



引用格式:胡海艳,甘祥武,黄秀敏,等. 基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究[J]. 轻工学报,2020,35(4):8-15.

中图分类号:TS201.3;Q789 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.002

文章编号:2096-1553(2020)04-0008-08

基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究

Study on directed evolution of β -mannanase in vitro by error-prone PCR

胡海艳,甘祥武,黄秀敏,叶俊豪,谢万勇

HU Haiyan, GAN Xiangwu, HUANG Xiumin, YE Junhao, XIE Wanyong

广州市微生物研究所,广东 广州 510663

Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, 510663, China

摘要:采用易错 PCR 方法,对 β -甘露聚糖酶进行体外分子定向进化,通过调整 dNTP 比例和加入不同浓度的 Mn^{2+} ,向 β -甘露聚糖酶中随机引入突变,构建突变文库,并对筛选得到的突变菌株的突变酶学性质进行研究.结果表明:在突变文库的构建过程中,当 Mn^{2+} 浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高,达到 80%,氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的构建原则;经过两轮易错 PCR 构建的突变文库容量约为 4000,从中筛选出的突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27 的突变酶 GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性;与突变前相比,GwMan26A-27 具有较宽的酶促反应温度范围和适宜 pH 值范围,热稳定性和 pH 稳定性均有较大提升;在胃蛋白酶液和胰蛋白酶液中水浴 2 h,GwMan26A-27 的消化酶稳定性较突变前也均有所提升.

关键词:

β -甘露聚糖酶;易错 PCR;定向进化

Key words:

β -mannanase; error-prone PCR; directed evolution

收稿日期:2020-05-21

基金项目:广州市科技计划项目(201710010154)

作者简介:胡海艳(1985—),女,湖南省株洲市人,广州市微生物研究所工程师,主要研究方向为微生物代谢产品利用与微生物防控.

Abstract: Error-prone PCR was used to directed evolution β -mannanase in vitro, random introduction of mutations into β -mannanase by adjusting dNTP ratio and setting Mn^{2+} of different concentrations, a mutant library was constructed, and the enzymatic properties of the mutant enzymes were studied. The results showed that during the construction of the mutation library, the positive conversion rate could reach the highest 80% and the number of amino acid mutations was 2.0 with the concentration of Mn^{2+} 0.01 mmol/L, which was in accordance with the general principles of error-prone PCR mutation libraries; after two rounds of error-prone PCR, a storage capacity of 4000 was constructed, the mutant enzymes GwMan26A-27 of mutant *Pichia pastoris* X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27 with acid resistance, high temperature resistance and high enzyme activity was finally selected; compared with before mutation, GwMan26A-27 has a wider enzymatic reaction temperature before the mutation and a suitable pH range, the thermal stability and pH stability also had been greatly improved; in the pepsin solution and trypsin solution for water bath 2 h, the digestive enzymes stability of GwMan26A-27 had also been improved.

0 引言

甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分^[1-2],广泛存在于各种植物组织中^[3]。 β -甘露聚糖酶因能够水解甘露聚糖类有机物,被广泛应用于饲料、医药、食品、精细化工等领域^[4-5]。将 β -甘露聚糖酶添加至饲料中,可消除甘露聚糖的抗营养作用,提高饲料的利用率,促进肠道内有益菌群的增殖。随着 β -甘露聚糖酶在饲料、食品等领域应用的不断深入,对 β -甘露聚糖酶酶学性质的要求也越来越高^[6-9]。例如,在饲料领域,要求 β -甘露聚糖酶具有较高的酶活力、较好的热稳定性、较宽泛的 pH 作用范围、较强的蛋白酶抗性等。然而,目前常见的 β -甘露聚糖酶在高温或极端 pH 条件下稳定性较差,易丧失活性,这限制了其在饲料加工行业中的应用。因此,对 β -甘露聚糖酶进行改造,获得耐酸、pH 作用范围广、耐热性较好、酶活力较高的 β -甘露聚糖酶已成为业界研究的热点。

酶的改造方法主要包括理性设计方法和非理性设计方法,其中,理性设计需要清楚蛋白质的三维结构,且确定蛋白质结构与功能之间的关系,再通过定点诱变改变蛋白质中的个别氨基酸,以产生更加理想的酶学性质;非理性设计

则不需要了解蛋白质结构与功能之间的关系,可以在实验室中模拟自然进化的过程,随机突变、重组和选择,在短时间内即可模拟完成漫长的自然进化过程^[10]。易错 PCR (error-prone PCR) 属于非理性设计方法,可对酶分子编码基因进行定向进化与选择,改善酶的稳定性^[11-12]、底物特异性^[13]等,是蛋白质工程的重要研究工具。以易错 PCR 为基础的体外分子定向进化可以以最小的序列变化产生较大的表型差异,定向筛选出目标菌株,很大程度上简化了序列的比较分析工作。目前,关于 β -甘露聚糖酶结构方面的研究鲜有报道,业界对 β -甘露聚糖酶的蛋白质三维结构、催化机制等信息的了解还不够深入,因此很难运用理性设计方法对其进行定点突变。

鉴于此,本研究拟采用非理性设计方法(易错 PCR)对 β -甘露聚糖酶进行体外分子定向进化,通过调整 dNTP 比例和加入不同浓度的 Mn^{2+} ,向 β -甘露聚糖酶中随机引入突变,构建突变文库,定向筛选出产耐酸、pH 作用范围广、热稳定性较好、酶活力较高和消化酶稳定性较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株,以满足饲料加工过程中对 β -甘露聚糖酶的酶学性质需求,加速 β -甘露聚糖酶在工业生产中的应用进程。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 X-33 (*Pichia pastoris* X-33), 表达载体 pGAPZ α A, 美国 Invitrogen 公司产; 大肠杆菌 DH5 α , 由广州市微生物研究所实验室保存.

1.2 主要试剂

小量质粒抽提试剂盒、PCR 所用试剂、PCR 产物快速胶回收试剂盒、山梨醇, 生工生物工程(上海)股份有限公司产; 酵母质粒抽提试剂盒, 美国 Biomega 公司产; T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I, 线性化酶 *Bln* I, 日本 Takara 公司产; Taq DNA 聚合酶, 日本 Toyobo 公司产; 博莱霉素(Zeocin), 美国 Intitrogen 公司产; 酵母提取物、蛋白胨, 湖北安琪酵母股份有限公司产; 琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司产; 其他试剂, 均为国产分析纯或生化试剂.

1.3 培养基

LB 培养基、LBZ 培养基、YPD 培养基、YPDS 培养基均按照《Invitrogen 公司操作手册》推荐方法配制.

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, pH 值为 7.2~7.5, 去离子水定容至 1000 mL. LBZ 培养基需在 LB 培养基中另加入 Zeocin 0.025 g.

YPD 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 去离子水定容至 1000 mL. YPDZ 培养基需在 YPD 培养基中另加入 Zeocin 0.1 g.

YPDS 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 山梨醇 186 g, 琼脂 20 g, 去离子水定容至 1000 mL. YPDSZ 培养基需在 YPDS 培养基中另加入 Zeocin 0.1 g.

以上培养基于 121 $^{\circ}$ C 条件下灭菌 20 min, 其中, 葡萄糖单独灭菌.

1.4 仪器与设备

LRH-250 型生化培养箱, 上海一恒科学

仪器有限公司产; DHZ-DA 型水平摇床, 江苏太仓市实验设备厂产; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司产; 752N 型紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司产; SMART 型显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司产; 5427R 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司产.

1.5 实验方法

1.5.1 易错 PCR 引物的设计方法

根据已知 *man* 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计易错 PCR 引物. 在引物的末端分别引入限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 的酶切位点(下划线所示): 上游引物 5'-GAAGGGG-TATCTCTCGAGAAAAGA-3'; 下游引物 5'-CT-GAGATGAGTTTTTGTCTAGAGC-3'.

1.5.2 易错 PCR 扩增方法

易错 PCR 反应体系: 总体积为 50 μ L, 其中, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dATP (10 mmol/L) 和 dGTP (10 mmol/L) 各 1 μ L, dCTP (10 mmol/L) 和 dTTP (10 mmol/L) 各 5 μ L, 模板 1.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10.5 μ L, MnCl₂ (2 mmol/L) 0 μ L、0.25 μ L、1.25 μ L、2.50 μ L、3.75 μ L、5.00 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, dd H₂O 17.50 μ L、17.25 μ L、16.25 μ L、15.00 μ L、13.75 μ L、12.50 μ L.

易错 PCR 循环程序: 降落 PCR, 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 循环 1 次; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 变性 100 s, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 循环 5 次; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 变性 100 s, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 循环 1 次.

1.5.3 易错 PCR 突变文库的构建方法

本研究中的表达宿主毕赤酵母 X-33 为分泌型酵母, 外源蛋白可以直接分泌到培养基中, 有利于后续大容量突变文库的筛选.

毕赤酵母 X-33 感受态细胞的制备:挑取 YPD 培养基平板上的单克隆菌种毕赤酵母 X-33 接种于 5 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C,180 r/min 条件下过夜培养活化;取活化后的菌液接种于 20 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C,180 r/min 条件下培养至 OD_{600} 达 1.0 ~ 1.3;再于 4 °C,5000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,用 20 mL 预冷的无菌水重悬浮菌体,即得毕赤酵母 X-33 感受态细胞。

重组质粒的构建与转化:用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切易错 PCR 扩增产物,得到纯化后的易错 PCR 扩增产物,将其与同样经双酶切的穿梭分泌表达载体 pGAPZ α A 混合均匀,用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 条件下过夜连接后,将所构建的重组质粒命名为 pGAPZ α A-Man. 将 pGAPZ α A-Man 热激转化得到的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞涂布在 LBZ 培养基平板上,于 37 °C 条件下培养 16 h 后,将 LBZ 培养基平板上的所有克隆转入含有 Amp (氨苄西林) 的 LB 液体培养基中,于 37 °C,180 r/min 条件下培养过夜;提取大肠杆菌 DH5 α 中的重组质粒,采用电转化的方式转入毕赤酵母 X-33 感受态细胞中,迅速加入 850 μ L 已预冷的 1 mol/L 的山梨醇,再加入 500 μ L 的 YPD 液体培养基,转移至 2 mL 的无菌 Eppendorf 管中,于 30 °C,180 r/min 条件下振荡培养 1 h;取 110 μ L 培养液涂布在 YPDSZ 培养基平板上,于 30 °C 条件下培养 3 ~ 4 d,即完成重组质粒的转化。

1.5.4 重组子的鉴定方法

挑取 YPDSZ 培养基平板上的单克隆,提取质粒,采用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 进行双酶切与 PCR,鉴定含有突变基因的重组质粒 pGAPZ α A-Man 是否构建成功。

1.5.5 易错 PCR 突变文库的筛选方法

1.5.5.1 突变酶的初筛 目的:重点筛选耐酸性较好(当 pH 值为 3.0 时,可耐受 1 h)的突变

克隆子。

菌株培养:为了提高效率,挑取在 YPDSZ 培养基平板上生长的单克隆,接种于装有 3 mL YPD 液体培养基的 15 mL EP 管中,于 30 °C,200 r/min 条件下培养 48 h 后,取上清液,以便快速、准确地完成高通量初筛工作。

酶的耐酸性处理:用 pH 值为 2.5 的磷酸缓冲液将上清液样品稀释至 pH 值为 3.0 后,于 37 °C 条件下水浴 1 h,再用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液稀释至 pH 值为 5.0。

酶活力的测定:取 1.5 mL pH 值为 5.0 的质量分数为 0.5% 的甘露聚糖底物溶液加入 15 mL 比色管中,于 45 °C 条件下预热 3 min 后,加入 0.5 mL 的稀释酶液(已预热 3 min),混匀后于 45 °C 条件下反应 10 min,加入 2 mL DNS 溶液(还原糖测试溶液,含 3,5-二硝基水杨酸)立刻混匀终止酶反应,再置于沸水浴中反应 15 min,冰水冷却后定容至 15 mL,混匀。以 β -甘露聚糖酶空白样作为对照,测定 550 nm 处的吸光度值,每个样品做 3 个平行。

1.5.5.2 突变酶的复筛 目的:筛选耐酸性较好(当 pH 值为 3.0 时,可耐受 2 h)、耐高温(当温度为 90 °C 时,可耐受 10 min)、酶活力较高的突变克隆子。

菌株培养:因为需要筛选酶活力较高的突变菌株,继续采用小规模的培养方式将会使酶活力测定产生较大的误差。因此,在复筛过程中,挑取在 YPDZ 培养基平板上生长的单克隆,接种于装有 50 mL YPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 30 °C,200 r/min 条件下培养 48 h 后,取上清液,用 pH 值为 2.5 的磷酸缓冲液将样品上清液稀释至 pH 值为 3.0,再于 37 °C 条件下水浴 2 h 后,用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液稀释至 pH 值为 5.0,测定酶活力。

酶的耐高温处理:取菌株培养上清液,于 10 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清液,用

pH 值为 5.0 的磷酸缓冲液将样品上清液稀释至合适倍数,置于 90 °C 水浴锅内水浴 10 min 后,测定酶活力。

1.5.6 突变酶学性质的研究方法

1.5.6.1 温度和 pH 值对突变酶活力的影响 将稀释至一定浓度的突变酶溶液分别置于 0 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C 温度下反应后,测定不同反应温度下的残余酶活力,将残余酶活力最高者设为 100%,计算其他温度下的相对残余酶活力。

配制 pH 值分别为 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的磷酸盐缓冲液,以上述缓冲液配制相应的底物溶液,测定不同 pH 值下的残余酶活力,将残余酶活力最高者设为 100%,计算其他 pH 值下的相对残余酶活力。

1.5.6.2 突变酶的热稳定性和 pH 稳定性

将突变酶溶液分别置于 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C 温度下保温 5 ~ 60 min,测定不同反应温度下的残余酶活力,将未经热处理的酶活力设为 100%,计算其他温度下的相对残余酶活力。

将突变酶溶液分别置于 pH 值为 2.0, 3.0, 4.0 的磷酸盐缓冲液中 30 ~ 120 min,测定不同 pH 值下的残余酶活力,将未经 pH 处理的酶活力设为 100%,计算其他 pH 值下的相对残余酶活力。

1.5.6.3 消化酶对突变酶活力的影响

将突变酶溶液分别置于质量浓度为 0.5 mg/mL 的胃蛋白酶液(由 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液配制)与质量浓度为 2.5 mg/mL 的胰蛋白酶液(由 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液配制)中,于 37 °C 温度下水浴保温 2 h,分别以不添加胃蛋白酶的 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液与不添加胰蛋白酶的 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液为对照,测定残余酶活力,将未经放置处理的酶活力设为 100%,计算经消化酶处理的突变酶相对残余酶

活力。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 突变文库的构建结果分析

2.1.1 易错 PCR 条件的确立

在易错 PCR 反应体系中,调整 dNTP 的比例,使 dCTP、dTTP 的浓度增大到 1 mmol/L,以促进碱基错配的倾向性。此外,在易错 PCR 反应体系中分别加入浓度梯度为 0 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.10 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.20 mmol/L 的 $MnCl_2$,以得到不同突变频率的文库。用不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 扩增产物构建表达载体,分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,从突变文库中的每个 Mn^{2+} 浓度中随机挑取 10—20 个克隆子进行菌落 PCR,检测其阳性转化率;再从中各挑选 3 个阳性克隆子进行测序。在易错 PCR 突变文库的建立中,要考虑的重要因素是突变频率的控制,一般来说,突变基因控制在 1—5 个碱基,对应的氨基酸突变数为 1.0 ~ 2.0 个比较合理。不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 反应体系的阳性转化率和氨基酸的突变个数如表 1 所示。由表 1 可知,当添加 Mn^{2+} 的浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高,达到 80.0%,且氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的一般构建原则。

表 1 不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 反应体系的阳性转化率和氨基酸的突变个数

Table 1 Positive conversion rate and mutation number of amino acids of the error-prone PCR reaction system with different Mn^{2+} concentration

Mn^{2+} 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	阳性转 化率/%	氨基酸的 突变个数/个
0	40.0	2.0
0.01	80.0	2.0
0.05	60.0	4.6
0.10	13.3	3.5
0.15	5.0	2.0
0.20	13.3	3.0

2.1.2 易错 PCR 突变文库的建立

在易错 PCR 反应体系中添加浓度为 0.01 mmol/L 的 $MnCl_2$, 进行易错 PCR 突变; 将突变产物克隆至表达载体 pGAPZ α A 上获得重组质粒, 并将此重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中扩增后电转化至毕赤酵母 X-33 感受态细胞中; 将电转化后的感受态细胞涂布在 YPDSZ 培养基平板上, 于 30 $^{\circ}C$ 条件下培养 3~4 d. 用灭菌后的牙签挑取单菌落点植至 YPD 固体培养基平板上, 经过两轮易错 PCR 所构建的突变文库如图 1 所示, 其库容量约为 4000.

2.2 易错 PCR 突变文库的筛选结果分析

在约 4000 个突变克隆子中, 初步筛选出约 200 株耐酸性较好的突变克隆子进入复筛. 复筛后得到 5 株突变性能较好的克隆子, 再经酶学性质分析, 筛选出突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27. 该毕赤酵母菌的突变酶 GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性: 将突变酶 GwMan26A-27 放置于 pH 值为 3.0 的缓冲液中 2 h, 相对残余酶活力由突变前的 0.23% 提升到 30.00%; 将该突变酶于 90 $^{\circ}C$ 条件下水浴 10 min, 残余酶活力由 370 U/mL 提升至 430 U/mL, 相对残余酶活力由突变前的 34.00% 提升到 72.00%.

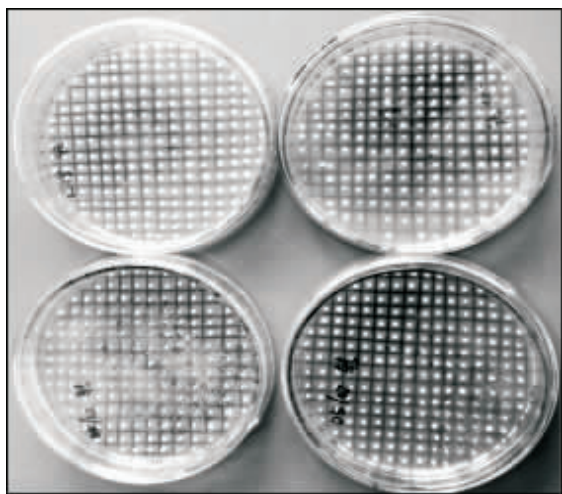


图 1 易错 PCR 突变文库

Fig. 1 Mutation library of error-prone PCR

2.3 突变酶酶学性质的研究结果分析

2.3.1 温度和 pH 值对突变酶酶活力的影响

结果分析 温度对突变酶相对残余酶活力的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 突变酶 GwMan26A-27 比突变前的酶 GwMan26A 有较宽的酶促反应温度范围: GwMan26A-27 的相对残余酶活力在 60.00% 以上的酶促反应温度范围为 30~60 $^{\circ}C$, 而 GwMan26A 的相对残余酶活力在 60.00% 以上的酶促反应温度范围为 30~55 $^{\circ}C$.

pH 值对突变酶相对残余酶活力的影响如图 3 所示. 由图 3 可以看出, GwMan26A-27 的适宜 pH 值范围也相应扩大, 在 pH 值为 3.0 的酸性环境下, 其相对残余酶活力达到 54.00%; 在 pH 值为 2.0 的酸性环境下, 其相对残余酶活

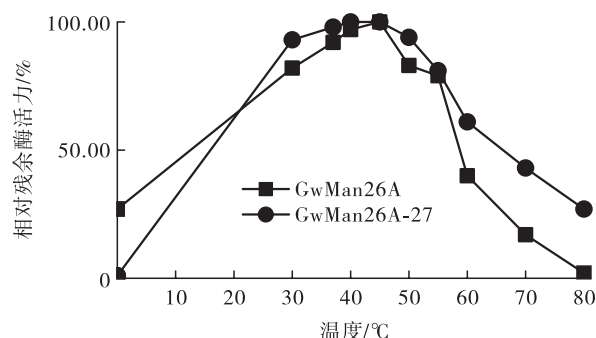


图 2 温度对突变酶相对残余酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the relative residual enzyme activity of mutant enzymes

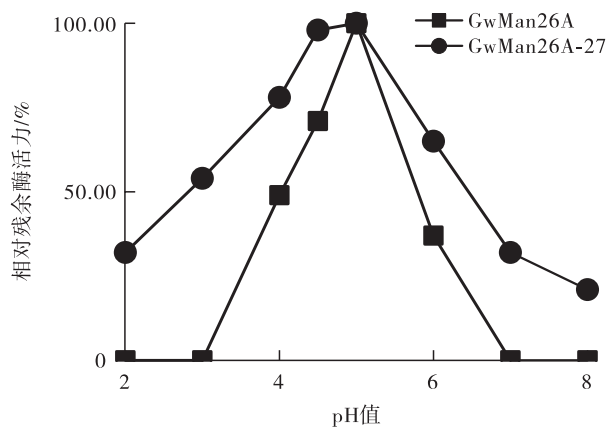


图 3 pH 值对突变酶相对残余酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the relative residual enzyme activity of mutant enzymes

力为 32.00% ,而 GwMan26A 在此 pH 环境下无酶活.

2.3.2 突变酶的热稳定性和 pH 稳定性结果分析

与其他 β - 甘露聚糖酶相比,由于 GwMan26A-27 基因在毕赤酵母中表达,在胞外分泌过程中出现了高度的糖基化,而糖基化可使该突变酶具有较好的耐热性. 突变酶的热稳定性如图 4 所示. 在突变筛选前, GwMan26A 在 90 °C 条件下处理 10 min 仍有 35.00% 以上的相对残余酶活力. 由图 4 可以看出, GwMan26A-27 的热稳定性进一步提升,在 90 °C 条件下处理 10 min 仍有 72.00% 以上的相对残余酶活力,而良好的耐热性能使其能适应后续提取纯化和饲料加工造粒处理中的高温环境.

研究突变酶 pH 稳定性的主要目的是筛选出能够耐受畜禽消化道中酸性环境的酶. 突变酶的 pH 稳定性如图 5 所示. 在突变筛选前, GwMan26A 在 pH 值为 2.0 的酸性环境下无酶活,而当放置于 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力仅为 0.32%. 由图 5 可以看出,经过突变筛选, GwMan26A-27 对 pH 值为 4.0 的环境具有很好的耐受性,放置 120 min 基本无影响;当放置于 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力为 30.00%;当放置于 pH 值为 2.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力为 21.00%. 相较于突变前, GwMan26A-27 的 pH 稳定性均有较大的提升.

2.3.3 消化酶对突变酶活力的影响结果分析

突变酶的消化酶稳定性如图 6 所示. 由图 6 可以看出, GwMan26A-27 的消化酶稳定性均有所提升:当在胃蛋白酶液中水浴 2 h 时,其相对残余酶活力由突变前的 52.33% 提升至 65.51%;当在胰蛋白酶液中水浴 2 h 时,其相对残余酶活力由突变前的 67.82% 提升至 74.75%.

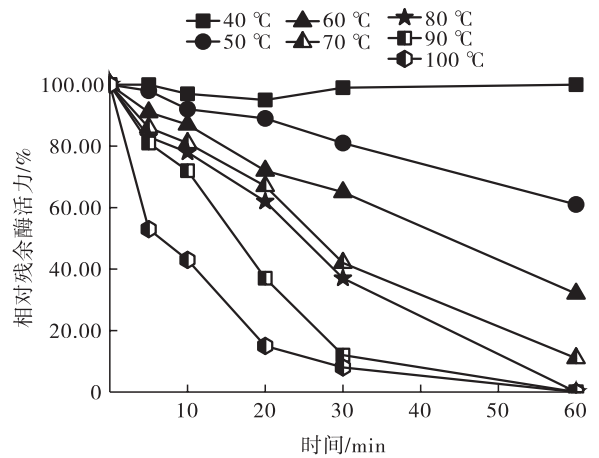


图 4 突变酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of mutant enzymes

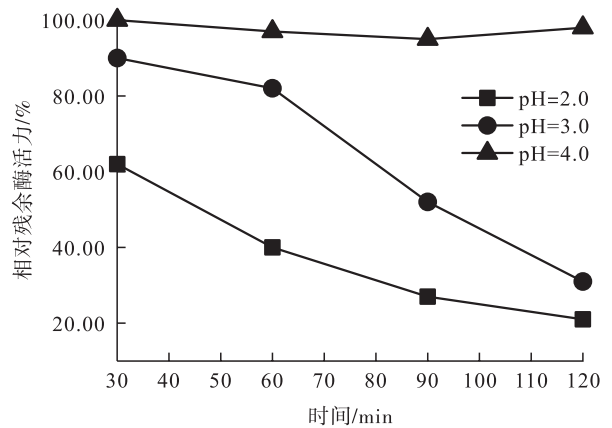


图 5 突变酶的 pH 稳定性

Fig. 5 pH stability of mutant enzymes

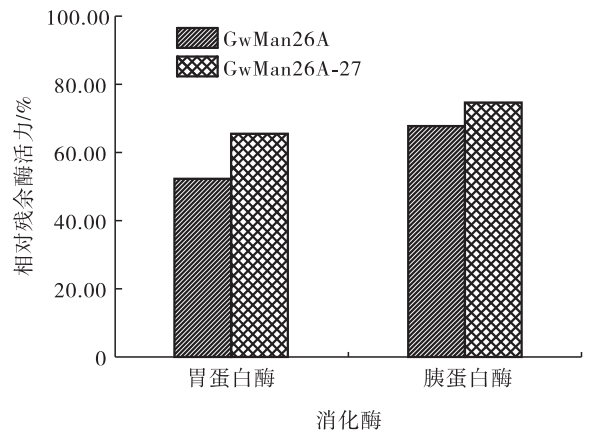


图 6 突变酶的消化酶稳定性

Fig. 6 Digestive enzymes stability of mutant enzymes

3 结论

本研究采用非理性设计方法(易错 PCR)

对 β -甘露聚糖酶进行了体外分子定向进化,经过两轮易错 PCR 构建了库容量约为 4000 的突变文库,并对筛选得到的突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α Z-GwMan26A-27 的突变酶 GwMan26A-27 的酶学性质进行了研究.结果表明:在突变文库的构建过程中,当添加 Mn^{2+} 的浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高(为 80%),氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的一般原则;GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性;与突变前酶 GwMan26A 相比,GwMan26A-27 具有较宽的酶促反应温度范围和适宜 pH 值范围,热稳定性和 pH 稳定性均有较大提升;在胃蛋白酶液和胰蛋白酶液中水浴 2 h,GwMan26A-27 的消化酶稳定性较突变前也均有所提升.

本研究可以简单、快速和较准确地完成高通量筛选工作,并且成功获得了耐酸、pH 作用范围广、热稳定性较好、酶活力较高和消化酶稳定性较高的突变酶 GwMan26A-27,解决了 β -甘露聚糖酶工业化生产和实际推广应用中的瓶颈问题.

参考文献:

- [1] SCHELLER H V, ULVSKOV P. Hemicelluloses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 263.
- [2] STÅLBRAND H, SIIKAAHO M, TENKANEN M, et al. Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Biotechnology, 1993, 29(3): 229.
- [3] KANSOH A L, NAGIEB Z A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103.
- [4] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355.
- [5] 熊进,黄魁英,夏枫耿,等.耐高温 β -甘露聚糖酶 M27-8 菌株发酵条件的优化[J].中国饲料,2017(19):13.
- [6] YÁEZ J L, BELTRANENA E, CERVANTES M, et al. Effect of phytase and xylanase supplementation or particle size on nutrient digestibility of diets containing distillers dried grains with solubles cofermented from wheat and corn in ileal-cannulated grower pigs [J]. Anim Sci, 2011, 89:113.
- [7] KIARIE E, NYACHOTI C M, SLOMINSKI B A, et al. Growth performance, gastrointestinal microbial activity and nutrient digestibility in early-weaned pigs fed diets containing flaxseed and carbohydrase enzyme [J]. Anim Sci, 2007, 85:2982.
- [8] LEE J T, BAILEY C A, CARTWRIGHT A L. Beta-mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions [J]. Poult Sci, 2003, 82(12):1925.
- [9] ZOU X T, QIAO X J, XU Z R. Effect of beta-mannanase (Hemicell) on growth performance and immunity of broilers [J]. Poult Sci, 2006, 85:2176.
- [10] KONG X D, LIU Y M, GOU X J, et al. Directed evolution of a-aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1):137.
- [11] EIJSINK V G, GSEIDNES S, BORCHERT T V, et al. Directed evolution of enzyme stability [J]. Biomol Eng, 2005, 22(1/3):21.
- [12] ARNOLD F H, WINTRODE P L, MIYAZAKI K, et al. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(2):100.
- [13] TURNER N J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(11):474.