanase from a microbial community EMSD5. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(4/5): 343–348.
- [24] Liu L, Yang JS, Yang Y, Luo LJ, Wang RN, Zhang Y, Yuan HL. Consolidated bioprocessing performance of bacterial consortium EMSD5 on hemicellulose for isopropanol production. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 121965.
- [25] Yang Y, Yang JS, Wang RN, Liu JW, Zhang Y, Liu L, Wang FQ, Yuan HL. Cooperation of hydrolysis modes among xylanases reveals the mechanism of hemicellulose hydrolysis by *Penicillium chrysogenum* P33. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 159.
- [26] Orita T, Sakka M, Kimura T, Sakka K. Recombinant cellulolytic or xylanolytic complex comprising the full-length scaffolding protein RjCipA and cellulase RjCel5B or xylanase RjXyn10C of *Ruminiclostridium josui*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 97: 63–70.
- [27] Yaşar K, Kahyaoglu T, Şahan N. Dynamic rheological characterization of salep glucomannan/galactomannan-based milk beverages. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(5): 1305–1311.
- [28] Luis AS, Venditto I, Temple MJ, Rogowski A, BasléA, Xue J, Knox JP, Prates JAM, Ferreira LMA, Fontes CMGA, Najmudin S, Gilbert HJ. Understanding how noncatalytic carbohydrate binding modules can display specificity for xyloglucan. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(7): 4799–4809.
- [29] Pham TA, Berrin JG, Record E, To KA, Sigoillot JC. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module. *Journal of Biotechnology*, 2010, 148(4): 163–170.
- [30] Méndez-Líter JA, Gil-Muñoz J, Nieto-Domínguez M, Barriuso J, de Eugenio LI, Martínez MJ. A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: characterization and properties of native and recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 256.
- [31] Pan RH, Hu YM, Long LK, Wang J, Ding SJ. Extra carbohydrate binding module contributes to the processivity and catalytic activity of a non-modular hydrolase family 5 endoglucanase from *Fomitiporia mediterranea* MF3/22. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 91: 42–51.
- [32] Meng DD, Ying Y, Chen XH, Lu M, Ning K, Wang LS, Li FL. Distinct roles for carbohydrate-binding modules of glycoside hydrolase 10 (GH10) and GH11 xylanases from *Caldicellulosiruptor* sp. strain F32 in thermostability and catalytic efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2006–2014.

Functional characterization of a novel bifunctional mannanase-acetyl esterase focusing on the synergistic mechanism between different domain

Liang Liu, Jiawen Liu, Ruonan Wang, Yu Zhang, Baozhen Li, Hongli Yuan*

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Key Laboratory of Soil Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: [Objective] A novel bifunctional mannanase-acetyl esterase 44884 from lignocellulose-degraded consortium EMSD5 was investigated, including its interdomain synergism. The effect of carbohydrate-binding module (CBM) on the properties of catalytic domain was also studied, to provide references for improving and applying bifunctional enzymes. [Methods] Mannanase-acetyl esterase 44884 and its truncated mutants, as well as site-directed mutant were expressed in *E. coli*. The differences in the enzymatic properties of the wild type strain and mutants were evaluated by thin-layer chromatography (TLC) and dinitrosalicylic acid (DNS) assay. [Results] Mannanase-acetyl esterase 44884 and its mutants were successfully overexpressed in *E. coli*. The mannanase domain and acetyl esterase domain showed synergistic effect, and mannanase-acetyl esterase 44884 showed higher production of reducing sugars and acetic acid than the combination of mannanase domain and acetyl esterase domain. Two CBM65 from mannanase-acetyl esterase 44884 could bind mannan and Avicel, and not change the optimal conditions of catalytic domains. Although two CBM65 significantly decreased the thermostability of catalytic domain, they specifically improved the natural substrate hydrolysis of their adjacent catalytic domains. [Conclusion] The synergistic action between different domain of mannanase-acetyl esterase 44884 was illustrated, in which two CBM65 could improve the mannan hydrolysis of mannanase-acetyl esterase 44884 by binding to substrate.

Keywords: bifunctional enzymes, mannanase, acetyl esterase, interdomain synergism, carbohydrate binding module

(本文责编: 李磊)

Supported by the Project for Extramural Scientists of State Key Laboratory of Agrobiotechnology (2018SKLAB6-28)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-82733349; E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

Received: 7 May 2020; Revised: 17 August 2020; Published online: 21 October 2020



袁红莉, 博士, 教授, 博士生导师, 农业生物技术国家重点实验室固定研究人员。主要致力于纤维素、木质素和褐煤等生物质的微生物降解、转化、利用以及微生物肥料等应用基础研究。通过对典型系统中关键蛋白的水解模式和和蛋白间水解协作机制进行研究, 解析了多个包括细菌和真菌在内的生物转化系统; 在此基础上开发了具有商业化潜力的辅助酶系, 用于提高商业纤维素酶的转化效率; 从底物利用、营养互馈和空间占位等多个层面揭示天然菌群中不同物种在转化木质纤维素过程中的新型种间协作机制, 为木质纤维素的高效转化奠定了一定的理论和应用基础。获得农业部中华农业科技奖 3 项, 教育部科学技术奖 1 项, 国土资源部科学技术奖 1 项。主持或参加完成 10 多项国家及省部级科研项目, 发表文章 70 多篇, 其中在 *Biotechnol Biofuels*, *Bioresour Technol*, *Appl Environ Microbiol*, *Microb Cell Fact* 等杂志上发表 SCI 收录文章 60 多篇, 获得授权发明专利二十余项。