

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.07.023

# 定向引入 N-糖基化位点促进芳基醇氧化酶热稳定性及底物亲和力

曹查, 朱作华, 龚文兵, 周映君, 谢纯良\*, 彭源德\*  
(中国农业科学院麻类研究所, 湖南长沙 410205)

**摘要:** 芳基醇氧化酶在木质素降解过程中发挥重要作用, N-糖基化修饰影响其酶学性质。该文旨在通过研究刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)来源的芳基醇氧化酶 N-糖基化, 来提高其热稳定性和底物亲和力。利用毕赤酵母 GS115 表达系统和定点突变技术, 构建表达 6 种芳基醇氧化酶突变体蛋白, 并对纯化后的野生型和突变体酶进行酶学性质和热稳定性分析。结果表明, 芳基醇氧化酶 N89 和 N249 糖基化位点突变导致最适温度和 70 °C 时酶热稳定性降低; 在这个过程中, 将其引入新的糖基化位点后的突变体, 其最适酸碱度没有变化, 最适温度以及 70 °C 下的热稳定程度都明显优于野生型; 以藜芦醇为底物时, 突变体[AAO(F-X-N-X-T)]与底物亲和力最高。N-糖基化主要影响芳基醇氧化酶的热稳定性, 其中 N89 和 N249 位点的 N-糖基化对酶的热稳定性起重要作用; 引入 N-糖基化位点[AAO(F-X-N-X-T)]能获得具有高活性和高稳定性的芳基醇氧化酶。

**关键词:** 芳基醇氧化酶; N-糖基化; 定点突变; 重组表达; 酶学性质

## Improvement of Thermal Stability and Substrate Affinity of Aryl-alcohol Oxidase by Directed Introduction of N-glycosylation Site

CAO Cha, ZHU Zuohua, GONG Wenbing, ZHOU Yingjun, XIE Chunliang\*, PENG Yuande\*  
(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, Hunan, China)

**Abstract:** Aryl-alcohol oxidase plays a crucial role in lignin degradation, and its enzymatic properties are influenced by N-glycosylation modification. This study aimed to investigate the N-glycosylation of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in order to enhance its thermal stability and substrate affinity. In this study, the expression system of *Pichia* GS115 and site-directed mutagenesis were used to construct the expressions of six aryl-alcohol oxidase mutant proteins. The purified wild-type and mutant enzymes were also analyzed for enzymatic properties and stability. The results indicated that the N-glycosylation mutations at sites N89 and N249 of aryl-alcohol oxidase caused reduced optimum temperature and enzymatic thermal stability at 70 °C. However, introducing a new glycosylation site through mutagenesis did not affect the optimum pH but significantly improved both the optimum temperature and thermal stability at 70 °C compared to the wild-type enzyme. When using p-coumaric alcohol as a substrate, the mutant [AAO(F-X-N-X-T)] exhibited the highest substrate affinity. N-glycosylation primarily affects the thermal stability of aryl-alcohol oxidase, with glycosylation at sites N89 and N249 playing a critical role in enzyme stability. The introduction of N-glycosylation site [AAO(F-X-N-X-T)] results in aryl-alcohol oxidase with enhanced activity and stability.

**Key words:** aryl-alcohol oxidase; N-glycosylation; site-directed mutation; recombination expression; enzymatic properties

引文格式:

曹查, 朱作华, 龚文兵, 等. 定向引入 N-糖基化位点促进芳基醇氧化酶热稳定性及底物亲和力[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(7): 165-173.

CAO Cha, ZHU Zuohua, GONG Wenbing, et al. Improvement of Thermal Stability and Substrate Affinity of Aryl-alcohol Oxidase by Directed Introduction of N-glycosylation Site[J]. Food Research and Development, 2024, 45(7): 165-173.

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5641)

作者简介: 曹查(1996—), 男(汉), 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢与酶工程。

\*通信作者: 谢纯良(1984—), 女, 研究员, 博士, 主要从事副产品综合利用研究; 彭源德(1965—), 男, 研究员, 硕士, 主要从事农产品生物炼制与转化研究。

芳基醇氧化酶是一种特殊的黄素过氧化物酶,具有广泛的底物特性,能够氧化非酚芳香醇类,包括苯甲基、萘基、苯丙烯醇和脂肪族的多不饱和醇等,生成相应的醛类物质,醛类物质再缓慢氧化成酸,在木质素降解和芳香族污染物处理领域具有重要的应用价值<sup>[1-2]</sup>。酶的高效、大量表达是推动其应用的前提<sup>[3-5]</sup>。由于野生型真菌的木质素降解酶合成效率普遍较低,且木质素降解酶的合成常需要毒性芳香化合物诱导,致使发酵液后期的处理难度大、生产成本低且容易导致环境污染<sup>[6-8]</sup>。

分子生物学技术的高速发展能够为木质素降解酶遗传物质实现异源大量表达提供一定的基础<sup>[9-11]</sup>。到目前为止,刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)原位表达系统尚未建立,在众多表达体系中,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为一种安全、高效的表达宿主,具有高密度培养和翻译后修饰等优点<sup>[12]</sup>。因此,将芳基醇氧化酶基因在毕赤酵母中表达可以促进该酶的实际工业化生产和应用。目前,*P. eryngii* 芳基醇氧化酶基因在毕赤酵母表达系统中成功得到表达<sup>[13-14]</sup>。与原生真菌酶相比,异源重组表达的酶存在比活力、热稳定性和底物亲和力降低的问题<sup>[5]</sup>。因此,如何提高异源表达芳基醇氧化酶的比活力和热稳定性等酶学性质成为酶制剂制备过程中亟需解决的关键问题。

N-糖基化修饰能够有效调节蛋白质活力和稳定性<sup>[15-17]</sup>。N-糖基化修饰还能够使磷酸酶具有更强的抗胃蛋白酶降解能力<sup>[18]</sup>。Yang等<sup>[19]</sup>通过对毕赤酵母表达根瘤菌脂肪酶的热稳定性分析发现,含有更多N-聚糖的脂肪酶更具耐热性。研究表明,4种选定的漆酶经糖苷内切酶H和N-糖酰胺酶F对进行去糖基化处理后,它们对邻苯二酚和2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐两种底物的亲和性变得基本相同<sup>[20]</sup>。Ma等<sup>[21]</sup>对5种具有单一N-糖基化位点突变的突变体进行了热稳定性测试、三维建模、动力学数据和二级结构分析,发现其中4个位点的N-糖基化通过微调 $\beta$ -夹心结构域的结构型,正向调节底物亲和力而引起酶活性的改变。Xu等<sup>[22]</sup>通过比较不同漆酶突变体的催化性能,发现rLcc9中N313和N454位点的糖基化会分别影响其对底物的结合亲和力和催化速率。此外,糖基化也会影响rLcc9和nLcc9的热稳定性,因为这些lcc9的去糖基化在一定程度上降低了它们的热稳定性。但是芳基醇氧化酶N-糖基化位点、糖基化程度、蛋白构象与酶学性质之间的关系尚不清楚,限制了利用糖基化工程对芳基醇氧化酶的酶学性质进行提升。目前,通过糖基化改造提高毕赤酵母重组表达芳基醇氧化酶活力和稳定性未见报道。本文以木质素高效降解菌株*P. eryngii*分泌的芳基醇氧化酶作为研究对象,分析天然状态与重组表达芳基醇氧化酶N-糖基

化修饰的特征与差异,阐明N-糖基化调控芳基醇氧化酶催化性质的分子机制,以期获得高活力、高稳定性芳基醇氧化酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

毕赤酵母GS115(*P. pastoris* GS115):美国Invitrogen公司;刺芹侧耳(*P. eryngii*,编号CICC 50126):中国工业微生物菌种保藏管理中心。

#### 1.1.2 材料、试剂和培养基

快流速DEAE-琼脂糖凝胶柱(DFE100):美国Sigma-Aldrich公司;丙烯葡聚糖凝胶S-200 HR、Source 15Q:上海泽叶生物科技有限公司;限制性核酸内切酶、T4连接酶、核酸胶回收试剂盒、DNA Marker:大连Takara生物技术公司;质粒提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;博来霉素:上海碧云天生物技术公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物:北京擎科生物科技有限公司;BMYG液体培养基、BMMY培养基:青岛日水生物技术有限公司;甲醇、胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、琼脂粉、山梨糖醇:美国Sigma公司。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA):马铃薯200 g/L,葡萄糖20.0 g/L,琼脂粉20.0 g/L。

酵母浸出粉葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD):胰蛋白胨20.0 g/L,酵母提取物10.0 g/L,琼脂粉20.0 g/L。

YPD山梨糖醇(yeast extract peptone dextrose sorbitol medium, YPDS)+博来霉素平板:葡萄糖20.0 g/L,胰蛋白胨20.0 g/L,酵母提取物10.0 g/L,山梨糖醇182 g/L,博来霉素0.1 g/L,琼脂粉20.0 g/L。

### 1.2 用于定点突变的芳基醇氧化酶N-糖基化位点筛选及确定

以已经公布的芳基醇氧化酶蛋白三维晶体结构为模板,利用SWISS-MODEL对其结构进行模拟。经过N-糖基化在线搜索引擎NetGlyc1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对潜在的芳基醇氧化酶N-糖基化位点进行预测。根据质谱鉴定结合生物信息学分析选取目标突变糖基化位点。在上述芳基醇氧化酶上将关键位点进行单点或多点突变,将芳基醇氧化酶N89和N249号糖基化中的天冬酰胺(asparagine, Asn)突变成丙氨酸(alanine, A),构建3个突变体(N89A、N249A、N89/249A)。为了提高糖基化修饰的发生率,可将其构成增强芳香族序列(enhanced aromatic sequence, EAS)的形式。目标突变序列主要关注那些较少氨基酸的突变就能导致EAS序列形成的

氨基酸序列,因此糖基化较高的 loop/turn 区上的氨基酸序列比较合适。采用 PyMOL 软件的方式,在三维结构晶体上,对目标突变位点的所处位置进行初步分析,最后得出该序列在蛋白质三维结构表面上,而且远离活性位点,且处于 loop/turn 区的位置。根据以上原则,突变体表达如下:AAO(F-X-N-X-T),AAO(F-N-X-T)和 AAO(F-X-X-N-X-T)。

### 1.3 *P. eryngii* 芳基醇氧化酶野生型和突变体的酵母表达载体构建

双酶切含有野生型及突变体基因质粒后,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,进行胶回收纯化和 T 载体连接。采用 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态。将 10  $\mu$ L 的连接产物加到感受态细胞中,进行转染和菌落 PCR 鉴定,出现目的条带的菌种,进行测序分析。目的基因阳性菌种经过鉴定正确之后,对其采取复苏培养处理,对重组质粒进行处理。针对目的基因重组质粒与表达载体 pPIC9K,采取双酶切的方式,利用胶回收酶切产物,经过连接之后,实现重组表达载体的构建。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,筛选出重组菌,扩培后提取质粒并对其进行 PCR 验证和双酶切验证,阳性菌种测序,保存鉴定正确的目的基因重组表达菌种。

### 1.4 重组质粒电击转化毕赤酵母 GS115 及其重组子的筛选

通过 DNA 测序验证突变后,对重组质粒进行单酶切线性化,将酶切产物进行胶回收。电穿孔转化为毕赤酵母 GS115 感受态细胞。随后,在含 100  $\mu$ g/mL 博来霉素 YPDS 平板上选择转化子。

转化子进一步划线于含 G418 的 YPD 平板上,28  $^{\circ}$ C 培养 2 d 至单菌落出现后,转接于 10 mL BMGY 液体培养基中,于 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 48 h,收集菌体,弃上清液;通过采用 BMMY 诱导培养基,稀释菌体直到 OD<sub>600</sub>=1,在 30  $^{\circ}$ C 的温度状态下,200 r/min 摇床培养。添加甲醇,以保证每天终浓度为 0.5% (体积分数),诱导 3 d 后每隔 24 h 收集一次培养上清液。得到的上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析,筛选阳性单菌落。

### 1.5 *P. eryngii* 芳基醇氧化酶分离和纯化

将阳性单菌落转接至含 100 mL BMGY 液体培养基的 300 mL 锥形瓶进行扩大培养 72 h,转速为 3 000 r/min,离心时间 5 min,收集上清液,利用 35% 饱和度硫酸铵,予以初次沉淀处理,在二次沉淀时,采用 75% 饱和度硫酸铵将大多数杂蛋白从发酵液内去除,进而采用化学亲和、离子交换法、疏水和凝胶过滤等多层析方式纯化表达中的重组蛋白质,获得较高纯度的酶<sup>[14,23]</sup>,并进行后续酶活性的测定。

## 1.6 芳基醇氧化酶催化性质研究

### 1.6.1 酶活力测定

在 1 mL 反应混合液体系中,藜芦醇为 10 mmol/L,而且还含有 100 mmol/L (pH6.0)磷酸钠缓冲液以及一些酶液,室温下,于 310 nm 处测定吸光度的变化 (310 nm 处藜芦醇摩尔吸光系数  $\epsilon=9\ 300$ ),以 100  $^{\circ}$ C 加热灭活的酶反应混合液为对照。在每毫升反应混合液内,1  $\mu$ mol 产物在每分钟需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

### 1.6.2 酶催化特性的测定

最适温度:在相同 pH 值反应条件和反应体系下,将重组突变酶或野生型酶与底物在不同温度 (20~80  $^{\circ}$ C) 下反应,按 1.6.1 测定酶活力,确定木质素降解酶的最适反应温度。最适 pH 值:野生型酶或重组突变酶在不同 pH 值 (1~12) 下与底物反应,采用 1.6.1 方法测定酶活力,从而明确最佳反应 pH 值。pH 值稳定性:分别将其混合到不同 pH 值 (1~12) 缓冲液内,在 37  $^{\circ}$ C 的温度环境下,放置 3 h,对剩余酶活力进行测定,参照标准即为最适 pH 值的酶活,并使其稳定性得以明确。热稳定性:通过调整野生型酶样品与表达的突变体,保持一致的浓度 (0.15 mg/mL),在 70  $^{\circ}$ C 及以上的水浴中处理 15 min,处理后立即置于冰上冷却,在 37  $^{\circ}$ C 的条件下,温育时间为 5 min,对剩余酶活进行测定,各个反应的重复次数为 3 次。动力学常数:基于最适 pH 值的状态下,配制不同浓度的底物,分别表示为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 以及 1.2 g/L,取一定量的重组突变酶或野生型酶与底物在 40  $^{\circ}$ C 反应 10 min,进行酶活测定。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法得出结果。

## 2 结果与分析

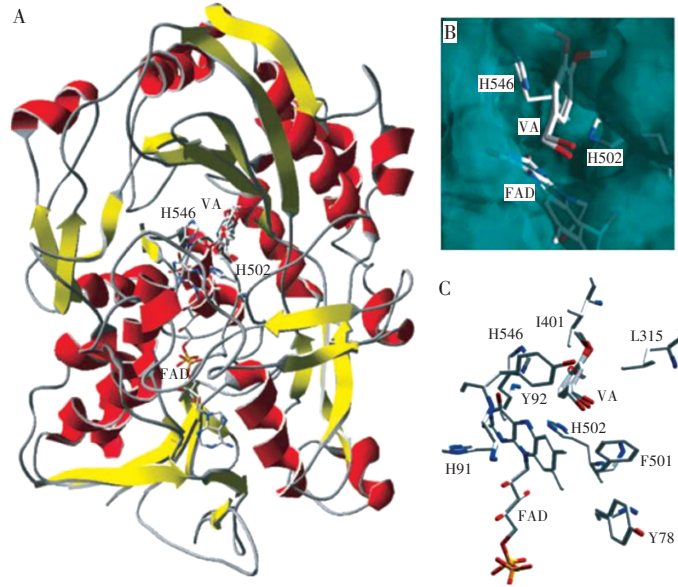
### 2.1 对芳基醇氧化酶 N-糖基化位点进行生物信息学预测和结构分析

采取生物信息学预测的方式,以 N-糖基化在线搜索引擎 Net Glyc1.0 Server 为依托,预测分析 N-糖基化位点,通过对芳基醇氧化酶进行研究后发现,在 N89 号和 N249 号位点位置处,表现出糖基化修饰的特点。具体见图 1<sup>[24]</sup>。

### 2.2 突变体克隆表达

对突变体 AAO(N89A)、AAO(N249A)、AAO(N89/249A)、AAO(F-X-N-X-T)、AAO(F-N-X-T)和 AAO(F-X-X-N-X-T)的全质粒扩增产物进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 和图 3 所示。

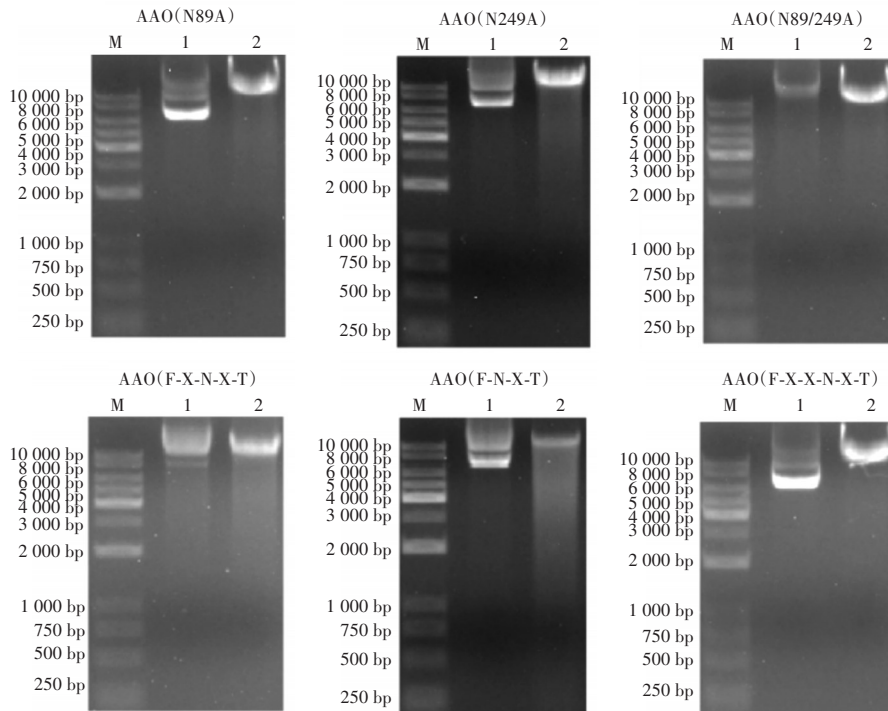
从图 2 和图 3 中可以看出,理论 PCR 产物的大小约为 2 275 bp;经 PCR 筛选后,琼脂糖凝胶电泳结果显示,能筛选到较多的阳性克隆菌落,初步说明定点突变成功。



A. 芳基醇氧化酶分子结构通用框架;B. 分子对接后溶剂接触表面的细节;C. AAO 活性位点的氨基酸残基。

图1 芳基醇氧化酶结构图

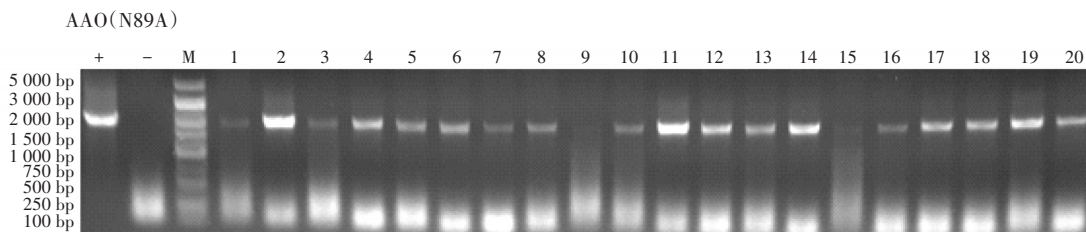
Fig.1 Structural diagram of the aryl-alcohol oxidase

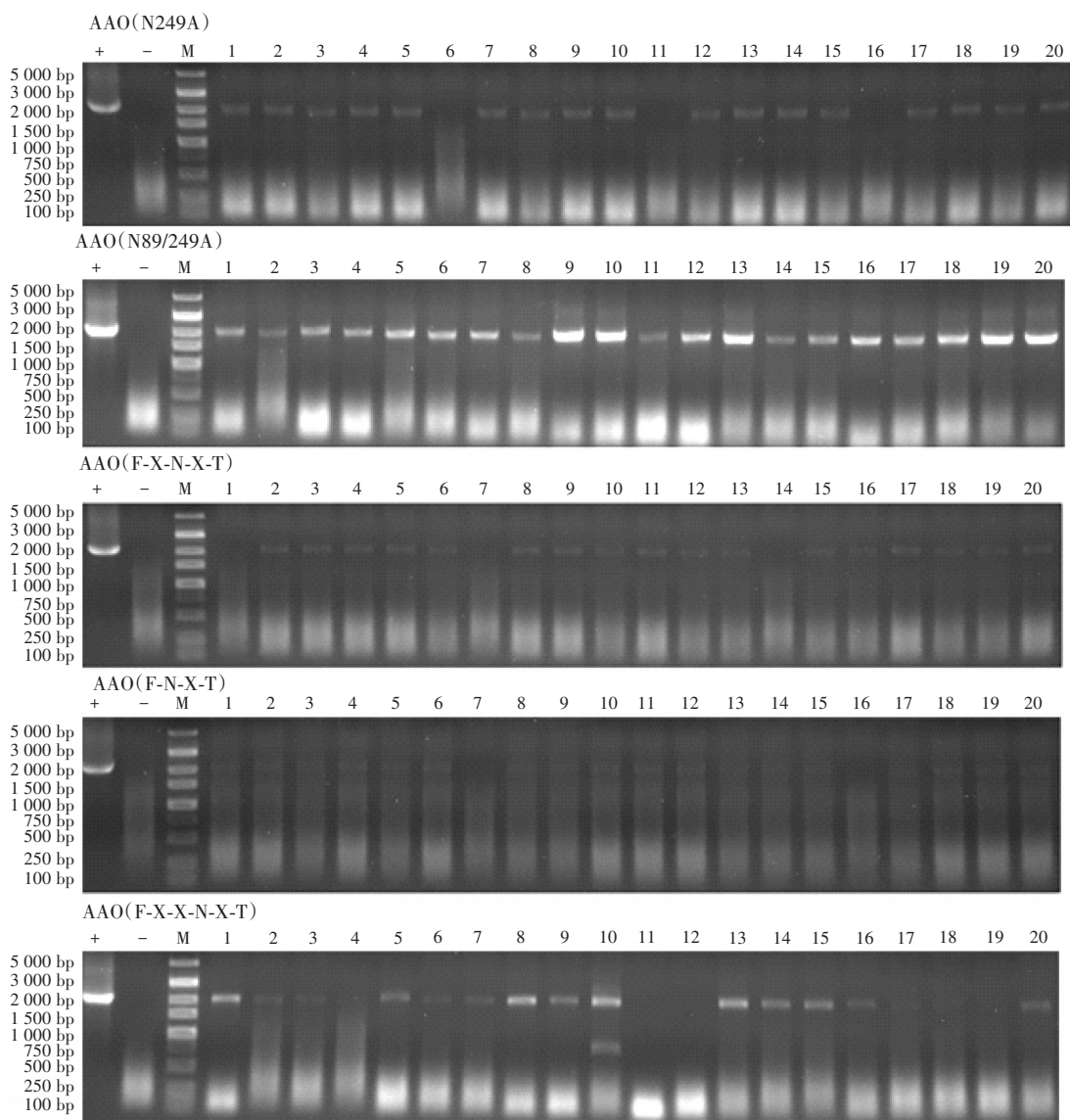


M. 1kb Plus DNA Marker; 1. 线性化前; 2. 线性化后。

图2 质粒线性化结果

Fig.2 Results of plasmid linearization





M.DNA Marker; 1~20. 不同克隆 PCR 结果;+. 阳性对照(P101364 质粒);-. 阴性对照(无菌水)。

图3 PCR 反应电泳结果

Fig.3 Electrophoresis results of the PCR reaction

### 2.3 小量表达测试

诱导表达各重组子之后,上清液 SDS-PAGE 的结果见图 4。

由图 4 可知,各重组子均可表达相应的突变酶且表达量与野生型大致相同。芳基醇氧化酶的理论分子量为 70 kDa,在毕赤酵母中表达其分子量会因发生 N-糖基化而增加,故实际分子量大于 70 kDa。

### 2.4 重组表达芳基醇氧化酶分离纯化及酶活性测定结果分析

重组表达野生型芳基醇氧化酶发酵上清液经硫酸铵沉淀,对粗酶液采取重溶透析之后,根据 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换层析柱进行操作, Sephacryl S-200 High Resolution 凝胶过滤层析柱和 Source 15Q 强阴离子交换层析柱,随峰值检测芳基醇氧化酶

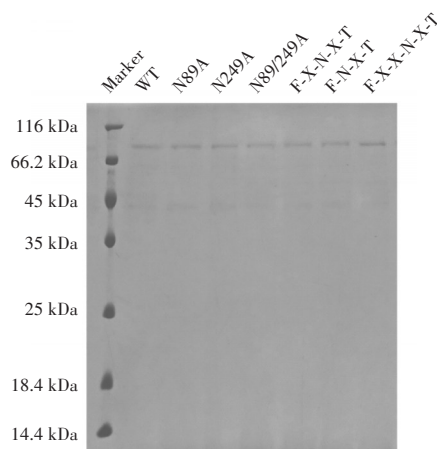


图4 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.4 The analysis for SDS-PAGE electrophoresis

活性并收集层析产物,重组表达芳基醇氧化酶分离纯化及酶活性的结果见表1。

表1 芳基醇氧化酶分离纯化  
Table 1 Isolation and purification of aryl-alcohol oxidase

纯化步骤	总蛋白/ mg	总酶活 力/U	比活力/ (U/mg)	纯化 倍数	得率/%
粗酶液	469.0	22 453	47.8	1.0	100
盐析	117.0	12 064	103.1	2.1	53
弱阴离子交换 色谱	57.1	9 465	165.7	3.4	42
凝胶过滤色谱	42.9	8 392	195.6	4.0	37
强阴离子交换 色谱	27.4	6 082	221.3	4.6	27

由表1可知,经上述步骤纯化后,芳基醇氧化酶比活力为221.3 U/mg,较粗酶液纯化了4.6倍,回收率为27%。通过Source 15Q强阴离子交换层析柱继续对6个芳基醇氧化酶糖基化突变体进一步进行纯化,进行了酶活检测,结果如图5所示。

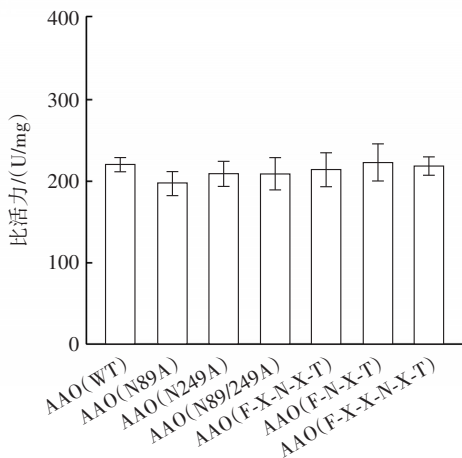


图5 芳基醇氧化酶野生型和6个糖基化突变体酶活检测结果  
Fig.5 Results of the enzyme activity of wild type aryl-alcohol oxidase and six glycosylation mutants

由图5可知,与野生型相比,突变体酶活没有明显差异。

## 2.5 野生型和6个突变体纯化后芳基醇氧化酶酶学性质分析

### 2.5.1 pH值对芳基醇氧化酶活性的影响

分别配制100 mmol/L pH2.0~4.5的胃石酸钠缓冲液、100 mmol/L pH6.0~8.0的磷酸钠缓冲液和100 mmol/L pH8.0~12.0的广泛缓冲液体系。对芳基醇氧化酶不同突变体进行酶活测定,改变缓冲体系,设定最高者的相对酶活为100%。在以上条件下,pH值对野生型和6个突变体芳基醇氧化酶活性的影响见图6。

从图6中可以看出,以藜芦醇为底物时,芳基醇氧化酶在pH5.0~7.0之间显示出较强的酶活,其中在pH值为6.0时活力最高。如果pH值高于8.0,将会迅速

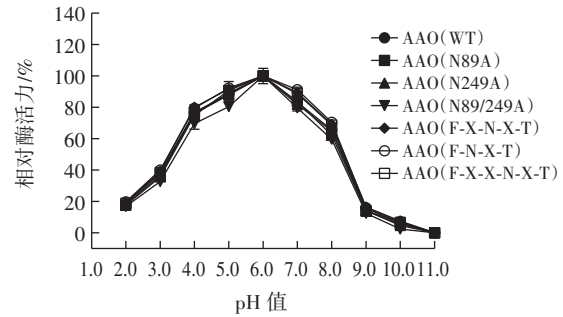


图6 pH值对芳基醇氧化酶酶活性的影响

Fig.6 Effect of pH on aryl-alcohol oxidase activity

降低酶活力,如果这一数值为11.0,无法对酶活力进行检测。同时,不同突变体的酶活力结果显示,加入或删除糖基化位点对芳基醇氧化酶的最适pH值几乎没有影响。

### 2.5.2 温度对芳基醇氧化酶活性的影响

由2.5.1得出的最适催化pH值的缓冲体系测定酶活力,将该缓冲体系在20~90℃温度梯度下保温10 min,设定最高者的相对酶活力为100%,缓冲体系应用的即为pH6.0。在以上条件下,温度对野生型和6个突变体芳基醇氧化酶活性的影响见图7。

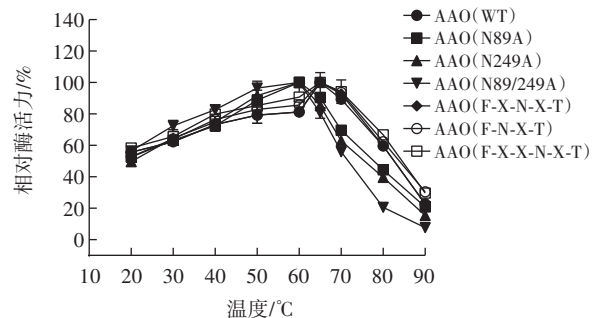


图7 温度对芳基醇氧化酶酶活性的影响

Fig.7 Effect of temperature on aryl-alcohol oxidase activity

从图7可知,突变N89和N249糖基化位点后,芳基醇氧化酶的最适温度降低为60℃,引入新的糖基化位点后,最适温度没有明显变化,同于野生型的65℃温度。

### 2.5.3 芳基醇氧化酶的热稳定性

将芳基醇氧化酶与最适稳定pH值缓冲液充分混合,置于60~100℃温度梯度下,保温24 h,设定原始芳基醇氧化酶的相对活力为100%。采用pH6.0的缓冲体系与芳基醇氧化酶的酶液混合,分别放在不同温度的水浴锅里保温24 h后测定酶活力。在以上条件下,野生型和6个突变体芳基醇氧化酶的热稳定性见图8。

从图8中可以看出,芳基醇氧化酶在60℃和65℃时,经过24 h后仍能保持很高的活性;但随着温度的升高,酶活力逐渐下降,在80℃时,野生型酶残余酶活力降至40%左右;相较于野生型而言,N89和

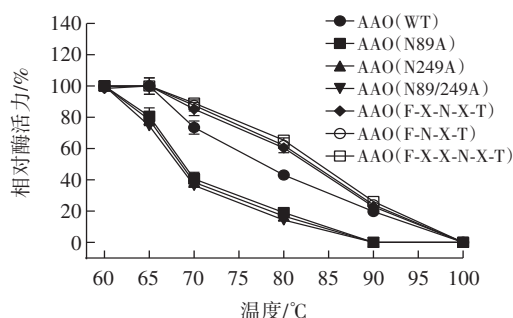


图8 芳基醇氧化酶野生型和6个糖基化突变体热稳定性  
Fig.8 Thermal stability of wild-type and six glycosylation mutants of aryl-alcohol oxidase

N249糖基化位点的突变导致了热稳定性的降低。相反地,F-X-N-X-T、F-N-X-T和F-X-X-N-X-T这3种引入了不同糖基化位点的突变体,随着温度的上升,相对酶活力下降的速度明显比野生型慢,当温度上升至80℃时还保留了60%左右的酶活力。

#### 2.5.4 野生型和6个突变体纯化后芳基醇氧化酶的动力学参数

野生型和6个突变体芳基醇氧化酶的动力学参数见表2。

表2 芳基醇氧化酶动力学参数  
Table 2 Kinetic parameters of aryl-alcohol oxidase

芳基醇氧化酶类型	比活力/(U/mg)	米氏常数	催化常数/s <sup>-1</sup>
AAO(WT)	221.3±6.9	925.3±46.7	32.7±1.3
AAO(N89A)	198.6±11.5	945.5±55.2	30.8±0.9
AAO(N249A)	209.7±13.6	962.6±29.6	29.5±0.2
AAO(N89/249A)	208.6±20.4	969.3±27.9	28.9±0.7
AAO(F-X-N-X-T)	215.1±18.7	887.5±30.7	36.9±0.5
AAO(F-N-X-T)	224.6±19.1	928.9±35.6	33.1±0.8
AAO(F-X-X-N-X-T)	219.5±9.9	933.1±23.9	33.6±0.9

表2结果表明,糖基化位点突变对芳基醇氧化酶比活力影响不大,但是,N89和N249糖基化位点突变后会影响酶和底物的亲和力,突变体AAO(F-X-N-X-T)具有更高的糖基化水平,与此同时,催化效率与底物亲和力也相对较高。

### 3 讨论与结论

不同的侧耳属,烟管菌和黄孢原毛平革菌属中都有芳基醇氧化酶表达<sup>[1]</sup>。其中*P. eryngii*芳基醇氧化酶研究最为广泛<sup>[25]</sup>。吴茵等<sup>[25]</sup>从*P. eryngii*中获得的纯化芳基醇氧化酶分子量和等电点分别为70 kDa和4.2。以藜芦醇为底物进行酶活测定,最适pH值为6.0,最适反应温度40℃。同时,来自*P. eryngii*的芳基醇氧化酶基因分别在酿酒酵母和毕赤酵母表达系统

中成功得到表达<sup>[13]</sup>。

研究表明,糖基化影响蛋白质的空间构象、酶对底物的识别催化能力及其热稳定性<sup>[26-28]</sup>。在现代酶学研究中,糖基化逐渐成为研究者关注的热点<sup>[29-30]</sup>。研究发现,蛋白糖基化主要有两种形式,其一是N-糖基化,其二即为O-糖基化。相关研究表明,N-糖基化修饰可以有效调节真菌胞外分泌酶活性和稳定性。黑曲霉植酸酶phyA2去糖基化处理后活性下降了10%<sup>[31]</sup>;对毕赤酵母重组表达的乙酰木聚糖酯酶33号和99号N-糖基化位点进行突变,突变体与原酶相比,在比活力上没有明显差别,而稳定性均有明显的下降<sup>[32]</sup>。泡盛曲霉阿魏酸酯酶糖基化位点N79分别定点突变为N79A和N79Q,两个突变体热稳定性和酶活性明显降低<sup>[33]</sup>。相反地,突变位于反向转角区具有EAS特征的位点,能显著提高碱性果胶酶和β-葡萄糖醛酸苷酶活性和热稳定性<sup>[34-35]</sup>。

本文以毕赤酵母GS115为表达系统,成功表达了不同N-糖基化水平的芳基醇氧化酶突变体,对野生型和突变体蛋白进行酶学性质分析发现,突变芳基醇氧化酶N89和N249糖基化位点的突变导致最适温度和酶热稳定性降低,在酶的loop/turn区引入具有EAS特征的新N-糖基化,对提高其热稳定性具有显著促进作用。以藜芦醇为底物时,突变体AAO(F-X-N-X-T)与底物亲和力最高,其他突变体基本不变。结果表明,糖基化程度的提高与芳基醇氧化酶热稳定性提高存在明显的相关性,这与之前的研究相符。

经N-糖基化改造获得的高酶活、高稳定性重组芳基醇氧化酶突变酶AAO(F-X-N-X-T)的最适反应温度为65℃、最适反应pH值为6,其最适温度和70℃下的热稳定性都明显优于野生型。通过合适的定点突变和引入N-糖基化位点[AAO(F-X-N-X-T)]等措施对芳基醇氧化酶N-糖基化进行改造,获得了具有高亲和力、高稳定性的芳基醇氧化酶。本文为揭示N-糖基化修饰调控芳基醇氧化酶酶学性质的普遍规律,利用糖基化工程生产高品质的酶提供理论依据。

#### 参考文献:

- HERNÁNDEZ-ORTEGA A, FERREIRA P, MARTÍNEZ A T. Fungal aryl-alcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1395-1410.
- FERREIRA P, HERNÁNDEZ-ORTEGA A, LUCAS F, et al. Aromatic stacking interactions govern catalysis in aryl-alcohol oxidase [J]. The FEBS Journal, 2015, 282(16): 3091-3106.
- 林影, 韩双艳, 袁清焱, 等. 酶高效表达体系构建及高通量筛选关键技术[J]. 生物产业技术, 2019(3): 44-53.  
LIN Ying, HAN Shuangyan, YUAN Qingyan, et al. Key technologies of construction of efficient enzyme expression system and high-throughput screening[J]. Biotechnology & Business, 2019(3): 44-53.

- [4] 陈洲, 王亚森, 汪步青, 等. 枯草芽孢杆菌来源的碱性果胶酶在毕赤酵母中的高效表达[J]. 食品科技, 2022, 47(2): 1-9.  
CHEN Zhou, WANG Yasen, WANG Buqing, et al. High-efficiency expression of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(2): 1-9.
- [5] 王玉川, 马俊文, 李延啸, 等. 米黑根毛霉  $\alpha$ -淀粉酶的定向进化、高效表达及在面包中的应用[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(11): 78-85.  
WANG Yuchuan, MA Junwen, LI Yanxiao, et al. Directed evolution and high-level expression of  $\alpha$ -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in bread[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(11): 78-85.
- [6] 胡越, 安运平, 郭恒, 等. 锰离子 Mn(II)对糙皮侧耳木质素降解酶活性和原基形成的影响[J]. 菌物学报, 2019, 38(1): 98-106.  
HU Yue, AN Yunping, GUO Heng, et al. Effects of manganese ion [Mn(II)] on the lignin-degrading enzymes' activities and primordium formation of *Pleurotus ostreatus*[J]. Mycosystema, 2019, 38(1): 98-106.
- [7] 刘瑞, 李彦春, 赵艳霞, 等. 芳香族化合物对木质素降解酶系分泌的影响[J]. 中国皮革, 2016, 45(3): 41-45, 50.  
LIU Rui, LI Yanchun, ZHAO Yanxia, et al. Effect of aromatic compounds on secretion of lignin-degrading enzymes[J]. China Leather, 2016, 45(3): 41-45, 50.
- [8] 钟紫旋, 刘丽, 张勇, 等. 诱导物及种间诱导对白腐菌的锰过氧化物酶(MnP)的诱导[J]. 食品工业科技, 2015, 36(9): 166-170.  
ZHONG Zixuan, LIU Li, ZHANG Yong, et al. Induction on the manganese peroxidase of white-rot fungi by exogenous inducers and interspecific induction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9): 166-170.
- [9] 高娃, 其布日, 萨初拉, 等. 漆酶基因的克隆及其在产脲假丝酵母中的表达[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(6): 167-173.  
GAO Wa, QI Buri, SA Chula, et al. Cloning of laccase gene and the expression in *Candida utilis*[J]. Food Research and Development, 2022, 43(6): 167-173.
- [10] 张志清. 乳酸乳球菌异源表达漆酶及在玉米秸秆青贮应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2020.  
ZHANG Zhiqing. Construction of recombinant *Lactococcus lactis* with laccase secreting ability and its application in silage of corn stalk[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2020.
- [11] 孙莹. 锰过氧化物酶的酵母异源表达及其降解黄曲霉毒素研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.  
SUN Ying. Study on expression of manganese peroxidase and its degradation of aflatoxin by recombinant yeast[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [12] 唐元家, 余柏松. 巴斯德毕赤酵母表达系统[J]. 国外医药(抗生素分册), 2002, 23(6): 246-250, 271.  
TANG Yuanjia, YU Bosong. The *Basteur pichia* yeast expression system[J]. World Notes on Antibiotics, 2002, 23(6): 246-250, 271.
- [13] VIÑA-GONZALEZ J, ELBL K, PONTE X, et al. Functional expression of aryl-alcohol oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* by directed evolution[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(7): 1666-1674.
- [14] 刘元金. 杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)漆酶基因的克隆及其异源表达研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.  
LIU Yuanjin. Molecular cloning of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* and study on its heterogenous expression[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009.
- [15] 韩铭海, 王未鲜, 于志海. N-糖基化修饰对异源蛋白在毕赤酵母中表达的作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(11): 14-17.  
HAN Minghai, WANG Weixian, YU Zhihai. Research progress on the effect of N-glycosylation on production of heterologous proteins in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(11): 14-17.
- [16] 李新新, 柏映国, 华晨, 等. 毕赤酵母表达的嗜热蓝状菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶 N-糖基化修饰的作用与功能[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 37-47.  
LI Xinxin, BAI Yingguo, HUA Chen, et al. Effect of N-glycosylation on enzymatic properties of  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces leycettanus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 37-47.
- [17] 周小菊, 纳涛, 马宁宁, 等. 糖基化基因修饰对重组蛋白表达及活性的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(9): 1029-1035, 1039.  
ZHOU Xiaojie, NA Tao, MA Ningning, et al. Effect of glycosylation gene modification on expression and activity of recombinant protein[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(9): 1029-1035, 1039.
- [18] NIU C F, LUO H Y, SHI P J, et al. N-glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 82(4): 1004-1014.
- [19] YANG M, YU X W, ZHENG H Y, et al. Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 40.
- [20] GLAZUNOVA OLGA A, MOISEENKO Konstantin V, KAMENIHINA Inna A, et al. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: Does glycosylation matter? [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): 2008.
- [21] MA J Y, LI Q, TAN H D, et al. Unique N-glycosylation of a recombinant exo-inulinase from *Cluyveromyces ciferriusporus* and its effect on enzymatic activity and thermostability[J]. Journal of Biological Engineering, 2019, 13: 81.
- [22] XU G F, WU Y W, ZHANG Y L, et al. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(5): 518-524.
- [23] 陈敏. 刺芹侧耳木质素降解酶的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.  
CHEN Min. Study on the ligninolytic enzymes from *Pleurotus eryngii*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [24] FERREIRA P, RUIZ-DUEÑAS F J, MARTÍNEZ M J, et al. Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an  $H_2O_2$ -producing ligninolytic enzyme[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(21): 4878-4888.
- [25] 吴茵, 陈敏, 郭倩. 刺芹侧耳芳基醇氧化酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 菌物学报, 2016, 35(6): 705-713.  
WU Yin, CHEN Min, GUO Qian. Purification and characterization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*[J]. Mycosystema, 2016, 35(6): 705-713.
- [26] 赫荣乔. 糖基化 3-磷酸甘油醛脱氢酶的含糖量及其构象变化[J]. 生物物理学报, 1994, 10(3): 361-366.  
HE Rongqiao. Determination of the sugar bound to D-glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase and study on conformational changes of the enzyme[J]. Acta Biophysica Sinica, 1994, 10(3): 361-366.
- [27] 黎广祺. 高温秸秆堆肥菌株烟曲霉 Z5 中 GH10 家族木聚糖酶 XynAF1 作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.  
LI Guangqi. Study on the mechanism of GH10 family xylanase XynAF1 in *Aspergillus fumigatus* Z5, a thermophilic straw composting strain[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.



- [28] 周燕霞. 定向引入 N-糖基化位点对 *Aspergillus niger*  $\beta$ -1, 4-内切木聚糖酶热稳定性质改进的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2019.  
ZHOU Yanxia. Study on the improvement of thermal stability of *Aspergillus niger*  $\beta$ -1, 4- endoxylanase by directional introduction of N-glycosylation site[D]. Guangzhou: Jinan University, 2019.
- [29] GE F, ZHU L B, AANG A N, et al. Recent advances in enhanced enzyme activity, thermostability and secretion by N-glycosylation regulation in yeast[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(5): 847-854.
- [30] TZELEPIS G, KARLSSON M, SUZUKI T. Deglycosylating enzymes acting on N-glycans in fungi: Insights from a genome survey[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017, 1861(11): 2551-2558.
- [31] TANG Z Z, JIN W Q, SUN R, et al. Improved thermostability and enzyme activity of a recombinant phyA mutant phytase from *Aspergillus niger* N25 by directed evolution and site-directed mutagenesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 108: 74-81.
- [32] 田斌. N 糖基化和 CBM 对乙酰木聚糖酯酶分泌尧活力及稳定性影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.  
TIAN Bin. Effect of N-glycosylation and CBM on that activity and stability of acetyl xylan esterase secretion[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2012.
- [33] KOSEKI T, TAKAHASHI K, HANDA T, et al. N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* Feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(10): 2476-2480.
- [34] 昂安娜. N-糖基化改造碱性果胶酶的热稳定性[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2018.  
ANG Anna. Thermal stability of alkaline pectinase modified by N-glycosylation[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2018.
- [35] 樊艳爽.  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的 N-糖基化设计及热稳定性研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2015.  
FAN Yanshuang. N- glycosylation design and thermal stability of  $\beta$ -glucuronidase[D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2015.

责任编辑:王艳

收稿日期:2022-09-23