

新型GH45家族纤维素酶的智能挖掘及其在里氏木霉中的高效表达

王瑾¹, 白静², 赵晶², 田健², 张伟³, 王苑², 杨浩萌², 石美杉², 张贝贝¹, 徐欣欣^{3*}, 黄火清^{2*}

1.青岛农业大学动物科技学院, 山东 青岛 266109;

2.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;

3.中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 利用生物信息学方法和蛋白质性质预测模型挖掘新型GH45家族纤维素酶, 实现其在里氏木霉中的高效表达, 以期作为畜牧饲料加工提供新的酶源。通过Preoptem蛋白模型预测工具结合公共数据库Uniparc, 筛选得到 *Thielaviopsis punctulate* 来源的GH45家族纤维素酶TpCel45A。将其编码基因进行合成后构建表达载体, 通过原生质体转化里氏木霉菌株, 表达纯化获得重组TpCel45A蛋白并进行酶学性质测定。结果显示, 重组TpCel45A的最适温度为55 °C, 最适pH为5.5, 并展现出良好的热稳定性, 80 °C处理15 min后仍保持84%以上的酶活。重组TpCel45A具有宽泛的pH稳定性, 在pH 4.0~9.0范围内处理1 h后剩余酶活力达52%以上。动力学参数测定显示, TpCel45A的 K_m 为 $8.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, V_{\max} 为 $19.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, k_{cat} 为 377.1 s^{-1} , 催化效率 k_{cat}/K_m 值为46.9。TpCel45A的挖掘、鉴定及异源表达为纤维素酶的工业应用提供了新的酶源。此外, TpCel45A优异的热稳定性和pH稳定性使其在高温制粒工艺和不同pH条件下具有良好的应用潜力, 尤其在饲料加工和生物质转化利用等领域具有重要的应用价值。

关键词: 纤维素酶; GH45; 里氏木霉; 高效表达

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0189

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A

Intelligent Mining of Novel GH45 Cellulases and its Efficient Expression in *Trichoderma reesei*

WANG Jin¹, BAI Jing², ZHAO Jing², TIAN Jian², ZHANG Wei³, WANG Yuan², YANG Haomeng², SHI Meishan², ZHANG Beibei¹, XU Xinxin^{3*}, HUANG Huoqing^{2*}

1.College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China;

2.Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3.Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Utilizing bioinformatics methods and protein property prediction models to mine novel GH45 family cellulases, and achieving their efficient expression in *Trichoderma reesei*, in order to provide a new enzyme source for animal feed processing. By using the Preoptem protein model prediction tool combined with the public database Uniparc, the GH45 family cellulase TpCel45A from *Thielaviopsis punctulate* was screened. We synthesized the encoded gene and construct an expression vector, and transformed it into a strain of *Trichoderma reesei* using protoplasts. The recombinant TpCel45A protein was obtained through expression and purification, and its enzymatic properties were determined. The research showed that the optimal temperature and pH for recombinant TpCel45A were 55 °C and 5.5, respectively, and exhibited good thermal stability. After 15 minutes of treatment at 80 °C, the enzyme

收稿日期: 2024-11-27; 接受日期: 2025-01-21

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFA0912300); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2024QC15); 国家肉鸡产业技术项目体系(CARS-41-G19)。

联系方式: 王瑾 E-mail: wjinwj@163.com

* 通信作者 黄火清 E-mail: huanghuoqing@caas.cn; 徐欣欣 E-mail: xuxinxin@caas.cn

activity remained over 84%. In addition, TpCel45A exhibits good stability within the pH range of 4.0~9.0, with residual enzyme activity exceeding 52%. The determination of kinetic parameters showed that the K_m of the cellulase was $8.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, V_{\max} is $19.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, the k_{cat} value is 377.1 s^{-1} , and the catalytic efficiency k_{cat}/K_m value is 46.9. The excavation, identification, and heterologous expression of TpCel45A provide a new enzyme source for the industrial application of cellulase. In addition, the excellent thermal stability and pH stability of TpCel45A make it have the potential for application in high-temperature granulation and different pH environments, and have important application value in fields such as feed processing and biomass conversion utilization.

Key words: cellulase; GH45; *Trichoderma reesei*; efficient expression

纤维素酶是一类复合酶系,主要由外切葡聚糖酶(exo-1,4- β -D-glucanase)、内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase)和 β -葡萄糖苷酶(1,4- β -D-glucosidases)3种水解酶构成^[1],3种酶相互协作将纤维素降解为葡萄糖^[2]。近年来,一些新的纤维素降解辅助酶被发现,如裂解性多糖单加氧酶(lysogenic polysaccharide monooxygenase, LPMO)、膨胀因子和纤维素诱导蛋白(cellulose induced protein 1, CLP1)等,它们可以协助纤维素酶降解纤维素生成单糖^[3]。纤维素酶在生物能源、纺织、饲料等领域都有着广泛的应用。在饲料工业中,纤维素酶作为畜牧业的一种饲料添加剂,可以弥补动物体内纤维素酶的不足,增进畜禽食欲,促进生长发育。如 Lessard 等^[4]和 Chen 等^[5]发现在育肥猪的饲料中添加纤维素酶,可提高育肥猪消化干物质(dry matter, DM)、粗蛋白(crude protein, CP)、总能(total energy, GE)、中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)的表观总消化率(apparent total digestibility, ATTD),且能够降低二氧化碳的排放率。另外,纤维素酶还可以有效改善青贮饲料中的菌群环境。Du 等^[6]和 Chen 等^[7]发现在青贮饲料中同时添加纤维素酶与一些乳酸杆菌剂,可有效抑制有害微生物(如梭菌)的生长,优化青贮饲料中细菌菌落的组成,从而提高青贮饲料的质量。Cai 等^[8]在荷斯坦奶牛瘤胃内容物中检测到大量纤维素酶和半纤维素酶基因的转录本,突显了纤维素酶在反刍动物饲料消化中的作用,有助于了解生物质转化系统并通过这个系统提高反刍动物饲料的利用。

纤维素酶分布在不同的糖苷水解酶家族中。碳水化合物活性酶数据库——CAZy 数据库(www.cazy.org)显示,目前共有189个糖苷水解酶家族。尽管同一糖苷水解酶家族的成员在三维结构上保持一定的相似性,但它们在生物学来

源、催化活性、底物特异性以及氨基酸序列一致性方面具有显著的多样性。此外,不同家族中也可能存在具有相同催化功能的酶。比如,参与纤维素降解的内切葡聚糖酶分布于多个糖苷水解酶家族,包括家族5、6、7、8、9、12、26、44、45、48、61和74等^[9]。其中,纤维素家族45的催化域结构是由6个折叠片构成的桶状结构,它们的催化裂缝横穿蛋白结构表面^[10]。目前,CAZy 数据库中共收录10个该家族酶的晶体结构,基于 β 桶和催化裂缝的相对位置,系统发育学可将GH45纤维素酶家族分为A、B和C3个亚科^[11]。

相对于其他家族的纤维素酶,GH45家族的纤维素酶在酶源及已得到克隆鉴定的酶蛋白均较少。Shinkai 等^[8]和 Neves 等^[12]在牛瘤胃中检测到大量内切纤维素酶编码基因家族,并且发现饲料利用效率高的牛瘤胃中GH45家族的丰度更高。有研究表明,在土壤微生物及土壤无脊椎动物中广泛存在GH45纤维素酶基因,它们在木质纤维素的分解中发挥着重要作用^[13-14]。表1展示了已发表的GH45家族纤维素酶,它们分别适应了不同的生态环境,从海洋到陆地,从土壤到生物体内,展现了生物多样性和适应的广泛性。

里氏木霉是纤维素酶工业表达的经典宿主,具备强大的蛋白表达分泌能力。特定工业改造里氏木霉菌株的胞外蛋白生产量可达 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[24]。在遗传学方面,里氏木霉的遗传转化体系非常完善,使得对其进行基因工程改造成为可能。通过基因敲除、过表达等手段,可以改变里氏木霉的代谢途径,提高纤维素酶的产量和催化效率^[25]。本研究旨在基于大数据及人工智能模型挖掘新型GH45纤维素酶基因,并在里氏木霉中实现高效表达,以期拓展纤维素酶的酶源多样性,获取性质优良、表达水平高的GH45家族纤维素酶,从而促进其在畜牧养殖、生物能源及纺织等领域的推广应用。

表1 已发表的GH45家族纤维素酶
Table 1 Published GH45 family cellulases

名称	来源物种	酶学特性	参考文献
STCE1	大孢圆孢菌(<i>Staphylotrichum coccosporum</i>)	最适 pH 6.0;最适温度 60 °C	[15]
HrGH45	红鲍螺(<i>Haliotis rufescens</i>)	最适 pH 7.0;最适温度 45 °C	[10]
TaCel45	沙质梭孢壳菌(<i>Thielavia arenaria</i> XZ7)	最适温度 60 °C;在 90 °C和 100 °C下处理 1 h后,还剩余 70%酶活	[11]
FpiGH45	红缘层孔菌(<i>Fomitopsis pinicola</i>)	最适 pH 4.0,在 pH 3.5~5.5内保持 75%活性	[16]
MeCel45A	紫壳菜蛤(<i>Mytilus edulis</i>)	在 4 °C时可保持 70%活性	[17]
rNMgh45	粗糙脉孢霉(<i>Neurospora crassa</i>)	最适 pH 4.5,最适温度 60~70 °C,在 pH 4.0~8.0可维持 60%以上酶活,在 40~80 °C可维持 60%以上酶活	[18]
TtLPMO9H	喜热梭孢壳(<i>Thermothelomyces thermophilus</i>)	最适 pH 9.0~10.0;最适温度 85 °C	[19]
Cel45	嗜热古菌(<i>Thermofilum adornatum</i>)	最适 pH 5.5~6.0;最适温度 80 °C	[20]
rEndo2	核盘菌(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	最适温度 60 °C,在 70 °C和 80 °C维持 10 min后剩余 50%活性	[21]
CTendo45	嗜热主壳霉(<i>Chaetomium thermophilum</i>)	70 °C、pH 4.0条件下活性最高,在 70 °C和 80 °C分别可保留 78.9%和 65.6%活性	[22]
FpCel45	瘤盖拟层孔菌(<i>Fomitopsis palustris</i>)	80 °C处理 1 h后仍保留 91.4%以上活性	[23]

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 基因工程菌里氏木霉 SUS7 为删除 Pyr4 标记的尿嘧啶缺陷型菌株。质粒 PpcbM₃-TpCel45A-3NC 是将来源于 *T. punctulate* 的 TpCel45A 基因扩增后,与 P2cbM3-3NC 骨架质粒进行重组,得到用于 GH45 纤维素酶 TpCel45A 基因表达的重组质粒。大肠杆菌 TOP 10 购自北京全式金生物技术有限公司。其余菌株和质粒均为本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂 山梨醇、羧甲基纤维素(CMC-Na)、PEG6000 购自 Sigma 公司;重组酶购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;限制性核酸内切酶 *Pme* I 购自 TaKaRa 有限公司;RNA 纯化试剂盒购自天根生物科技有限公司;真菌裂解液(100 mL): 0.05 mol·L⁻¹ NaOH 0.2 g、1 mmol·L⁻¹ EDTA 0.03 g、Triton100 1 mL;其他所有试剂为国产分析纯试剂。

基础培养基(minimal medium, MM)(1 L): (NH₄)₂SO₄ 5.0 g、KH₂PO₄ 15 g、MgSO₄·7H₂O 0.6 g、CaCl₂·2H₂O 0.6 g、FeSO₄·7H₂O 0.005 g、ZnSO₄·7H₂O 0.001 4 g、MnSO₄·H₂O 0.001 6 g、碳源为 2% 葡萄

糖(体积分数),自然 pH。纤维素诱导培养基:MM 培养基中将碳源替换为 2% 微晶纤维素,自然 pH。LB 液体培养基:0.5% 酵母提取物、1%NaCl、1% 蛋白胨,固体 LB 培养基另外加入 2% 琼脂粉。阴离子层析缓冲液 A:0.01 mol·L⁻¹ pH 6.5 Citric acid-Na₂HPO₄ 缓冲溶液。阴离子层析缓冲液 B:0.01 mol·L⁻¹ pH 6.5 Citric acid-Na₂HPO₄ 中加入 1 mol·L⁻¹ NaCl。

1.1.3 引物 本研究使用的所有引物见表 2,均由北京华大生物科技有限公司合成。

表2 引物名称及序列信息
Table 2 Primers used in this study

名称	序列(5'→3')
<i>TpCel45A</i> -F	5'-GCGTCCGGAAGCGGCGTCAC-3'
<i>TpCel45A</i> -R	5'-GTGCGTCAGGCTTCGCCACGAGCCTA-TGAAGCTGTAGGCTGGCACTG-3'
<i>TcbhI</i> -F	5'-GCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3'
<i>TrEGHISP</i> -R	5'-GATGCGCAGTCCGCGTTGAC-3'

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建 以 *TpCel45A* 合成基因为模板,以 *TpCel45A*-F 和 *TpCel45A*-R 为引物,用高保真聚

合酶扩增 *TpCel45A* 基因全长序列。再将骨架质粒 P2cbM3-3NC 通过 *TcbhI-F* 和 *TrEGII-R* 为引物,用高保真聚合酶扩增,并用胶回收试剂盒回收该 PCR 产物。将回收的 *TpCel45A* 片段与 PpcbM3-3NC 骨架质粒进行大肠重组转化,50 °C 反应 30 min 后,将重组产物通过热激转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,将感受态细胞在 37 °C、200 r·min⁻¹ 条件下孵育 30 min 后涂在固体 LB 平板上,将长出的单克隆进行菌落 PCR 验证并测序,最终获得包含 *TpCel45A* 表达载体的大肠杆菌 TOP10 菌株。将测序正确的 PpcbM3-*TpCel45A*-3NC 质粒用 *Pme* I 酶进行线性化处理,在 37 °C 水浴反应 3 h 后用异丙醇和 3 mol·L⁻¹ 醋酸钠进行醇沉处理,随后 -20 °C 保存,待木霉转化使用。

1.2.2 里氏木霉转化 将里氏木霉孢子接种于 PDA 平板,28 °C 静置培养,5 d 后收集新鲜孢子,用灭菌棉签刮下孢子后溶于水,收集孢子悬液接种于 50 mL PDB 培养基中,28 °C、200 r·min⁻¹ 震荡培养 12 h。用 200 目筛过滤收集萌发的菌丝,以无菌水和 0.8 mol MgSO₄ 溶液洗涤,之后溶于 20 mL 果胶酶溶液,28 °C、90 r·min⁻¹ 消化 3 h 后收集原生质体。PEG6000 和原生质体混合冰浴 30 min 后,室温孵育 20 min。以 PEG 6000 介导的原生质体将线性化的 PpcbM3-*TpCel45A*-3NC 转入里氏木霉 SUS7,涂布于固体 MM+1M 山梨醇培养基上生长。4 d 后随机挑取平板上的转化子,接种于含有 MM-glucose 培养基的 24 孔固体平板上,28 °C 继续静置培养 1~2 d。挑取平板菌落上少许菌丝,以 PCR 试剂盒提取的基因组 DNA 为模板,以 *TpCel45A-F/R* 为引物进行菌落 PCR 验证是否已经转入里氏木霉的基因组中。

1.2.3 里氏木霉诱导培养 将确认转入里氏木霉的菌落从 24 孔板上用灭菌棉签刮下后接种于含有 MM-glucose 培养基中,28 °C、200 r·min⁻¹ 培养 48 h,然后按照 10% 接种于诱导培养基中再培养 120 h,12 000 r·min⁻¹、10 min 后收集离心上清粗酶液。

1.2.4 酶的分离纯化 透析脱盐:将透析袋剪成长度 20 cm 放入烧杯中加热沸腾 10 min 后用止水夹夹住末端,然后将粗酶液加入透析袋中,用 20 mmol·L⁻¹ pH 6.5 磷酸盐-柠檬酸缓冲液在 4 °C 脱盐处理。每 2 h 换 1 次缓冲液,脱盐过程结束后进行阴离子交换层析。阴离子交换层析:将透析后的粗酶液取 3 mL 加入预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap Q Sepha-

rose XL 阴离子柱,然后用相同缓冲液对加有 1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液的缓冲液 B 和缓冲液 A 进行梯度洗脱,流速 4 mL·min⁻¹,收集管中的溶液并分别进行酶活和蛋白浓度测定,最后对纯化好的蛋白酶进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.5 酶活力的测定 内切纤维素酶活的测定以羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na)作为底物进行。使用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配置 1.5% 羧甲基纤维素钠溶液(该溶液需立即使用,使用前适当混匀)。取适当稀释纯化后的酶液 100 μL,加入 900 μL CMC-Na 底物中,振荡混匀,50 °C 水浴 3 min,向各试管中加入 1.5 mL DNS 试剂,再向空白中加入随机酶液 100 μL,混合均匀。沸水中煮 5 min,迅速放入冷水中冷却后测定 540 nm 处吸光度值。一个酶活力单位(U)定义为在 55 °C、pH 5.5 条件下,每分钟水解羧甲基纤维素钠,产生 1 μmol 还原糖(以葡萄糖计)所需要的酶量。

1.2.6 酶学性质分析 最适温度及热稳定性的测定:将纯化后的酶进行适当稀释后,在 30~80 °C、pH 5.5 条件下测定内切纤维素酶的酶活,以确定纤维素酶的最适温度。将稀释的酶液分别在 30、40、50、60、70、80 °C 6 个不同温度下处理 5、10、30、60 min 后立即置于冰上,在最适条件下测试处理后酶液的剩余酶活。以未处理酶的酶活力为 100%,分别计算不同温度、不同处理时间后样品的剩余酶活以测定酶在不同温度下的稳定性。

酶反应的最适 pH 及 pH 稳定性:在纤维素酶的最适温度条件下测定不同 pH(1.0~12.0)条件下的酶活力来确定最适 pH;将酶用不同 pH 的缓冲液进行剩余酶活力测定,以未处理酶液的酶活力为 100%,计算不同 pH 处理下的相对剩余酶活以测定酶在不同 pH 下的稳定性。不同 pH 的缓冲液分别为 50 mmol·L⁻¹ Gly-HCl 缓冲液(pH 1.0~2.0), 100 mmol·L⁻¹ 柠檬酸-磷酸氢二钠 Citric acid-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH 2.0~8.0), 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0), 50 mmol·L⁻¹ Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.0~12.0)。

1.2.7 动力学常数的测定 分别以不同浓度范围的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物,在 pH 5.5、55 °C 条件下测定纤维素酶活性,反应时间均为 10 min,利用米氏常数公式作图并计算 K_m 和 V_{max} 值。

1.2.8 数据分析 每组实验均做平行 3 次,采用

GraphPad Prism 8.0软件进行数据处理和作图,根据3组平行样的平均方差绘制误差线。

2 结果与分析

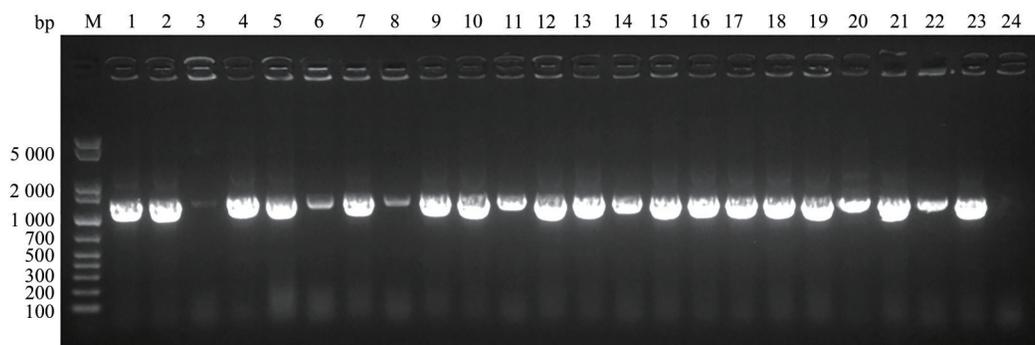
2.1 基于数据库和人工智能模型的新型GH45家族纤维素酶挖掘

根据UniProt蛋白质数据库中蛋白质序列归档库(<http://www.uniprot.org>)的信息,以来源于*Staphylotrichum coccosporum*的GH45家族内切葡聚糖酶STCE1(NCBI序列登录号: BAG69187.1)氨基酸序列为模板^[15],对其基因保守序列进行分析,筛选到与STCE1氨基酸相似性>40%的纤维素酶。通过Python2.7编程编写脚本,从STCE1同源蛋白数据中筛选出一致性排名靠前100条序列^[28]。进一步通过Preoptem模型(<http://www.elabcaas.cn/pird/preoptem.html>)^[26-27]预测候选纤维

素酶的最适反应温度,选择了与STCE1一致性较高的来源于*Thielaviopsis punctulate*的GH45家族纤维素酶(UPI00061EEA5F),并预测其为中温纤维素酶,用于后续研究。

2.2 TpCel45A在里氏木霉中的异源表达及纯化

构建TpCel45A表达质粒PpcbM₃-TpCel45A-3NC,将包含里氏木霉CBHI编码基因启动子及终止子序列的TpCel45A表达框经原生质体转化方法转入里氏木霉SUS7菌株中。将筛选平板上长出的单克隆转接至24孔板中,培养48h后的菌体经真菌裂解液处理抽提转化子的基因组DNA。利用引物对TpCel45A-F/R进行PCR验证TpCel45A是否已经转入里氏木霉菌株。电泳结果显示,转化子在1.2 kb处存在单一目的条带,并且阴性对照SUS7菌株中无条带,证实TpCel45A表达框已成功整合至里氏木霉菌基因组中(图1)。



注: M—DNA maker;泳道1~22: SUS7—TpCel45A转化子菌落PCR验证条带;泳道23: 阳性质粒对照;泳道24: 阴性对照。

图1 里氏木霉重组菌株SUS7/TpCel45A的PCR验证

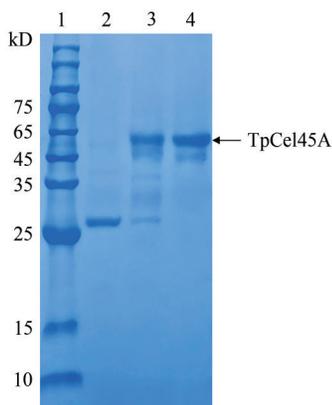
Fig. 1 PCR validation of recombinant strain SUS7/TpCel45A of *Trichoderma reesei*

将重组菌株SUS7/TpCel45A进行摇瓶发酵,微晶纤维素诱导培养3d后,SDS-PAGE电泳分析发酵上清液中的蛋白表达情况。蛋白电泳结果显示,与出发菌株相比,重组菌株的发酵上清中在60 kD左右出现明显条带。阴离子交换层析纯化目的蛋白,经纯化的重组TpCel45A具有内切纤维素酶活力,并经蛋白质谱鉴定证实TpCel45A成功表达纯化。TpCel45A的理论分子量约为36 kD,纯化后重组TpCel45A的电泳条带大于理论分子量,可能是由于目的蛋白在木霉宿主中发生了糖基化修饰(图2)。

2.3 重组纤维素酶TpCel45A的酶学性质

2.3.1 重组TpCel45A的最适温度和热稳定性 在pH 5.5条件下测定TpCel45A在不同温度(30~

80 °C)下的内切纤维素酶活力。结果显示,随着温度的提升,相对酶活力逐渐提升,在50 °C时相对酶活为最高酶活的89%,在55 °C时达到最高相对酶活力。60 °C时与55 °C相对酶活力相近,80 °C时相对酶活降为最高酶活的23%(图3A)。由图3B可知,重组TpCel45A具有良好的热稳定性,在80 °C下处理15 min仍能剩余84%以上的酶活力,70 °C处理15 min还剩70%的酶活力。重组纤维素酶TpCel45A在热稳定性测定中出现处理时间相同,温度越高,剩余酶活力越高的情况,推测是由于重组TpCel45A高温变性后,在恢复低温状态后发生了低温复性。实验通过同源建模获取了重组TpCel45A的三维结构,其半胱氨酸形成的二硫



注:泳道1—蛋白质分子量marker;泳道2—原始菌株SUS7发酵上清;泳道3—TpCel45A粗酶液;泳道4—纯化后的TpCel45A蛋白。

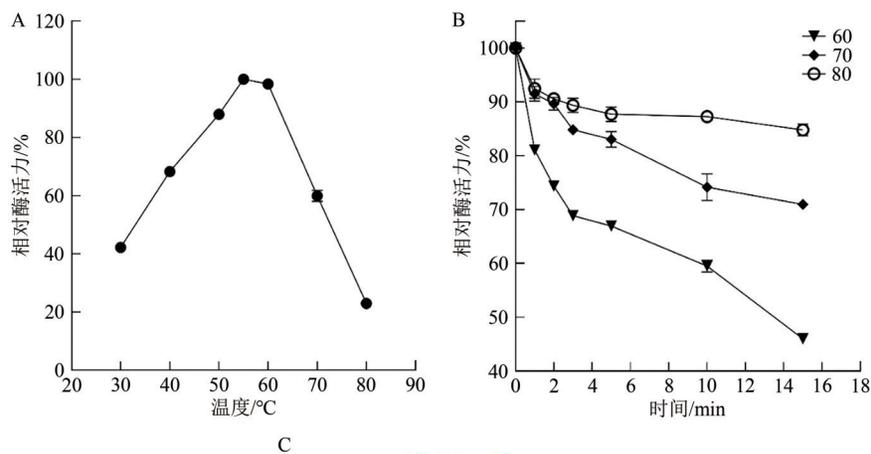
图2 SDS-PAGE检测纯化和浓缩后的重组TpCel45A

Fig. 2 SDS-PAGE detection of purified and concentrated recombinant TpCel45A

键有11对,二硫键有利于维持酶的三维结构,使得重组纤维素酶TpCel45A可能在较高温(80 °C)

条件下充分伸展,而在恢复低温状态后,在多对二硫键的牵拉下恢复其原有构象及活性。在60 °C处理条件下,蛋白变性伸展不充分,而在恢复低温状态后难以重新正确折叠(图3C)。

2.3.2 重组TpCel45A的最适pH和pH稳定性
重组TpCel45A的最适pH为5.5,为酸性纤维素酶。在pH 3.0时酶活力为最高酶活力的50%;在pH 4.0时,相对酶活力迅速升高为最高酶活力的80%;pH 4.0~8.0时都保持着70%以上的相对酶活力;在pH 10.0时,剩余酶活力为最高酶活力的42%(图4A)。为分析重组TpCel45A的pH稳定性,将重组TpCel45A放入不同pH的缓冲液中处理1 h,结果显示,重组TpCel45A有着宽泛的pH稳定性,在pH为5.5的缓冲液中放置1 h后仍剩余80%以上的酶活力。在pH为6.0~9.0的缓冲液中处理1 h后,剩余酶活力仍达63%以上(图4B)。



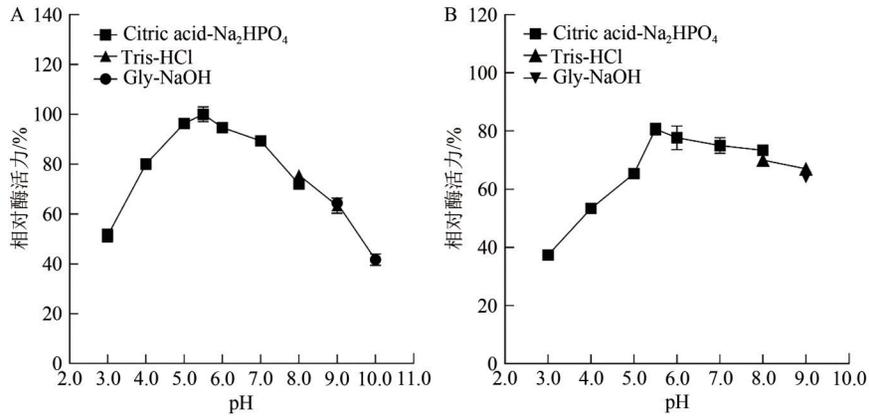
A:不同温度下的酶活力;B:60~80 °C处理后酶活力的变化;C:重组TpCel45A的三维结构图;黄色部分呈现出半胱氨酸的位置

图3 重组TpCel45A的最适温度和热稳定性

Fig. 3 The optimal temperature and thermal stability of recombinant TpCel45A

2.3.3 酶的动力学参数测定 在重组TpCel45A的最适温度和最佳pH条件下以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物测定其酶学动力学参数。经

Michaelis-Menten模型计算出重组TpCel45A以CMC-Na为底物时 K_m 值为 $8.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,最大反应速度 V_{\max} 为 $19.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (图5), k_{cat} 为 377.1 s^{-1} ,



A:不同pH条件下的酶活力;B:重组TpCel45A的pH稳定性

图4 重组TpCel45A的最适pH和pH稳定性

Fig. 4 The optimal pH and pH stability of recombinant TpCel45A

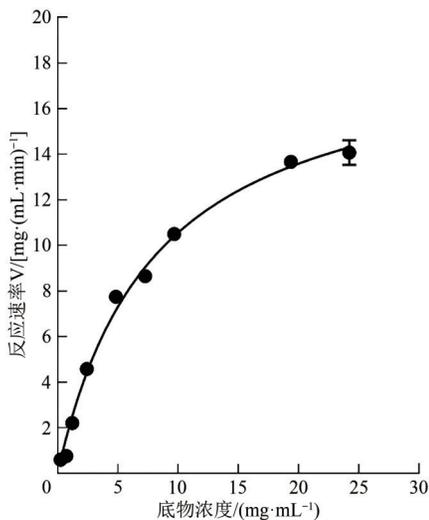


图5 重组TpCel45A的动力学参数

Fig. 5 Dynamics parameters of recombinant TpCel45A

催化效率 k_{cat}/K_m 值为46.9,说明重组TpCel45A有较高的催化效率和底物亲和能力。

3 讨论

GH45家族纤维素酶作为一种重要的糖苷水解酶,在生物质能源生产、饲料加工、造纸、洗涤和纺织等多个领域都显示出重要性。特别是在饲料加工方面,GH45家族纤维素酶通过对纤维素的分解,能够提高饲料的消化率和营养价值。同时,GH45家族纤维素酶和益生菌联合使用,可最大限度的减少抗生素的使用以及不良反应的产生,从而促进畜牧业的健康发展^[29-31]。

尽管GH45家族纤维素酶在饲料行业中具有

显著的应用价值,但目前在GH45家族纤维素酶资源的挖掘和利用方面仍存在一定的局限性,这主要是由于GH45家族的酶产量通常较低,且多数是从原始菌株中纯化得到的,限制了它们在工业规模中的应用^[32]。人工智能模型能快速处理和分析从公共数据库UniProt中获取的海量纤维素酶蛋白数据,结合人工智能模型和数据库的酶蛋白智能挖掘方法整合了高效计算和大数据优势,具有高效性、精准性、创新性和成本节约的显著优势。本研究以应用广泛的*S. coccosporum*来源ST-CE1氨基酸序列为模板,基于大数据和Preoptem模型预测筛选得到TpCel45A,并成功实现其在里氏木霉中的异源表达。

新型GH45家族纤维素酶TpCel45A拟用于饲料行业,所以其热稳定性成为关键考量因素,以保障在较高加工温度条件下仍能维持一定催化效率。TpCel45A最适温度为55℃,在80℃处理15min后也存在84%以上的相对酶活力,优于其他来源GH45家族纤维素酶,赋予其在饲料行业的重要应用潜力。在pH 4.0~9.0处理1h后,相对酶活力仍达52%以上。重组TpCel45A在测定热稳定性时还出现了在相同处理条件下温度越高,剩余相对酶活也越高的情况,可能是由于其在高温变性后恢复至低温状态时重新折叠恢复活力。这与Ramos等^[33]报道的溶菌酶因其区域构象差异导致热稳定性发生变化的现象相类似。综上,本研究对新型GH45家族纤维素酶TpCel45A的克隆鉴定、性质分析及异源高效表达,为畜牧养殖、纺织及生物能源等领域提供了新型酶蛋白资源,具有重要的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 张清翠, 石雅丽, 刘安礼, 等. 外切纤维素酶的研究与应用进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(5): 495-502.
ZHANG Q C, SHI Y L, LIU A L, *et al.*. Research and application progress of exocellulase[J]. Curr. Biotechnol., 2020, 10(5): 495-502.
- [2] 孔蒙蒙, 金静静, 卢鹏, 等. 高产纤维素酶工程菌株产酶条件优化[J]. 生物技术进展, 2024, 14(6): 1032-1041.
KONG M M, JIN J J, LU P, *et al.*. Optimization of cellulase production conditions of high-yield cellulase engineering strains[J]. Curr. Biotechnol., 2024, 14(6): 1032-1041.
- [3] VERAWAT C, WUTTICHAJ M, HATAIKARN L, *et al.*. Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: from nature to application[J]. J. Biosci. Bioeng., 2019, 128(6): 637-654.
- [4] LESSARD P A, LI X, BROOMHEAD J N, *et al.*. Properties of corn-expressed carbohydrase AC1 in swine diets and its effects on apparent ileal digestibility, performance, hematology, and serum chemistry[J/OL]. Heliyon, 2021, 7(8): e07696[2025-02-15]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07696>.
- [5] CHEN Y, SHEN D, ZHANG L, *et al.*. Supplementation of non-starch polysaccharide enzymes cocktail in a corn-miscellaneous meal diet improves nutrient digestibility and reduces carbon dioxide emissions in finishing pigs[J/OL]. Animals, 2020, 10(2): E232[2025-02-15]. <https://doi.org/10.3390/ani10020232>.
- [6] DU Z, YAMASAKI S, OYA T, *et al.*. Cellulase-lactic acid bacteria synergy action regulates silage fermentation of woody plant[J/OL]. Biotechnol. Biofuels Bioprod., 2023, 16(1): 125 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02368-2>.
- [7] CHEN C, XIN Y, LI X, *et al.*. Effects of *Acremonium* cellulase and heat-resistant lactic acid bacteria on lignocellulose degradation, fermentation quality, and microbial community structure of hybrid elephant grass silage in humid and hot areas[J/OL]. Front. Microbiol., 2022, 13: 1066753[2025-02-15]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1066753>.
- [8] SHINKAI T, MITSUMORI M, SOFYAN A, *et al.*. Comprehensive detection of bacterial carbohydrate-active enzyme coding genes expressed in cow rumen[J]. Anim. Sci. J., 2016, 87(11): 1363-1370.
- [9] 杨俊钊, 张新蕊, 赵国柱, 等. 新型 GH5 家族多结构域纤维素酶的结构与功能研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(4): 71-80.
YANG J Z, ZHANG X R, ZHAO G Z, *et al.*. Structure and function analysis of novel GH5 multi-domain cellulase[J]. Biotechnol. Bull., 2023, 39(4): 71-80.
- [10] HERNÁNDEZ-BENÍTEZ L J, RAMÍREZ-RODRÍGUEZ M A, HERNÁNDEZ-SANTOYO A, *et al.*. A trimeric glycosylated GH45 cellulase from the red abalone (*Haliotis rufescens*) exhibits endo and exoactivity[J/OL]. PLoS ONE, 2024, 19(4): e0301604 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301604>.
- [11] 杨虹. GH45 和 GH12 家族纤维素酶的稳定性及催化特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [12] NEVES A L A, YU J, SUZUKI Y, *et al.*. Accelerated discovery of novel glycoside hydrolases using targeted functional profiling and selective pressure on the rumen microbiome[J/OL]. Microbiome, 2021, 9(1): 229[2025-02-15]. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01147-1>.
- [13] MUELBAIER H, ARTHEN F, COLLINS G, *et al.*. Genomic evidence for the widespread presence of GH45 cellulases among soil invertebrates[J/OL]. Mol. Ecol., 2024, 33(20): e17351 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.1111/mec.17351>.
- [14] BAUTISTA-CRUZ A, AQUINO-BOLAÑOS T, HERNÁNDEZ-CANSECO J, *et al.*. Cellulolytic aerobic bacteria isolated from agricultural and forest soils: an overview[J/OL]. Biology, 2024, 13(2): 102[2025-02-15]. <https://doi.org/10.3390/biology13020102>.
- [15] KOGA J, BABA Y, SHIMONAKA A, *et al.*. Purification and characterization of a new family 45 endoglucanase, STCE1, from *Staphylotrichum coccosporum* and its overproduction in *Humicola insolens*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74(13): 4210-4217.
- [16] AMENGUAL N G, CSARMAN F, WOHLSCHLAGER L, *et al.*. Expression and characterization of a family 45 glycosyl hydrolase from *Fomitopsis pinicola* and comparison to *Phanerochaete chrysosporium* Cel45A[J/OL]. Enzyme Microb. Technol., 2022, 156: 110000[2025-02-15]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110000>.
- [17] OKMANE L, NESTOR G, JAKOBSSON E, *et al.*. Glucomanan and beta-glucan degradation by *Mytilus edulis* Cel45A: crystal structure and activity comparison with GH45 subfamily A, B and C[J/OL]. Carbohydr. Polym., 2022, 277: 118771 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118771>.
- [18] 郭超. GH45 家族纤维素酶基因的挖掘及高效表达[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [19] HIGASI P M R, VELASCO J A, PELLEGRINI V O A, *et al.*. Light-stimulated *T. thermophilus* two-domain LPM09H: low-resolution SAXS model and synergy with cellulases[J/OL]. Carbohydr. Polym., 2021, 260: 117814[2025-02-15]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117814>.
- [20] ZAYULINA K S, KOCHETKOVA T V, PIUNOVA U E, *et al.*. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Thermofilum adornatum* sp. nov. uses GH1, GH3, and two novel glycosidases for cellulose hydrolysis[J/OL]. Front. Microbiol., 2019, 10: 2972 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02972>.
- [21] CHAHED H, BOUMAIZA M, EZZINE A, *et al.*. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel thermostable *Sclerotinia sclerotiorum* GH45 endoglucanase in *Pichia pastoris*[J]. Int. J. Biol. Macromol., 2018, 106: 629-635.
- [22] ZHOU Q, JI P, ZHANG J, *et al.*. Characterization of a novel thermostable GH45 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* and its biodegradation of pectin[J]. J. Biosci. Bioeng., 2017, 124(3): 271-276.
- [23] CHA J H, YOON J J, CHA C J. Functional characterization of a thermostable endoglucanase belonging to glycoside hydrolase family 45 from *Fomitopsis palustris*[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2018, 102(15): 6515-6523.
- [24] BISCHOF R H, RAMONI J, SEIBOTH B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*[J/OL]. Microb. Cell Fact., 2016, 15(1): 106[2025-02-15]. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>.
- [25] PENG R, LIN G, LI J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing[J]. FEBS J., 2016, 283(7): 1218-1231.

- [26] WU S, XU G, SU Y, *et al.* Mining and rational design of psychrophilic catalases using metagenomics and deep learning models[J/OL]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2024, 108(1): 31 [2025-02-15]. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12926-1>.
- [27] 许国顺. 基于土壤宏基因组测序的低温过氧化氢酶基因的挖掘与设计[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [28] 乔焱, 张楠, 杨建花, 等. 糖磷酸酶的挖掘及其酶学性质研究[J]. *生物技术通报*, 2024, 40(7): 299-306.
QIAO Y, ZHANG N, YANG J H, *et al.* Identification and enzymatic characterization of a sugar phosphatase[J]. *Biotechnol. Bull.*, 2024, 40(7): 299-306.
- [29] LIANG Q, YUAN M, XU L, *et al.* Application of enzymes as a feed additive in aquaculture[J]. *Mar. Life Sci. Technol.*, 2022, 4(2): 208-221.
- [30] JIANG B, WANG T, ZHOU Y, *et al.* Effects of enzyme + bacteria treatment on growth performance, rumen bacterial diversity, KEGG pathways, and the CAZy spectrum of Tan sheep[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 1221-1232.
- [31] MOHAMED T E, MAHMOUD A, AMLAN K P, *et al.* The functionality of probiotics in aquaculture: an overview[J]. *Fish Shellfish. Immunol.*, 2021, 117: 36-52.
- [32] 郭超, 赵军旗, 齐西珍, 等. 粗糙脉孢菌GH45家族内切纤维素酶基因*ncGH45*在毕赤酵母中表达及重组酶的性质表征[J]. *中国农业科技导报*, 2016, 18(4): 64-72.
GUO C, ZHAO J Q, QI X Z, *et al.* Heterologous expression and characterization of a GH45 endocellulase gene *ncGH45* from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris*[J]. *J. Agric. Sci. Technol.*, 2016, 18(4): 64-72.
- [33] RAMOS J, LAUX V, HAERTLEIN M, *et al.* Structural insights into protein folding, stability and activity using *in vivo* perdeuteration of hen egg-white lysozyme[J]. *IUCrJ*, 2021, 8(Pt 3): 372-386.