

定点突变提高克雷伯氏菌普鲁兰酶的耐酸性

牟国翠¹, 聂尧^{*1}, 穆晓清¹, 徐岩^{1,2}, 肖荣³

(1. 江南大学 工业技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 罗格斯大学高级生物技术与医学中心, 新泽西州 08854, 美国)

摘要: 通过分析 *Klebsiella variicola* SHN-1 普鲁兰酶的活性中心, 并将 *K. variicola* SHN-1 普鲁兰酶与来自 *K. pneumoniae*, *Bacillus acidopullulyticus*, *B. naganoensis* 的普鲁兰酶氨基酸序列进行同源性比较, 确定了 H626D、R756E、H852D、R908E、I619N、F723Y、S850T、K851S 八个突变位点, 采用定点突变的方法获得了 8 个突变酶, 经过酶学性质分析, 发现 H852D 的最适反应 pH 由原来的 pH 5.0 降低为 pH 4.7, 且在 pH 4.5 下的稳定性得到提高。通过同源建模及结构分析发现, 852 位点突变为天冬氨酸后与周围的氨基酸多形成了 2 个氢键, 因此提高了结构的稳定性, 且由于活性中心 pKa 值的改变, 造成了普鲁兰酶最适 pH 发生了迁移。

关键词: 普鲁兰酶; 定点突变; 耐酸性; 最适 pH 值

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)12—1247—06

Site-Directed Mutagenesis of *Klebsiella variicola* Pullulanase for the Improvement of Its Acid Resistance

MU Guocui¹, NIE Yao^{*1}, MU Xiaoqing¹, XU Yan^{1,2}, XIAO Rong³

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. The Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Rutgers University, New Jersey 08854, USA)

Abstract: By analyzing the active site of *Klebsiella variicola* SHN-1 pullulanase and alignment of the amino acid sequences of the pullulanases from *K. pneumoniae*, *Bacillus acidopullulyticus* and *B. naganoensis*, eight site-directed mutagenesis including H626D, R756E, H852D, R908E, I619N, F723Y, S850T, and K851S were subjected to improve the acid resistance of *K. variicola* pullulanase. After analysis of enzymatic properties, the optimum pH of H852D was shifted from 5.0 to 4.7, and its stability was obviously improved when stored at pH 4.5. By the analysis of homology modeling and structure of the pullulanase, the formation of two hydrogen bonds by single-site substitution was supposed to be responsible for the improvement of stability at low pH, and the change of pKa value in the active center of pullulanase caused the optimum pH migration.

Keywords: pullulanase, site-directed mutagenesis, acid resistance, optimum pH value

收稿日期: 2015-02-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(21376107、21336009); 国家 863 计划项目(2011CB710800); 国家 973 计划项目(2012AA022207); 高等学校学科创新引智计划(111 计划)(111-2-06); 高端外国专家项目(GDW20133200113); 江苏高校优势学科建设工程项目。

* 通信作者: 聂尧(1977—), 男, 河北石家庄人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程方面的研究。

E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

普鲁兰酶(EC 3. 2. 1. 41)能够专一性切开支链淀粉分支点中的 α -1,6糖苷键的葡萄糖苷水解酶,可特异性地将支链淀粉水解形成直链淀粉^[1]。淀粉制糖工业包括液化和糖化两步,糖化过程中,葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶将液化产生的低聚糖进一步分解产生葡萄糖或麦芽糖,但由于葡萄糖淀粉酶对 α -1,6糖苷键的作用效率低, β -淀粉酶遇到 α -1,6分支点则停止作用,因此生产淀粉糖的最高转化率(DE值)只能达到96%^[2]。若在糖化过程中添加普鲁兰酶,可使DE值达到97%~98%,从而提高了原料利用率和葡萄糖的收率。

目前已经发现了许多生产普鲁兰酶的微生物,如 *Bacillus acidopullulyticus*^[3]、*B. subtilis* TU^[4]、*Thermus aquaticus* YT-1^[5]、*Desulfurococcus mucosus*^[6]等。但是能真正运用到工业生产中的普鲁兰酶却很少,这是因为糖化通常是在55~65℃、pH 4.5~5.5的条件下进行,大多数普鲁兰酶的最适作用温度、pH并不符合生产需要。因此,有必要对现有普鲁兰酶进行蛋白质工程分子改造,以使其适应工业生产需要。

基于理性设计的定点突变常用来改造酶蛋白的性质,具有快速、直接、准确率高的特点^[7],常用的理性设计原理包括:同源比对^[8]、表面电荷优化^[9]以及设计改造分子间相互作用力^[10]。影响酶蛋白耐酸性的因素主要有:活性中心的pKa值^[11-12]、底物结合位点的pKa值^[13]、蛋白质表面电荷^[14]、蛋白质内部的分子作用力如氢键、盐桥、范德华力等。作者基于 *Klebsiella variicola* SHN-1 普鲁兰酶的活性中心关键氨基酸位点的组成分析,并进一步通过不同来源普鲁兰酶的同源序列比对,选定了8个碱性氨基酸位点,分别将其替换为酸性氨基酸以改变pKa值,最终获得了催化最适pH值和耐酸性均提高的突变酶。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与培养基

1.1.1 菌株 克隆宿主 *Escherichiacoli* JM109:作者所在实验室保藏;表达宿主 *E. coli* BL21(DE3):作者所在实验室保藏。

1.1.2 质粒 突变模板 pET-28a-KvPUL 来自实验室保藏。

1.1.3 LB 液体培养基 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L,

氯化钠 10 g/L。LB 固体培养基为液体培养基基础上加入 15 g/L 的琼脂粉。LB 液体培养基和固体培养基在使用时加入卡那霉素至终质量浓度为 80 mg/L。

1.2 试剂与仪器

PrimeSTAR[®] HS PCR 酶、Dpn I 限制性内切酶、高相对分子质质量标准蛋白质、DNA marker、loading buffer、Competent Cell Preparation kit: 购自 TAKARA 公司;Plasmid Mini Kit, Gel extraction kit: 购自 OMEGA BIO-TEK 公司;BioSpin PCR Purification Kit: 购自 Bioer Technology 公司;卡那霉素、IPTG: 购自上海生工生物有限公司;酵母粉、蛋白胨: 购自 Oxoid 公司;Protein Assay Kit: 购自碧云天生物技术研究;普鲁兰多糖: 购自日本 Tokyo Kasei Kogyo 公司。

DNA 电泳仪、蛋白质电泳仪: 购自 Bio-Rad 公司;凝胶成像仪、PCR 仪: 购自 Eppendorf 公司;超净工作台: 购自苏州安泰空气技术有限公司;核酸蛋白测定仪、酶标仪: 购自 Thermo 公司;高压湿热自动灭菌锅 5S-325: 购自 Tomy 公司。

1.3 定点突变

参照 Plasmid Mini Kit 说明书,从作者所在实验室保藏的 *E.coli* BL21(DE3)/pET-28a-pul 中提取质粒作为饱和和定点突变的模板。

定点突变采用大引物全质粒 PCR 方法^[15],引物设计由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应条件为:98℃ 预变性 30 s,98℃ 10 s,68℃ 15 s,68℃ 9 min 30 s,共 30 个循环,反应结束后,取 4 μ L 反应产物用 1 g/dL 琼脂糖凝胶检测。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

突变位点	引物序列(5'-3')
R756E	CTCCGATCGTCTGGAAGACGCCGTGCG
H852D	TGTGTCAAAAGACGACAACCAAACGCTG
R908E	CTCTAAATCTTTTACCGAAGATTCTGATGATTCCGG
I619N	CTGGGAATGAACGTCATATGGACGTGG
F723Y	CCCGGACATTATTTCTATGTTGTAAGGTTGG
S850T	CGTGAATTATGTGACTAAACACGACAACCAAACGC
K851S	CGTGAATTATGTGTCATCACACGACAACCAAACGC

DpnI 内切酶线性化处理: 按照 DpnI 酶说明书配制反应体系,于 37℃ 下反应 5 min。消化后的产物转入 *E. coli* JM109,测序由上海生工生物工程有限公司完成,测序验证正确的重组质粒再转入

E. coli BL21(DE3)。

1.4 重组菌的摇瓶发酵

挑取单菌落于 100 mL LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 下培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8,加入 IPTG 使终浓度达到 0.4 mmol/L,转入 25 ℃、200 r/min 下诱导培养 20 h 后停止培养,于 4 ℃、10 000 r/min 下离心 10 min,收集上清液。

1.5 酶活力测定

酶活的测定参照 Nair 等^[16]人报道的 DNS 法,并稍作修改。操作如下:用 100 mmol/L、pH 5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液对普鲁兰酶粗酶样品稀释到合适浓度,取 100 μL 普鲁兰酶稀释液与等体积的底物(1%的普鲁兰多糖,pH 5.0)混合,混匀后置于 50 ℃的水浴中精确计时反应 30 min。反应结束立即向反应混合物中加入 300 μL 的 DNS 试剂终止反应,沸水浴处理 10 min 后,定容至 2 mL,混合均匀后于 540 nm 处测定其吸光值。

酶活单位(U)的定义:一个酶活单位为每分钟分解普鲁兰多糖生成相当于 1 μmol 葡萄糖的还原糖所需的酶量。

酶活计算公式:

$$E(\text{U/mL}) = \frac{n \times 109.89 \times (\text{OD}_{540 \text{ 反应}} - \text{OD}_{540 \text{ 对照}})}{180 \times 30 \times 0.1}$$

其中, n 为稀释倍数;109.89 为葡萄糖标准曲线的斜率; $\text{OD}_{540 \text{ 反应}}$ 为实验组在 540 nm 处的吸光值, $\text{OD}_{540 \text{ 对照}}$ 为对照组在 540 nm 处的吸光度,180 为葡萄糖的相对分子质量;30 为反应时间;0.1 为稀释后酶液的体积。

1.6 蛋白质浓度的测定

参照 ProteinAssayKit 的说明书操作。以牛血清白蛋白作标样制作标准曲线,取 20 μL 稀释后的酶液与 200 μL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,充分混匀,在 595 nm 下的吸光度值 OD₅₉₅,将吸光度值代入标准曲线,计算蛋白质浓度。

1.7 野生型酶和突变酶的酶学特性比较

分别配制 pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液,用不同 pH 值的缓冲液稀释酶液和溶解底物,测定酶活,以最高酶活为 100%,计算出不同 pH 下的相对酶活,从而得到最适反应 pH。

用 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液稀释酶液并于常温下保存,每隔 30 分钟取样测定酶活,以未经保存的酶液酶活为 100%,计算剩余酶活。

配制不同质量浓度的底物普鲁兰多糖(1、2、5、10、15 g/L),分别在不同底物浓度下测定反应初速度,利用 GraphPad Prism 软件进行非线性拟合得到 K_m 、 k_{cat} 和 V_{max} 值。

取稀释到合适浓度的普鲁兰酶纯酶液,分别在 50、53、56、59、62、65 ℃下测定酶活。以最高酶活为 100%,计算每个温度下的相对酶活,从而得到最适反应温度。

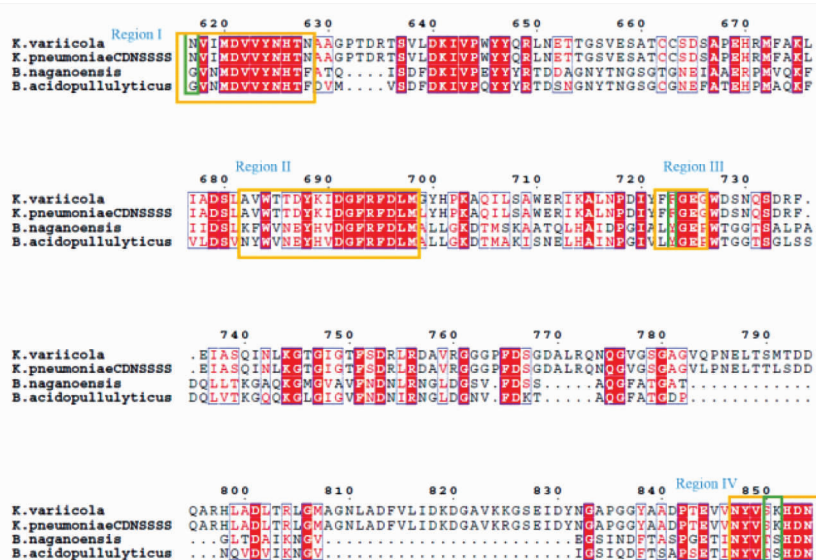
1.8 普鲁兰酶的同源建模、结构分析、同源序列比对

来自 *K. pneumoniae* 的普鲁兰酶的氨基酸序列与 *K. variicola* SHN-1 普鲁兰酶序列比对分析在 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> 进行。比对结果在 <http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi> 进行修饰。以来自 *K. pneumoniae* 的普鲁兰酶结构为模板在 SWISS-MODEL 上模拟了 *K. variicola* SHN-1 普鲁兰酶的三维结构。用分子三维结果显示软件 PyMOL 来显示蛋白质的模拟结构并进行相关分析。

2 结果与讨论

2.1 基于位点构效关系的突变酶设计

据文献报道,改变酶活性中心及底物结合位点的 pK_a 值,会使酶的最适 pH 发生迁移^[11-13]。通过对普鲁兰酶活性中心的分析,确定了突变位点 H626D、R756E、H852D、R908E 四个突变点^[17]。在普鲁兰酶的一级结构中,几乎所有的普鲁兰酶的编码基因均包含有 4 个高度保守的区域(区域 I-IV),见图 1。这些保守区域分别构成了普鲁兰酶的活性中心、底物结合域和金属离子结合域等。将来自 *K. variicola*, *K. pneumoniae*, *B. acidopullulyticus*, *B. naganoensis* 的普鲁兰酶氨基酸序列进行同源性比较,发现在保守区域,*K. variicola* 和 *K. pneumoniae* 序列完全一致,而与另外两种普鲁兰酶相比,*K. variicola* 普鲁兰酶中 619、723、850、851 位点分别为 Ile、Phe、Ser、Lys,而 *B. acidopullulyticus* 和 *B. naganoensis* 的普鲁兰酶为 Asn、Tyr、Thr、Ser,且 *B. acidopullulyticus* 是一种嗜酸菌,而 *B. naganoensis* 的普鲁兰酶的最适 pH 为 4.5,要优于 *K. variicola* 普鲁兰酶。所以对相应位点进行突变,构建 I619N、F723Y、S850T、K851S 四个突变株。综合以上分析,确定了 H626D、R756E、H852D、R908E、I619N、F723Y、S850T、K851S 共 8 个突变位点。



黄色框内为四个保守序列,绿色框内为突变位点

图 1 不同微生物来源的普鲁兰酶序列比对

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequence of pullulanase from different microorganisms

2.2 定点突变对普鲁兰酶催化最适 pH 值的影响

IPTG 诱导 20 h 后,离心收集发酵上清液即为粗酶液。分别在 pH 4.4、4.7、5.0、5.3、5.6 的条件下测定野生型普鲁兰酶和突变酶的酶活,发现突变酶 H852D 的最适 pH 由 5.0 降低至 4.7,而其他突变酶均没有发生变化,突变酶 R756E、R908E 酶活丧失,见图 2。酶的最适反应 pH 主要是由活性中心的 pKa 值决定的,并受底物与酶构成的微环境里的各种作用力的影响。852 位由碱性的组氨酸突变为酸性的天冬氨酸后,降低了活性中心的 pKa 值,从而降低了普鲁兰酶的最适反应 pH。

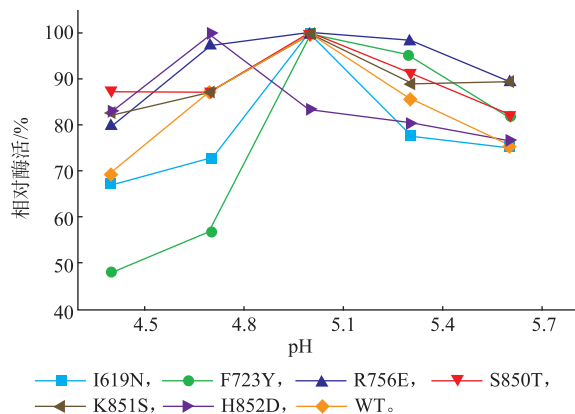


图 2 野生型酶和突变酶的最适 pH

Fig. 2 Optimum pH of the wild-type enzyme and the mutants

2.3 定点突变对普鲁兰酶耐酸稳定性的影响

糖化通常在 pH 4.5~5.5 的微酸性条件下进行,因此要求普鲁兰酶在低 pH 条件下要有较高的稳定性。作者在认识突变位点对普鲁兰酶催化最适 pH 值影响的基础上,进一步考察了定点突变对该酶耐酸稳定性的影响,结果见图 3。

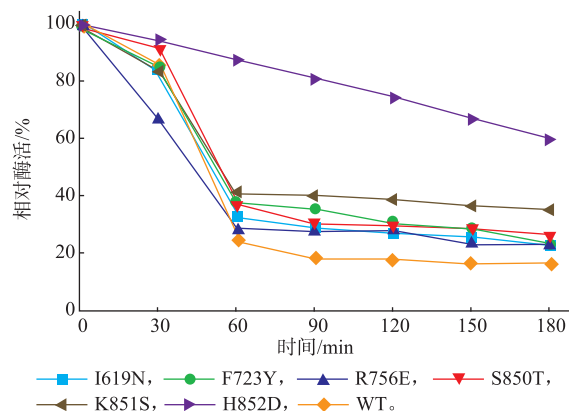


图 3 野生型普鲁兰酶和突变酶在 pH 4.5 的稳定性

Fig. 3 Stability of the wild-type enzyme and the mutants stored under pH 4.5

研究发现,突变酶 K851S 和 H852D 在低 pH 条件下的稳定性均优于野生型酶,其中突变酶 H852D 的相对活性随保存时间变化较为平缓。野生型酶和突变酶动力学研究的结果表明,突变酶 H852D 与野生型酶的底物亲和性及酶活力相差不大,其中

H852D 的 K_m 值为 7.14 mg/mL,野生型酶的 K_m 值为 7.44 mg/mL,说明将该酶 852 位组氨酸突变为天冬氨酸后,虽然改变了酶的催化最适 pH 值和耐酸性,但基本未影响其对底物的亲和性和催化能力;而突变酶 K851S 的催化效率比野生型酶有所降低,其 k_{cat}/K_m 值由 21.25 mg/(mL·s)变为 11.27 mg/(mL·s)。这些结果表明,由于蛋白质结构的复杂性以及从蛋白质结构方面改造酶蛋白的局限性,单点突变对酶的催化效率可能会产生一定的影响。

2.4 定点突变对普鲁兰酶催化最适温度的影响

蛋白质的结构与功能关系复杂,结构上的改变除了会改变普鲁兰酶的耐酸性,可能也对普鲁兰酶的其他性质产生影响,而普鲁兰酶在糖化中的应用要求其应具有较高的最适作用温度。因此需要对突变酶的最适作用温度进行考察。在 50、53、56、59、62、65 °C 下测定野生型普鲁兰酶和突变酶的酶活以考察其最适作用温度,见图 4。所有突变酶和野生型酶具有相同的最适作用温度,均为 53 °C,仅有突变酶 F723Y 的适宜作用温度范围变窄。其中,耐酸性提高的突变酶 H852D 的催化最适温度与野生型酶相比,也没有发生明显变化,即耐酸稳定性的改变并未引起催化最适温度等其他性质的改变,其较高的最适温度和较低的最适 pH 使其更适合糖化工艺生产的需要。

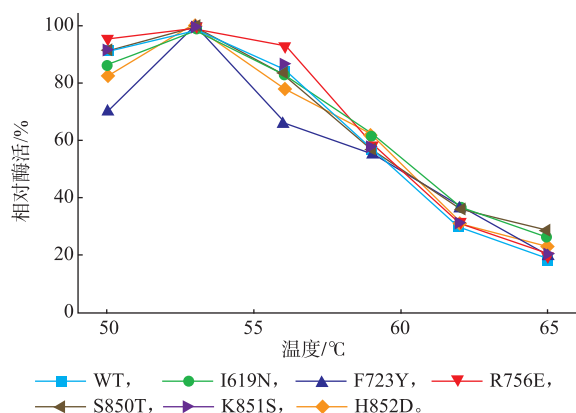


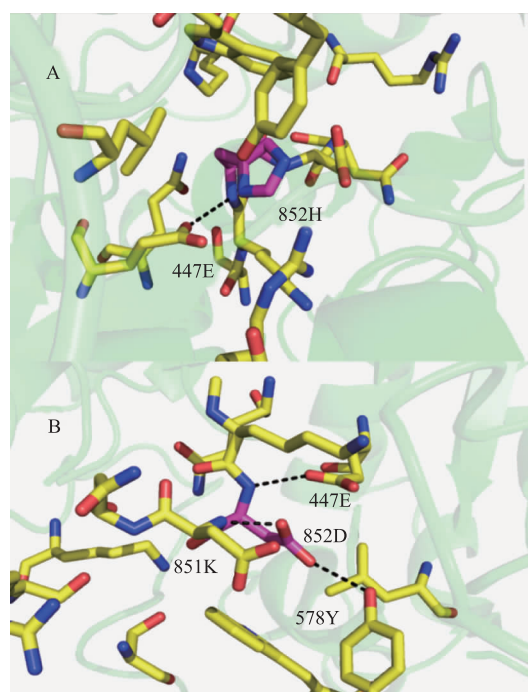
图 4 野生型酶和突变酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of the wild-type enzyme and the mutants

2.5 定点突变提高普鲁兰酶耐酸性的分析

经过序列比对, *K. variicola* 普鲁兰酶和 *K. pneumonia* 普鲁兰酶序列同源性高达 98.57,因此以来自 *K.pneumoniae* 的普鲁兰酶结构为模板在

SWISS-MODEL 上模拟了 *K. variicola* SHN-1 普鲁兰酶的三维结构。与野生型酶相比, H852D 与周围的 578Y 和 851K 多形成了 2 个氢键,见图 5,从而增加了结构的稳定性,获得更高的耐酸性。但是由于活性中心的适当柔性对催化作用有重要意义,活性中心的结构刚性增强,影响了酶活性中心催化位点与底物分子及其他相应位点的分子相互作用,因此突变酶的催化效率有所降低。



突变位点为红色棒状,氢键为黑色虚线

图 5 野生型酶与突变酶 H852D 的突变位点分子相互作用分析

Fig. 5 Molecular interaction analysis of the wild-type enzyme and the mutant H852D at the involved mutated residue

3 结语

普鲁兰酶能够特异性水解普鲁兰、糖原、支链淀粉及其极限糊精中的 α -1,6-糖苷键,在糖化过程中与糖化酶配合使用,能提高淀粉的利用率,节约生产成本,但是由于糖化过程具有高温 (55~65 °C) 和弱酸 (pH 4.5~5.5) 的特点,所以大多数来源的普鲁兰酶并不适合工业应用。为了提高 *K. variicola* 普鲁兰酶的耐酸性,使其适合糖化要求,可利用理性设计结合定点突变的方法对其进行改造。

酶的最适 pH 主要是由活性中心的 pKa 值决定

的,通过替换活性中心的氨基酸,降低 pKa 值,可以降低酶的最适 pH 值。而酶的稳定性受酶蛋白分子内部的各种作用力如氢键、二硫键、盐桥、范德华力的影响,增加酶蛋白分子内部的分子间作用力可以提高蛋白质的稳定性。通过将 852 位的组氨酸替换为天冬氨酸,该普鲁兰酶的最适 pH 值从 5.0 降低为 4.7,且提高了普鲁兰酶在 pH 4.5 的稳定性。突变酶 H852D 所引入的上述酶结构与功能的改变,使该

普鲁兰酶的酶学性质与糖化酶的应用工艺更加匹配,在糖化过程中添加普鲁兰酶能够特异水解淀粉原料中的 α -1,6-糖苷键,有利于使淀粉双酶法生产葡萄糖的最高转化率由单一使用糖化酶的 95% 左右提高到 97% 以上,从而实现提高生产效率、降低生产成本的目标,该研究为进一步提高普鲁兰酶的应用性能、拓宽其应用价值等方面奠定了基础。

参考文献:

- [1] DOMAN-PYTKA M, BARDOWSKI J. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin [J]. **Critical Reviews in Microbiology**, 2004, 30(2):107-121.
- [2] NORMAN B. A novel debranching enzyme for application in the glucose syrup industry[J]. **Starch-Stärke**, 1982, 34(10):340-346.
- [3] SCHULEIN M, HOJER-PEDERSEN B. Characterization of a new class of thermophilic pullulanases from *Bacillus acidopullulyticus* [J]. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1984, 434(1):271-274.
- [4] TAKASAKI Y. Pullulanase-amylase complex enzyme from *Bacillus subtilis*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1987, 51(1):9-16.
- [5] PLANT A R, MORGAN H W, DANIEL R M. A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1986, 8(11):668-672.
- [6] DUFFNER F, BERTOLDO C, ANDERSEN J T, et al. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(22):6331-6338.
- [7] YANG H, LI J, SHIN H-d, et al. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(1):23-29.
- [8] XIAO Z, BERGERON H, GROSSE S, et al. Improvement of the thermostability and activity of a pectate lyase by single amino acid substitutions, using a strategy based on melting-temperature-guided sequence alignment[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(4):1183-1189.
- [9] GRIBENKO A V, PATEL M M, LIU J, et al. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009, 106(8):2601-2606.
- [10] CHU X-y, TIAN J, WU N-f, et al. An intramolecular disulfide bond is required for the thermostability of methyl parathion hydrolase, OPHC2[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 88(1):125-131.
- [11] KIM T, MULLANEY E J, PORRES J M, et al. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(6):4397-4403.
- [12] POKHREL S, JOO J C, KIM Y H, et al. Rational design of a *Bacillus circulans* xylanase by introducing charged residue to shift the pH optimum[J]. **Process Biochemistry**, 2012, 47(12):2487-2493.
- [13] MULLANEY E J, DALY C B, KIM T, et al. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2002, 297(4):1016-1020.
- [14] RUSSELL A J, FERSHT A R. Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge[J]. **Nature**, 1986, 328(6130):496-500.
- [15] MIYAZAKI K. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2003, 231(5):1033-1038.
- [16] NAIR S U, SINGHAL R, KAMAT M. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13[J]. **Bioresource Technology**, 2007, 98(4):856-859.
- [17] MIKAMI B, IWAMOTO H, MALLE D, et al. Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site[J]. **J Mol Biol**, 2006, 359(3):690-707.