

高酶活性 β -甘露聚糖酶定向进化及其用于制备甘露寡糖

陈 贇, 高伟强, 梁 琪, 周晓雷, 王丽丽, 张春晓*

(河北科技大学 食品与生物学院, 河北 石家庄 050018)

摘要: 为了提高 β -甘露聚糖酶的活性, 采用易错 PCR 将来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) KD-1 的 β -甘露聚糖酶基因 *manBI* 进行定向进化, 并在枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中进行表达, 以筛选酶活性提高的 β -甘露聚糖酶突变体。筛选得到的突变体 ManBI(I91N/L211I), 其比酶活性为 15554.7 U/mg, 是野生型 ManBI 的 4.1 倍, 食品级表达的胞外酶产量达 17601.3 U/mL。分子动力学和分子对接结果表明, β -甘露聚糖酶在 2 个位点 (I91N/L211I) 的突变, 导致蛋白催化口袋柔性增加, 与底物结合能力提高, 进而提高了酶的催化效率。 β -甘露聚糖酶 ManBI(I91N/L211I) 水解魔芋胶产物主要由甘露六糖、甘露三糖和甘露二糖组成。报道的 I91N/L211I 2 个位点联合突变能够提高 β -甘露聚糖酶活性; ManBI(I91N/L211I) 食品级表达为该酶的绿色安全应用奠定了基础。

关键词: β -甘露聚糖酶; 枯草芽孢杆菌; 定向进化; 食品级表达; 甘露寡糖; 制备; 生物工程

中图分类号: O636.1; TQ426.97; Q789 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 11-2454-09

Directed evolution of β -mannanase with higher enzymatic activity and its application for manooligosaccharide production

CHEN Yun, GAO Weiqiang, LIANG Qi, ZHOU Xiaolei, WANG Lili, ZHANG Chunxiao*

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China)

Abstract: To improve β -mannanase activity, β -mannanase gene from *Bacillus licheniformis* KD-1 was amplified by error-prone PCR for directed evolution and further expressed in *B. subtilis* to screen mutants with higher β -mannanase activity. It was found that the specific activity of mutant β -mannanase ManBI(I91N/L211I) was 15554.7 U/mg, which was 4.1 times of wild-type ManBI, while the extracellular yield of ManBI(I91N/L211I) expressed in *B. subtilis* at food-grade level reached 17601.3 U/mL. The data from molecular dynamics and molecular docking showed that the mutation at two sites (I91N and L211I) led to the enhancement of the catalytic pocket flexibility and the affinity with the substrate, thus improving the catalytic efficiency of the enzyme. Furthermore, the β -mannanase ManBI(I91N/L211I) could hydrolyze konjac glucomannan (KGM) into manooligosaccharides (MOS) with different degree of polymerization (DP) and main composition of mannohexaose, mannotriose, and mannobiose. The combined mutation of I91N/L211I could increase β -mannanase activity. And the food-grade expression of ManBI(I91N/L211I) laid the foundation for the green and safe application of the enzyme.

Key words: β -mannanase; *Bacillus subtilis*; directed evolution; food-grade expression; manooligosaccharides; preparation; bioengineering

β -甘露聚糖酶 (EC 3.2.1.78) 是一种能够随机水解甘露聚糖的 β -1,4-糖苷键的水解酶^[1-2]。该酶可

应用于多个领域, 如作为饲料添加剂应用于动物养殖中, 通过降解抗营养物质提高饲料的利用率^[3];

收稿日期: 2022-12-29; 定用日期: 2023-04-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221182

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (21372802D、19222906D)

作者简介: 陈 贇 (1995—), 男, 硕士生, E-mail: 2428991358@qq.com。联系人: 张春晓 (1971—), 女, 副教授, E-mail: cxzhang2009@163.com。

应用于造纸和制浆工业,可提高漂白纸浆的亮度,降低纸浆漂白过程中的卡帕数和化学物质的含量,并可回收利用椰子和咖啡废料^[2,4];此外,应用于洗涤业,可有效去除污渍^[5];应用于食品工业,可降低咖啡提取物的黏度等^[6]。

β -甘露聚糖的水解产物为甘露寡糖(MOS),含 2~12 个甘露单糖^[7]。MOS 作为非降解性寡糖,能够促进乳杆菌(*Lactobacilli*)和双歧杆菌(*Bifidobacteria*)等有益菌的生长,并能抑制致病微生物的繁殖^[2];MOS 也是一种对人类健康有益的功能性食品^[8]。基于 MOS 的重要性及市场需求,建立一种简便且经济有效的 MOS 制备方法尤显重要。魔芋胶(KGM)是一种可食用纤维,用作食品和饮料中低值的凝胶剂和增稠剂^[9]。因此,将低值 KGM 转化成高值 MOS 具有重要意义。尽管已报道了多种不同特性的 β -甘露聚糖酶^[2,10-11],如来源于 *Bacillus* sp. MK-2 的 β -甘露聚糖酶突变体 MEIR 和 *Bacillus* sp. CFR1601 的 β -甘露聚糖酶,酶比活性分别为 9003.1 和 10461.5 U/mg^[12-13],是目前报道酶活性较高的 β -甘露聚糖酶,但仍难以满足精细化工行业的需求。因此,需要筛选更高酶活性和稳定性较佳的酶。为了提高酶产量,对 β -甘露聚糖酶基因进行了异源表达,包括大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)和毕赤酵母(*P. pastoris*)等^[2,14-15]。然而,这些表达系统通常是建立在抗生素筛选表达系统上,限制了其在食品和养殖业中的应用。因此,只有筛选高酶活性的 β -甘露聚糖酶,并建立其食品级表达系统,才能满足在食品及养殖业中无抗生素残留的要求。食品级表达系统是指所选菌株应为食品安全的微生物,并且不应使用抗生素筛选标记^[16-17]。*B. subtilis* 是革兰氏阳性细菌,一般被认为是安全生物(GRAS)^[18],其具有强大的分泌能力及培养鲁棒等优点,常被用作细胞工厂或合成生物学的底盘细胞生产酶和化学产品^[19]。但应用 *B. subtilis* 食品级表达的酶仅见阿洛酮糖异构酶和含铁酸性脲酶^[18,20],有关 β -甘露聚糖酶的食品级表达鲜见报道。

本文拟从地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)中克隆该 β -甘露聚糖酶基因 *manBI*,并通过易错 PCR 对该酶进行定向进化,筛选高酶活性的突变体;其次,应用 CRISPR/Cpf1 技术无痕敲除 *B. subtilis* D-丙氨酸变位酶基因 *dal*,将 *B. subtilis* 载体的抗生素基因替换为 *dal* 基因,构建基于 *dal* 基因互补的 *B. subtilis* 食品级表达系统;最后,应用该酶进行 MOS 的制备。本研究旨在筛选高酶活性的 β -甘露聚糖酶,建立其食品级表达系统,并应用该酶将低值 KGM 转化为高值 MOS。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Fastpfu、EasyTaq、dNTP、DNA Marker、蛋白 Marker、dTTP、dCTP、dATP、dGTP、MgCl₂, AR, 北京全式金生物技术有限公司;无缝克隆试剂盒和退火缓冲液, AR, 上海生工生物工程有限公司;寡核苷酸引物, AR, 英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;KGM, BR, 湖北惠葡有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS, BR)、D-甘露糖(BR)、刚果红染料(BR)、琼脂粉(BR)、Lowry kit 试剂盒(AR)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, AR),北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖, AR, Biowest Agarose 公司;酵母粉、蛋白胨、胰蛋白胨, AR, OXOID 公司;甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖、甘露五糖、甘露六糖, AR, 上海惠诚生物科技有限公司;NaCl、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、KCl、MnCl₂, BR, 国药集团化学试剂有限公司。

Biometra Tone 梯度 PCR 仪,德国耶拿公司;Quantity One 凝胶成像系统,美国 BioRad 公司;BIFUGE STRATOS 全能台式高速冷冻离心机,美国 Thermo Scientific 公司;ÄKTA 色谱系统,美国 GE 公司;SpectraMaxm i3x 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;1260 液相色谱仪,美国 Agilent 公司;CHB-202 恒温金属浴,杭州博日科技有限公司。

1.2 菌株、质粒、引物及培养基

从河北科技大学校园土壤中分离得到 *B. licheniformis* KD-1 菌株,目前保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC 编号 18964);*B. subtilis* DB104 和质粒 pWB980 为 WONG 教授赠送^[21-22],其他质粒和菌株见表 1 和表 2,所用引物见表 3。

表 1 本文所用质粒
Table 1 Plasmids used in this paper

质粒	备注	参考文献
pWB980		[21]
pHT-XCR6		[23]
pcrF11		[23]
pWB-manB1	pWB980 携带 <i>manBI</i> 基因	[24]
pWB-MBM1	pWB980 携带 <i>manBI</i> (Y247D/T272M) 基因	本文
pWB-MBM2	pWB980 携带 <i>manBI</i> (S96G)基因	本文
pWB-MBM3	pWB980 携带 <i>manBI</i> (I91N/L211I)基因	本文
pWB-DMBM3	pWB-MBM3 食品级载体	本文
pdal1	pcrF11 携带 <i>dal</i> 靶 DNA	本文
pdal2	pdal1 在 <i>Pst</i> I 和 <i>Hind</i> III 位点处插入 <i>dal</i> 同源臂	本文

表 2 本文所用菌株
Table 2 Strains used in this paper

菌株	备注	参考文献
<i>B. subtilis</i> DB104	His, nprR2, nprE18, ΔaprA3	[22]
<i>B. licheniformis</i> KD-1		[24]
<i>B. subtilis</i> XCR6	<i>B. subtilis</i> DB104(pHT-XCR6)	本文
<i>B. subtilis</i> DBFG-1	<i>B. subtilis</i> DB104 Δ <i>dal</i>	本文
<i>B. subtilis</i> DB104 (pWB980)		本文
<i>B. subtilis</i> MTV13	<i>B. subtilis</i> DB104(pWB-manB1)	本文
<i>B. subtilis</i> YM40	<i>B. subtilis</i> DB104(pWB-MBM1)	本文
<i>B. subtilis</i> YM70	<i>B. subtilis</i> DB104(pWB-MBM2)	本文
<i>B. subtilis</i> YM102	<i>B. subtilis</i> DB104(pWB-MBM3)	本文
<i>B. subtilis</i> FGYM102	<i>B. subtilis</i> DBFG-2(pWB-DMBM3)	本文

表 3 本文所用引物
Table 3 Primers used in this paper

引物	序列 5'-3'
P1	GTTTCTCCGGTGAACCCGAATGCCCA
P2	CGCCGTCCCATATCTCTCCTTTATTCA
P3	TGAATAAAGGAGAGATATGGGACGGCG
P4	TGGGCATTCGGGTTACCCGGAGAAAC
P5	CTGGCACAAAAAGCCGTCTCTGTAC
P6	CTCCATTTAGGTAAGTACGACACTTCCTAGC TTTTATTCT
P7	CTAGGAAGTGTCGTAACCTAACATGGAGA ATTCATAAAAC
P8	CTTTTAGTGTGTCAGTCCACAGTTGG
P9	TGAAGTCAAGCAAGCTTGTCTCACG CCGTCTTAAATAAG
P10	TCTGCCGTTGACGATCTGCAGTCTATTGA GCAACCTGCAAAATATGTC
P11	CGCGGATCCTCTATTGAGCAACCTGCAAAT ATGTC
P12	GTGAATGGACCAATAATAATGAGCACAAAA CCTTTTTACAG
P13	GCTGAACAGATTAATAATAGATTTAATTGCT TATATTTACCTG
P14	CATTATTATTGGTCCATTCATCTATTC
P15	CAGGTAATATAAGCAATTAATAATCTATTATT AATCTGTTACAG
P24	CCCAAGCTTGTCTCACGCCGTCTTAAATAAG
P16	ATGAGCACAAAACCTTTTTAC
P17	TTAATTGCTTATATTTACCTG
dal-crRNA-F	AGATGATGAAGCGATTTCACTGCGCAA
dal-crRNA-R	AATTTTGCAGTGAATCGCTTCATC

种子培养基(均为质量浓度):胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L, pH 7.0。

发酵培养基(均为质量浓度):KGM 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, pH 7.0。

1.3 方法

1.3.1 β-甘露聚糖酶基因随机突变及筛选

以 P1 和 P2 为引物,以 *B. licheniformis* KD-1

为模板,对 *manB1* 基因进行易错 PCR,PCR 缓冲溶液中包含 1 mmol/L dTTP/dCTP、0.2 mmol/L dATP/dGTP、6.8 mmol/L MgCl₂、0.3 mmol/L KCl、0.5 mmol/L MnCl₂、0.2 μmol/L P1、0.2 μmol/L P2 和 1.0×10⁴ U/L EasyTaq。PCR 程序为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C/30 s; 55 °C/30 s; 72 °C/2 min, 35 次循环; 72 °C/10 min。以 P3 和 P4 为引物,对质粒 pWB-manB1 通过 PCR 进行线性化。参照文献[25]方法,采用 POE-PCR 方法将上述两种 PCR 产物进行融合,形成 DNA 片段多聚体,POE-PCR 条件为 94 °C/30 s; 55 °C/30 s; 72 °C/7 min, 35 次循环。

参照文献[26]方法,将获得的 POE-PCR 产物转化至 *B. subtilis* DB104 感受态细胞。转化子(所含有的质粒标记为 pWB-MBM_n, n 为 1、2、3……)在含有质量分数 0.1% 刚果红和质量浓度为 10 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上进行初筛。具有较大透明圈的克隆接种至 24 孔板,在 37 °C、180 r/min 培养 12 h,并测量各菌株的酶活性进行第二次筛选,将酶活性提高 5% 的菌株进行测序,并进行摇瓶发酵。

1.3.2 dal 基因敲除质粒的构建

根据 CRISPOR [CRISPOR (tefor.net)] 在线软件设计 *dal* crRNA 序列^[27]。一对 27 nt *dal*-crRNA-F 和 *dal*-crRNA-R 寡核苷酸(10 μmol/L),经退火,形成 23 bp 的双链及 5'端有 4 nt 的突出末端分子^[23],接着将该退火产物稀释 10 倍,与经 *Eco*31 I 酶切的 *pcrF11* 进行连接,构建 *pdal1* 质粒。以 *B. subtilis* DB104 基因组 DNA 为模板,分别以 P5 和 P6 为引物, P7 和 P8 为引物,分别扩增 *dal* 基因上、下游 1 kb 同源臂,应用 P9 和 P10 为引物,将 *dal* 基因上、下游同源臂进行融合 PCR,并与 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切的 *pdal1* 质粒进行连接,构建质粒 *pdal2*。

1.3.3 枯草芽孢杆菌食品级表达系统的构建

应用 CRISPR/Cpf1 技术敲除 *B. subtilis* DB104 *dal* 基因^[23,28]。将 pHT-XCR6 和 *pdal2* 质粒转入 *B. subtilis* DB104 感受态细胞,加入质量浓度为 30 g/L 的木糖诱导 8 h 以便敲除 *dal* 基因^[23],构建 *B. subtilis* DBFG-1 食品级表达系统。以 P5 和 P11 为引物,转化子基因组为模板,进行 PCR,鉴定 *dal* 基因是否敲除。质粒丢失按文献[23]方法进行。

采用 POE-PCR 方法构建 *manB1(I91N/L211I)* 基因的食品级表达质粒 pWB-DMBM3。首先,以 P12 和 P13 为引物, *B. subtilis* 基因组 DNA 为模板,克隆 *dal* 基因;以 P14 和 P15 为引物, pWB-MBM3 为模板,扩增载体骨架;两种 PCR 产物进行 POE-PCR,并将 PCR 产物转化入 *B. subtilis* DBFG-1 感受态细胞,获得 *manB1(I91N/L211I)* 基因的食品级表达系统 *B. subtilis* FGYM102。以 P16 和 P17 为引物,鉴定

质粒构建是否正确。

1.3.4 蛋白纯化和定量

应用色谱系统纯化 ManBI 及其突变体 ManBI (I91N/L211I), 所有操作都在 4 °C 进行。将菌株 *B. subtilis* MTV13 和 FGYM102 的第 4 d 发酵液进行 8000 r/min 离心 15 min, 再经 0.45 μ m 滤膜过滤 2 次, 将 100 mL 过滤后的发酵液装载至 Q Sepharose XL XK 16/20 柱 (柱床容积约 30 mL), 并以缓冲液 A (20 mmol/L Tris, pH 7.0) 平衡, 未结合的蛋白用相同的缓冲液漂洗, 结合的蛋白用 0~1 mol/L NaCl (溶于缓冲液 A) 以 3 mL/min 的流速进行洗脱, 洗脱后样品蛋白浓度应用 Lowry kit 试剂盒进行测定。

1.3.5 酶的生物化学性质测定

应用 DNS 法测定 β -甘露聚糖酶活性^[29], 底物为溶于 pH 6.0 的磷酸缓冲液的 KGM (质量分数为 0.5%)。将 30 μ L 适当稀释的酶或发酵液加入 270 μ L 底物中, 混匀后在 60 °C 孵育 10 min, 再加入 600 μ L DNS, 煮沸 10 min, 立即冰水冷却, 测量 540 nm 吸光度 (OD₅₄₀)。 β -甘露聚糖酶活性的定义, 1 U 为单位时间内给定实验条件下释放 1 μ mol D-甘露糖的量^[1]。

在 pH 6.0 下, 测定不同温度 (30~90 °C) 下酶活性, 以确定酶的最适反应温度。将酶在 70 °C 孵育 30 min 后, 并在标准条件下测定剩余酶活性, 以确定酶的热稳定性。在最适温度下, 测定不同 pH (3.0~12.0) 条件下的酶活性, 以确定酶的最适 pH。为了研究不同金属离子对酶活性的影响, 10 mmol/L 不同金属离子溶液 (K⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Na⁺、Cu²⁺、Mg²⁺) 与等体积适当稀释的酶液混合, 37 °C 孵育 1 h, 剩余酶活性在 pH 6.0、60 °C 条件下进行测定, 相同条件下未加金属离子处理的作为对照。有关酶活性测定实验重复 3 次。

1.3.6 MOS 的测定

β -甘露聚糖酶水解 KGM 的产物通过高效液相色谱法 (HPLC) 进行测定。在质量分数 0.5% 的 KGM 底物中加入 0.5~50 U/mL 的 β -甘露聚糖酶 ManBI 或突变体 ManBI(I91N/L211I), 在 60 °C 反应 30 min; 或加入 0.5 U/mL ManBI 或突变体 ManBI(I91N/L211I), 在 60 °C 孵育 1~6 h, 按 1.3.5 节方法终止反应, 水解产物 12000 r/min 离心 10 min, 再经 0.22 μ m 滤膜过滤进行 HPLC 分析, 色谱条件为 Welch Xtimate™ Sugar-Ca 柱 (7.8 mm×300 mm×8 μ m), 流动相为超纯水, 流速为 0.3 mL/min。甘露糖 (DP1)、甘露二糖 (DP2)、甘露三糖 (DP3)、甘露四糖 (DP4)、甘露五糖 (DP5) 和甘露六糖 (DP6) 用作标准品。

1.3.7 β -甘露聚糖酶结构及分子动力学模拟分析

β -甘露聚糖酶蛋白的基本性质, 如相对分子质量和等电点 (pI), 通过在线软件 ProtParam ([\[web.expasy.org/protparam/\]\(https://web.expasy.org/protparam/\)\) 进行分析, 该酶的信号肽由 SignalP-6.0 分析^{\[30\]}, 蛋白保守结构域由 Interpro 进行分析^{\[31\]}。以 RCSB 数据库中具有晶体结构的 BCman 蛋白 \(2qha\) 为模板^{\[32\]}, 应用 Modeller 软件进行同源建模预测 \$\beta\$ -甘露聚糖酶三维结构^{\[33\]}, 分子动力学模拟采用 GROMACS 软件进行^{\[34\]}, 使用 GROMACS54a7 力场参数, 将蛋白分子置于正方体盒子内, 填充 TIP3P 显性水模型, 设置周期性边界条件、添加拮抗离子以中和负电荷。以含 8 个糖单元的甘露聚糖分子为底物进行 Autodock 分子对接分析^{\[35\]}。](https://</p></div><div data-bbox=)

2 结果与讨论

2.1 *manBI* 基因定向进化及筛选

尽管 β -甘露聚糖酶可来源于动物、植物和微生物, 然而, 野生型的酶因酶活性低、稳定性差等问题阻碍了其在工业领域中的应用^[2,36]。由于 *B. licheniformis* KD-1 β -甘露聚糖酶 (ManBI) 具有较高的热稳定性^[24], 为了进一步提高其酶活性, 对 ManBI 成熟肽基因进行了随机突变。经 SignalP-6.0 预测^[30], 信号肽由 N 端的 24 个氨基酸组成。因此, 成熟肽编码框为 1008 bp。

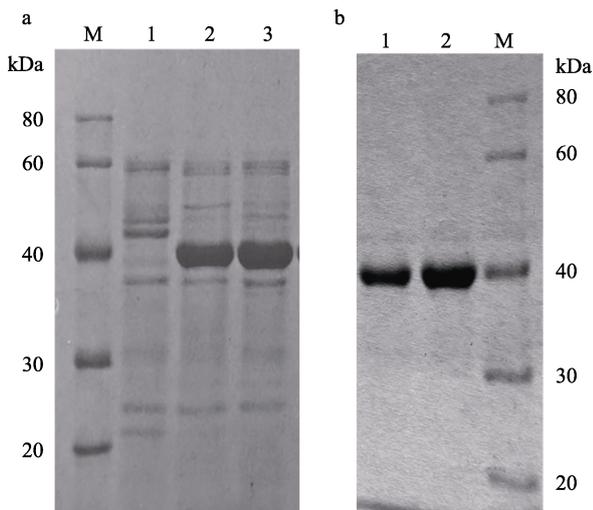
应用易错 PCR 对编码成熟肽的 *manBI* 基因进行了突变, 将 *manBI* 基因及其突变产物克隆至枯草芽孢杆菌表达载体 pWB980 的 *P43* 启动子和 *sacB* 信号肽基因下游, 转化入 *B. subtilis* DB104, 通过刚果红平板筛选, 获得了大约 1000 个克隆, 其中 170 个克隆较对照有更大的透明圈。挑取具有较大透明圈的克隆至 24 孔板培养进行第二次筛选, 初测酶活性后, 再将具有较高酶活性的菌株进行 40 h 发酵培养, 获得了酶活性提高 5%、8%、24% 的 3 株克隆, 分别命名为 YM40、YM70、YM102。测序结果表明, 3 个 β -甘露聚糖酶突变体分别为 ManBI(Y247D/T272M)、ManBI(S96G) 和 ManBI(I91N/L211I)。

2.2 *manBI(I91N/L211I)* 基因食品级表达及蛋白纯化

鉴于 β -甘露聚糖酶在食品及动物养殖中的广泛应用, 将 *manBI(I91N/L211I)* 基因在 *B. subtilis* 中进行了食品级表达, 该系统的构建是基于 D-丙氨酸消旋酶基因 *dal* 的互补性实现的^[37]。首先, 应用 CRISPR/Cpf1 技术敲除 *B. subtilis* 的 D-丙氨酸消旋酶的食品级表达载体 pWB-DMBM3; 将基因 *dal* 构建 *B. subtilis* 食品级底盘细胞 *B. subtilis* DB104 Δ *dal*, 命名为 *B. subtilis* DBFG-1; 然后, 应用 *dal* 基因替换 pWB-MBM3 载体上的卡那霉素抗性基因和博来霉素抗性基因, 构建 pWB-DMBM3 转化入 *B. subtilis* DBFG-1 感受态细胞, 获得 *manBI(I91N/L211I)* 基因食品级表达菌株 *B. subtilis* FGYM102。工程菌株 *B. subtilis*

DB104 (pWB980)、*B. subtilis* MTV13 和 *B. subtilis* FGYM102 在相同条件下进行发酵 4 d 后,对发酵液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳,检测胞外蛋白的分泌情况,结果见图 1a。由图 1a 可以发现,对照菌株 *B. subtilis* DB104 (pWB980)未检测到约 39 kDa 的目的条带(泳道 1), β -甘露聚糖酶表达菌株 MTV13 和 FGYM102 都检测到了约 39 kDa 的目的条带(泳道 2 和泳道 3),说明 β -甘露聚糖酶在枯草芽孢杆菌中进行了良好表达和分泌,且抗生素表达系统和食品级表达系统的表达及分泌无明显差别。由于抗生素滥用会对生物安全性造成威胁,因此构建无抗生素标记的食品级表达系统已成为一种趋势,如对 D-阿洛酮糖 3-表位酶 (DPease) 及含铁脲酶 (Bp-Urease) 的食品级表达^[18,20,38],而关于 β -甘露聚糖酶的食品级表达尚未见其他报道。

为便于对 β -甘露聚糖酶学性质进行研究,对 ManBI 及突变体 ManBI(I91N/L211I)进行了纯化,结果如图 1b 所示。



a—不同 *B. subtilis* 工程菌株分泌 β -甘露聚糖酶, M 为蛋白质相对分子质量标准, DB104 (pWB980)(泳道 1)、MTV 13(泳道 2)、FGYM102 (泳道 3); b—纯化的 ManBI (泳道 1) 和 ManBI (I91N/L211I) (泳道 2)

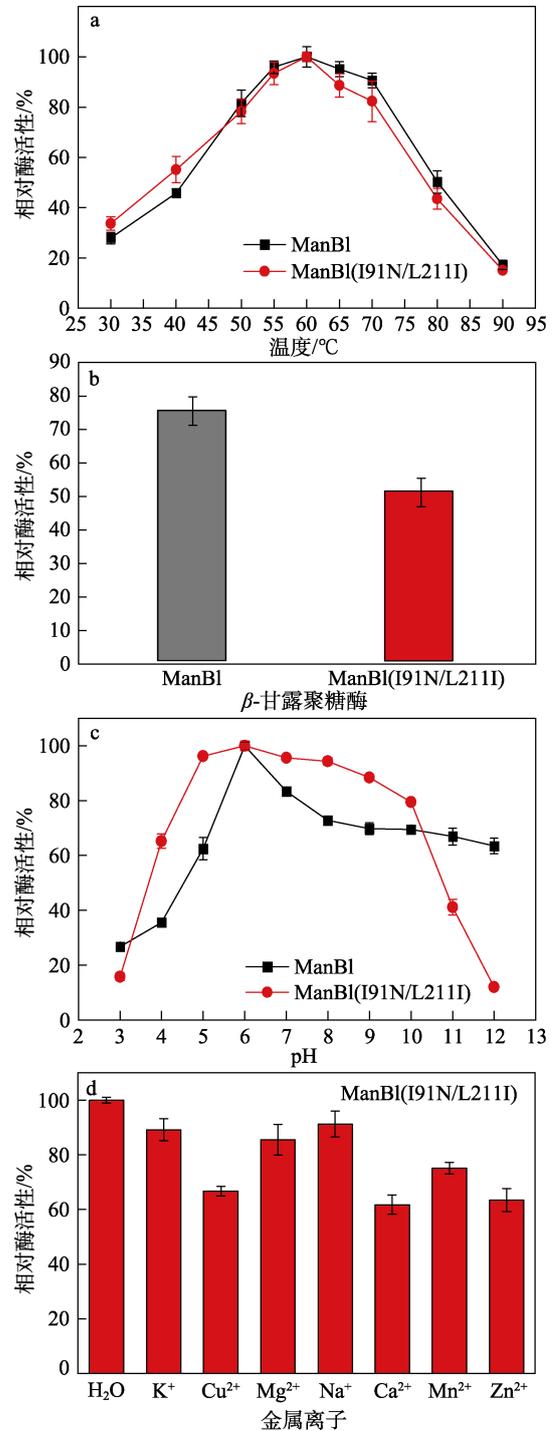
图 1 SDS-PAGE 分析 β -甘露聚糖酶的分泌及纯化
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of β -mannanase secretion and purification

从图 1b 可见,条带单一,蛋白纯化效果好,可用于后续酶学属性分析。

2.3 β -甘露聚糖酶及其突变体的酶学性质

按照 1.3.5 节实验方法,考察了 β -甘露聚糖酶 ManBI 及突变体 ManBI(I91N/L211I)的酶学性质,结果见图 2。可以看出,最适温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、最适 pH 为 6.0 (图 2a 和 c)。ManBI 和突变体 ManBI(I91N/L211I)在不同温度下的相对酶活性相差不明显(图 2a);二者在 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 剩余酶活性分别为 75%和

50% (图 2b), 说明突变体 ManBI(I91N/L211I)的热稳定性较对照组有所降低,该结果与 I-mutant 2.0 预测结果一致^[39], I91N 和 L211I 的自由能变化 (ΔG), 即 DDG, 分别为 -8.2 和 -5.4 kJ/mol, 说明突变体热稳定性降低。



a—最适温度; b—70 $^{\circ}\text{C}$ 时酶的热稳定性; c—最适 pH; d—ManBI(I91N/L211I)酶活性受不同金属离子的影响

图 2 β -甘露聚糖酶 ManBI 和 ManBI(I91N/L211I)的酶学性质

Fig. 2 Enzymatic properties of β -mannanase ManBI and ManBI(I91N/L211I)

在 pH 4~10 下, 37 °C 孵育 60 min, 突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 pH 稳定性均高于 ManBl, 特别是在 pH 5~10 下, 突变体 ManBl(I91N/L211I) 的剩余相对酶活性均高于 80% (图 2c), 说明该突变体的 pH 稳定性提高。为研究酶的激活剂和抑制剂, 7 种 10 mmol/L 金属离子 (K^+ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+}) 逐一加入酶缓冲液液中, 结果表明, 7 种金属离子对突变体 ManBl(I91N/L211I) 的活性均有所抑制, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 抑制了将近 40% 的相对酶活性 (图 2d)。

在最适条件下, 测得 ManBl 和突变体 ManBl(I91N/L211I) 的比酶活性分别为 3750.0 和 15554.7 U/mg, 突变体 ManBl(I91N/L211I) 的比酶活性是野生型的 4.1 倍。分子进化是提高酶活性的有效策略, 这与其他研究结果一致^[2,12], 如来源于 *Bacillus* sp. MK-2 的 β -甘露聚糖酶在 T112R、L211I 或 K291E 的 3 个氨基酸残基单位点突变均能提高其酶活性^[2], 且在 3 个氨基酸位点的联合突变使其酶活性提高至 9003 U/mg, 均高于单氨基酸位点或双氨基酸位点的酶活性^[12]。

2.4 β -甘露聚糖酶及其突变体的分子动力学及分子对接

本文的 β -甘露聚糖酶 ManBl 与 *B. licheniformis* DSM13 的 β -甘露聚糖酶 ManB 的氨基酸序列相似性为 100%^[1,40], 与 BCman-GH26 (PDB 编码: 2QHA) 一致性达 82.14%, 以此为基础进行同源建模预测 β -甘露聚糖酶的三维结构, 图 3 为 ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I) 动力学过程的方根偏差 (RMSD) 曲线, RMSD 体现蛋白质原始构象与在特定时间其结构的平均偏差。

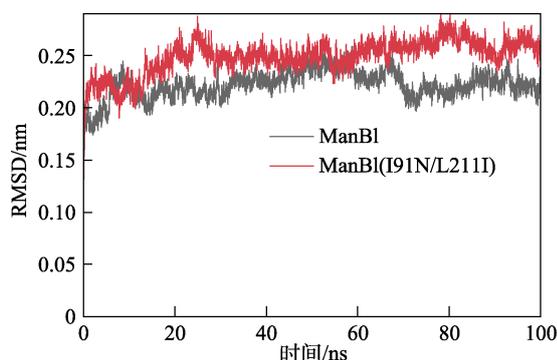


图 3 ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I) 动力学过程的 RMSD 曲线
Fig. 3 RMSD curves of ManBl and mutant ManBl(I91N/L211I) kinetic processes

从图 3 可知, 2 种蛋白的 RMSD 波动均较为平缓, 尤其是 20 ns 后, 野生型和突变体 RMSD 均趋于稳定。但比较而言, 野生型 ManBl 的 RMSD 波动

较小, 最后稳定在 0.20 nm 附近, 而突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 RMSD 波动较大, 最后稳定在 0.25 nm 附近。结果表明, 突变位点的引入使蛋白构象波动较大, 即柔性更大。较大的柔性可能使酶分子具有更高的催化活力, 但同时其结构紧凑型、稳定性会受到一定程度的影响。

回旋半径 (R_g) 代表蛋白整体结构的紧凑程度。图 4 为 ManBl 和突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 R_g 。

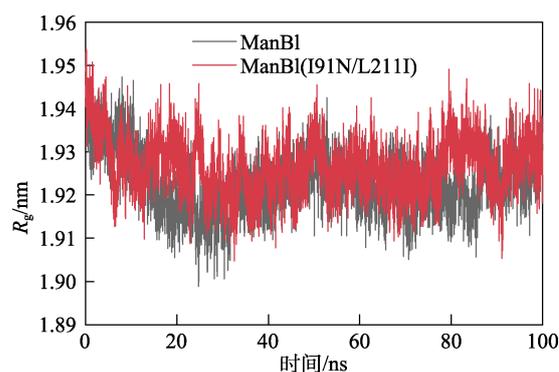


图 4 ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 R_g
Fig. 4 R_g of ManBl and mutant ManBl(I91N/L211I)

由图 4 可见, 突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 R_g 略大于野生型, 表明突变位点的引入在一定程度上造成蛋白结构更为松散, 使其稳定性降低, 但同时有可能使得底物结合口袋更为扩张、打开, 有利于底物分子的进入并发生催化。

均方根波动 (RMSF) 代表蛋白氨基酸残基的波动情况。图 5 为 ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 RMSF 曲线。

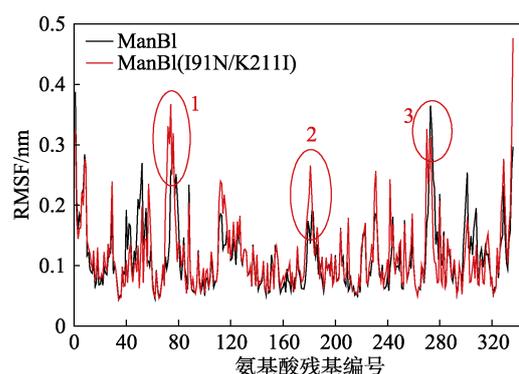
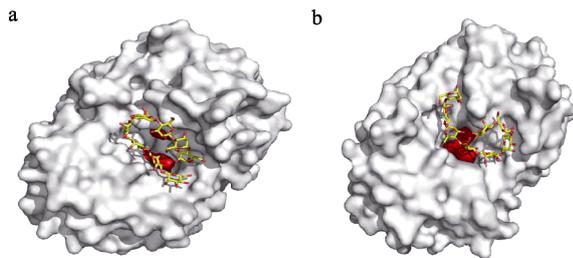


图 5 ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I) 的 RMSF 曲线
Fig. 5 RMSF curves of ManBl and mutant ManBl(I91N/L211I)

由图 5 可知, 突变体 ManBl(I91N/L211I) 氨基酸残基波动整体上要高于野生型蛋白, 尤其是图中红圈所示区域, 且区域 2、3 位于催化残基附近。说明突变位点的引入虽然不直接作用于底物分子的结合, 但其可以通过远程作用, 间接导致催化口袋区域柔性增加。而结合口袋柔性的增加, 与酶活力提高有显著正

相关性。事实上,酶的催化区域正是因为具有柔性构象,才能更好容纳底物分子,发挥催化活性。但是该柔性的增加,在提高催化活性的同时,有可能导致热稳定性的降低。该分子动力学预测结果与实验结果一致,即突变体 ManBl(I91N/L211I)催化活性较野生型提高,但热稳定性降低(图 2b)。

应用 Autodock 软件预测了酶与底物的对接情况,结果见图 6。



黄色棍为底物;红色区域为催化残基

图 6 ManBl (a) 及突变体 ManBl(I91N/L211I) (b) 与底物的对接结果

Fig. 6 Docked results of ManBl (a) and mutant ManBl(I91N/L211I) (b)

由图 6 可知,野生型 ManBl 与突变体 ManBl(I91N/L211I)与底物结合自由能为分别为 -24.7 和 -26.4 kJ/mol,说明突变体与底物的结合能力强于野生型,这可能是双点突变的引入使活性口袋发生柔性运动,相比野生型,突变体 ManBl(I91N/L211I)口袋更开阔,能够更好地容纳底物分子,产生更强的结合能力,并最终导致催化活性提高。

2.5 β -甘露聚糖酶的产量

为了获得 β -甘露聚糖酶的产量,对 β -甘露聚糖酶工程菌株 *B. subtilis* MTV13 和食品级 β -甘露聚糖酶突变体 ManBl(I91N/L211I)的工程菌株 FGYM102 进行了发酵,并在不同时间测定其酶活性,结果见图 7。

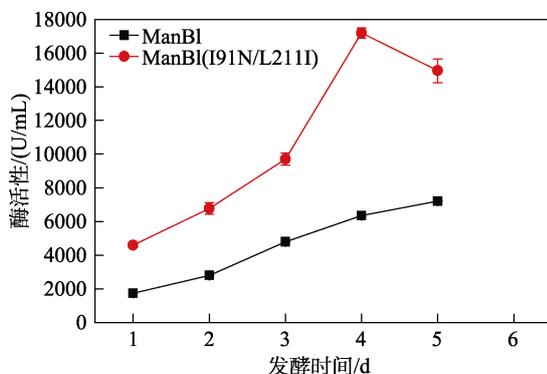


图 7 β -甘露聚糖酶 ManBl 和突变体 ManBl(I91N/L211I) 在不同发酵时间的酶活性

Fig. 7 Enzymatic activity of ManBl and mutant ManBl(I91N/L211I) at different fermentation time

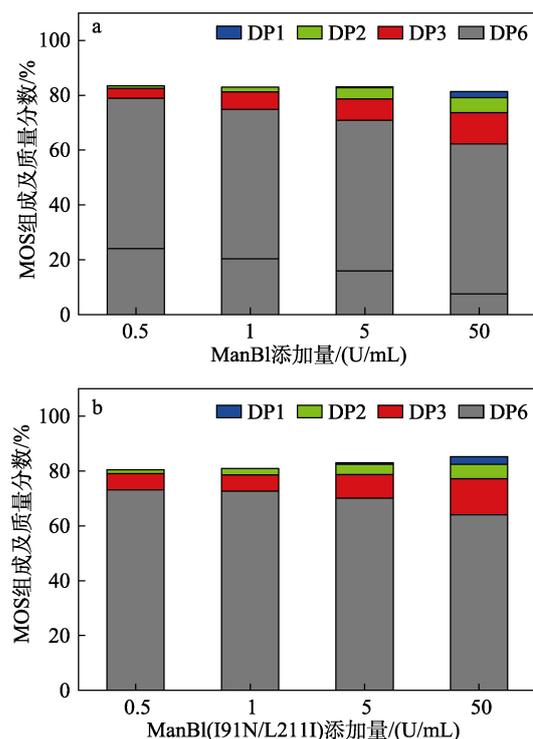
由图 7 可知,ManBl 及突变体 ManBl(I91N/L211I)对 β -甘露聚糖酶的酶活性随发酵时间的不同而不同,在 1~4 d,酶活性随发酵时间延长而增加,*B. subtilis* MTV13 和 *B. subtilis* FGYM102 的最高酶活性分别为 5882.3 和 17601.3 U/mL。

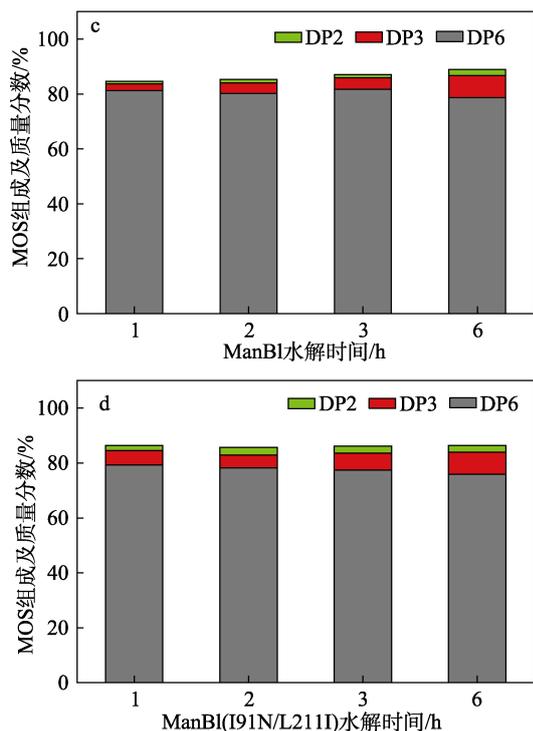
2.6 KGM 水解产物分析

应用 ManBl 或突变体 ManBl(I91N/L211I)在 60 °C 水解 KGM 30 min,二者形成的甘露寡糖组成及质量分数见图 8。

由图 8a 和 b 可见, β -甘露聚糖酶突变体的催化性质并没有发生变化。

由图 8 a 可知,当 ManBl 添加量由 0.5 U/mL 增至 50 U/mL 时,形成的 MOS 质量分数约 80%。由图 8 b 可知,ManBl(I91N/L211I)添加量由 0.5 U/mL 增至 50 U/mL 时,形成的 MOS 质量分数提高到 85%,且形成的 MOS 主要为 DP6 (6 为聚合度,下同)、DP3 和 DP2。酶添加量增加时,水解形成的 DP6 质量分数下降,而水解形成的 DP3 和 DP2 质量分数增加,如应用 0.5 U/mL 突变体 ManBl(I91N/L211I)水解 KGM 时,所形成的 DP6 和 DP3 为总 MOS 的 90.8% 和 7.6%,应用 50 U/mL 的突变体 ManBl(I91N/L211I)时,DP6 和 DP3 为总 MOS 的 75.1% 和 15.5%,这表明,DP6 可进一步被水解为 DP3 或 DP2,导致 DP6 所占 MOS 的比例下降而 DP3 所占 MOS 比例增加。结果表明,ManBl 或突变体 ManBl(I91N/L211I)为内切水解酶,与前人研究结果一致^[1]。





注: KGM 被不同用量的 β -甘露聚糖酶在 60 °C 水解 30 min 产生的 MOS, a—ManBI、b—突变体 ManBI(I91N/L211I); 应用 0.5 U/mL β -甘露聚糖酶在 60 °C 下不同时间内水解 KGM 产生的 MOS, c—ManBI、d—ManBI(I91N/L211I)

图 8 β -甘露聚糖酶水解 KGM 形成的 MOS

Fig. 8 MOS formed by hydrolysis of KGM by β -mannanase

由于 β -甘露聚糖酶用量 0.5 与 50 U/mL 时, 水解 KGM 所形成的 MOS 总量变化不大, 为降低制备 MOS 成本, 节约酶用量, 进一步探究了 β -甘露聚糖添加量为 0.5 U/mL 时, 延长酶反应时间 (1~6 h) 水解 KGM 的情况见图 8c 和图 8d。由图 8c 可知, 当 ManBI 用量为 0.5 U/mL 时, 当水解时间由 1 h 延长至 6 h 时, 形成的 MOS 质量分数由 84.5% 增至 88.9%。当突变体 ManBI(I91N/L211I) 添加量 0.5 U/mL, 在 1~6 h 内, 水解 KGM 形成的 MOS 占总水解产物的 86% (图 8d), 与应用添加 50 U/mL 的酶水解 30 min 所形成的 MOS 质量分数 (图 8b) 无明显区别, 所形成的 MOS 质量分数并没有随孵育时间延长而增加。从经济角度出发, 以 KGM 为原材料制备 MOS 时, 建议应用 0.5 U/mL 突变体 ManBI(I91N/L211I) 60 °C 水解 1 h。

本研究的 β -甘露聚糖酶 ManBI 或突变体 ManBI(I91N/L211I) 对 KGM 水解形成的 MOS, 与前人应用 β -甘露聚糖酶 ManB 对刺槐豆胶 (LBG) 的研究结果类似, ManB 能够水解聚合度 >6 的甘露聚糖^[1], 形成甘露四糖、甘露三糖和甘露二糖; 本研究报道的 β -甘露聚糖酶性质与 β -甘露聚糖酶 MEIR 水解 KGM 性质不同, MEIR 水解 KGM 所形成的 MOS, 79.07% 为 DP7-12 的寡甘露糖^[12]。

3 结论

(1) 获得的 β -甘露聚糖酶突变体 ManBI (I91N/L211I), 首次在枯草芽孢杆菌中实现了食品级表达, 比酶活性为 15554.7 U/mg, 为其在食品加工、饲料等领域的安全应用奠定了基础。

(2) 尽管 ManBI(I91N/L211I) 突变体使酶的热稳定性有一定程度降低, 但 2 个氨基酸位点位于酶的催化中心之外, 该突变使突变体蛋白柔性结构增加, 与底物能够更好结合, 是使酶活性有很大提高的主要原因。

(3) 应用 ManBI(I91N/L211I) 水解 KGM 制备 MOS 时, 可在 60 °C、pH 6、0.5 U/mL 的酶、酶解 1 h 的条件下进行, 制备得到的 MOS 质量分数达 86%。

参考文献:

- [1] SONGSIRIRITTHIGUL C, BURANABANYAT B, HALTRICH D, *et al.* Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 20.
- [2] ZHANG W, LIU Z M, ZHOU S J, *et al.* Cloning and expression of a β -mannanase gene from *Bacillus* sp. MK-2 and its directed evolution by random mutagenesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 124: 70-78.
- [3] WU G, BRYANT M M, VOITL R A, *et al.* Effects of beta-mannanase in corn-soy diets on commercial leghorns in second-cycle hens[J]. *Poultry Science*, 2005, 84(6): 894-897.
- [4] ANGURAL S, BALA I, KUMAR A, *et al.* Bleach enhancement of mixed wood pulp by mixture of thermo-alkali-stable xylanase and mannanase derived through co-culturing of alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27 and *Bacillus nealsonii* PN-11[J]. *Heliyon*, 2021, 7(1): e05673.
- [5] SINGH S, SINGH G, KHATRI M, *et al.* Thermo and alkali stable β -mannanase: Characterization and application for removal of food (mannans based) stain[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 134: 536-546.
- [6] SACHSLEHNER A, FOIDL G, FOIDL N, *et al.* Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80(2): 127-134.
- [7] LIU H X, GONG J S, LI H, *et al.* Biochemical characterization and cloning of an endo-1,4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* YH12 with unusually broad substrate profile[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(5): 712-721.
- [8] KALIDAS N R, SAMINATHAN M, ISMAIL I S, *et al.* Structural characterization and evaluation of prebiotic activity of oil palm kernel cake mannanoligosaccharides[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 348-355.
- [9] DEVARAJ R D, REDDY C K, XU B J. Health-promoting effects of konjac glucomannan and its practical applications: A critical review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 126: 273-281.
- [10] KATROLIA P, ZHOU P, ZHANG P, *et al.* High level expression of a novel β -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 480-490.
- [11] DAWOOD A, MA K. Applications of microbial β -mannanases[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 598630.
- [12] LIU Z M, NING C, YUAN M X, *et al.* High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of

- prebiotic mannoooligosaccharides[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 311: 123482.
- [13] SRIVASTAVA P K, APPU RAO G A R, KAPOOR M. Metal-dependent thermal stability of recombinant endo-mannanase (ManB-1601) belonging to family GH 26 from *Bacillus* sp. CFR1601[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 84: 41-49.
- [14] NGUYEN H M, PHAM M L, STELZER E M, *et al.* Constitutive expression and cell-surface display of a bacterial β -mannanase in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 76.
- [15] LIU J Q, BASIT A, MIAO T, *et al.* Secretory expression of β -mannanase in *Saccharomyces cerevisiae* and its high efficiency for hydrolysis of mannans to mannoooligosaccharides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10027-10041.
- [16] XIA Y, CHEN W, ZHAO J X, *et al.* Construction of a new food-grade expression system for *Bacillus subtilis* based on theta replication plasmids and auxotrophic complementation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 643-650.
- [17] HE W W, MU W M, JIANG B, *et al.* Food-grade expression of D-psicose 3-epimerase with tandem repeat genes in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(28): 5701-5707.
- [18] LIU Q T, JIN X R, FANG F, *et al.* Food-grade expression of an iron-containing acid urease in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 293: 66-71.
- [19] LIU Y F, LIU L, LI J H, *et al.* Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 548-562.
- [20] CHEN J Q, JIN Z X, GAI Y M, *et al.* A food-grade expression system for d-psicose 3-epimerase production in *Bacillus subtilis* using an alanine racemase-encoding selection marker[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1): 9.
- [21] WU S C, WONG S L. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 72(1/2): 185-195.
- [22] KAWAMURA F, DOI R H. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 160(1): 442-444.
- [23] WU Y K, LIU Y F, LV X Q, *et al.* CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1817-1825.
- [24] TIAN G (田庚), GAO W Q (高伟强), CHEN X B (陈晓波), *et al.* Directed Mutagenesis of β -mannanase gene from *Bacillus licheniformis* KD-1 for improving enzyme activity and stability[J]. *Biotechnology Bulletin (生物技术通报)*, 2021, 37(10): 100-109.
- [25] YOU C, ZHANG X Z, ZHANG Y H P. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1593-1595.
- [26] VOJIC L, DESPOTOVIC D, MARTINEZ R, *et al.* An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(2): 487-493.
- [27] HAEUSSLER M, SCHÖNIG K, ECKERT H, *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 148.
- [28] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [29] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 420-428.
- [30] TEUFEL F, ALMAGRO ARMENTEROS J J, JOHANSEN A R, *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1023-1025.
- [31] BLUM M, CHANG H Y, CHUGURANSKY S, *et al.* The InterPro protein families and domains database: 20 years on[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D344-D354.
- [32] YAN X X, AN X M, GUI L L, *et al.* From structure to function: Insights into the catalytic substrate specificity and thermostability displayed by *Bacillus subtilis* mannanase BCman[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 379(3): 535-544.
- [33] WEBB B, SALI A. Protein structure modeling with MODELLER[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 2021, 2199: 239-255.
- [34] RAKHSHANI H, DEGHANIAN E, RAHATI A. Enhanced GROMACS: Toward a better numeric framework al simulation[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2019, 25(12): 355.
- [35] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [36] PORTER J L, RUSLI R A, OLLIS D L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis[J]. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 2016, 17(3): 197-203.
- [37] BRON P A, BENCHIMOL M G, LAMBERT J, *et al.* Use of the *alc* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5663-5670.
- [38] HE W W, MU W M, JIANG B, *et al.* Construction of a food grade recombinant *Bacillus subtilis* based on replicative plasmids with an auxotrophic marker for biotransformation of D-fructose to D-allulose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(16): 3243-3250.
- [39] CAPRIOTTI E, FARISELLI P, CASADIO R. I-Mutant 2.0: Predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (Web Server issue): W306-W310.
- [40] SONGSIRIRITTHIGUL C, LAPBOONRUENG S, ROYTRAKUL S, *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of β -mannanase from *Bacillus licheniformis*[J]. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Comm/Lunications*, 2011, 67(Part 2): 217-220.