

多位点突变提高大肠杆菌植酸酶 AppA 热稳定性^①

王 茜^{②*} 姚明泽^{*} 宋玛丽^{*} 付月君^{*} 胡风云^{**} 梁爱华^{③*}

(^{*}山西大学生物技术研究所化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

(^{**}山西省人民医院神经内科 太原 030012)

摘 要 为提高大肠杆菌植酸酶 AppA(一种已得到广泛应用的饲料添加剂,其酶活高,pH 作用范围广,但热稳定性较差)热稳定性,在 *appA* 基因上组合突变了 W46E、Q62W、A73P、K75C、S146E、R159Y、N204C、Y255D、Q258N 和 Q349N 等 10 个位点,突变后的基因命名为 *appAM10*。将野生型 *appAppA* 和突变体 *appAM10ppAM10* 基因转入毕赤酵母 GS115 进行表达,并对重组蛋白 AppA 和 AppAM10 进行了酶学性质研究与比较。结果表明:AppAM10 分子量约为 55kDa,比活性为 3022U/mg,AppAM10 的 $K_m = 330\mu\text{mol/L}$, $V_{\max} = 3147\text{U/mg}$ 。AppAM10 的最适 pH 值为 4.5,最适反应温度为 65℃。与野生型的 AppA 的最适 pH 无明显区别,比 AppA 的最适温度提高了 5℃。经 90℃ 孵育 15min 后,AppA 完全失活,而 AppAM10 仍残留 17.5% 的活性, T_m 值提高约 8℃,说明上述 10 个位点的组合突变有利于提高大肠杆菌植酸酶 AppA 热稳定性,其中与 N-糖基化有关的 N204C、Q258N 和 Q349N 3 个位点可能起着重要作用。

关键词 大肠杆菌植酸酶 AppA,定点突变,热稳定性,N-糖基化,毕赤酵母

0 引 言

植酸酶(myoinositol hexakisphosphate phosphohydrotase)是能将植酸及其盐降解为肌醇和磷酸(或磷酸盐)的一类酶的统称。植酸(IP₆, myoinositol hexakisdi-hydrogen phosphate)广泛存在植物组织中,是植物中磷的基本储存形式,谷物、油料和豆类中植酸磷的含量高达约 60% ~ 90%。植酸酶作为一种重要的饲料添加剂已得到广泛应用^[1-3]。来源于大肠杆菌的植酸酶 AppA,属于组氨酸酸性磷酸酶家族,是迄今所知的分解植酸能力最强的植酸酶之

一^[4],其 pH 范围与目前商业生产的曲霉属植酸酶相比,更适于在动物的胃肠道内发挥作用,且有着更好的抗蛋白酶降解能力^[5]。经毕赤酵母表达的该类植酸酶的动物饲喂效果明显优于目前商业生产的曲霉来源植酸酶^[6],但其热稳定性较差,通过制粒高温过程后其活性将损失 70% 以上,限制了其在主要的颗粒料中应用^[7]。

基因工程技术是改善提高植酸酶热稳定性的有效途径之一^[8-10]。Zhu 等^[8]利用易错 PCR 技术筛选得到植酸酶 AppA 的突变体 I408L,85℃ 处理 5min 后仍残留 51.3% 的活性,成功提高了 AppA 的热稳定性。Garrett 等^[9]利用点饱和突变(GSSM)高通量

① 863 计划(2012AA020809)和国家自然科学基金(31372199,31272100)资助项目。

② 女,1989 年生,硕士生;研究方向:基因的表达调控;E-mail:15513095026@163.com

③ 通讯作者,E-mail:aliang@sxu.edu.cn

(收稿日期:2014-08-19)

筛选法得到了大肠杆菌植酸酶 AppA 突变体 Phy9X,具有比野生型植酸酶 AppA 更好的热稳定性,且具有更强的胃蛋白酶耐受性。姚明泽等^[10]通过增加糖基化程度使植酸酶 AppA 的溶解温度(T_m)提高 4℃~5℃。本研究在前人工作的基础上,选择文献[9]与[10]中的氨基酸突变位点,对植酸基因 *appA* 进行了 10 个位点的突变,构建筛选出一株耐高温且活性高的植酸酶基因酵母工程菌,而且比较了重组植酸酶与野生型植酸酶 AppA 的性质,为定向改造植酸酶提供了一定的理论基础与实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 α), 毕赤酵母

(*Pichia pastoris* GS115), GS115/*appA* 酵母工程菌, 表达载体 pPIC9, 克隆载体 PMD18T-*appA*, 均由本实验室保存。

1.1.2 试剂

YNB、YPD 购于 Solabio 公司,植酸钠 P1090 购于 Sigma 公司,其余试剂购于上海生工。YPD、BM-GY、BMMY 等培养基均按照 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母操作手册配制。Bradford 蛋白定量测定试剂盒购于 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 突变位点的设计

经过对植酸酶 AppA 分子的结构及序列分析,设计突变位点为 W46E、Q62W、A73P、K75C、S146E、R159Y、N204C、Y255D、Q258N 和 Q349N。设计引物如表 1 所示(下划线为相应的突变碱基)。

表 1 *appA* 定点突变所需的引物

引物名称	引物序列 (5→3')
<i>appA</i> (W46E)-Forward	GCCAGTCAAGCTGGGT <u>GAG</u> TTGACACCTAGAGG
<i>appA</i> (W46E)-Reverse	CCTCTAGGTGTCAAC <u>TC</u> ACCCAGCTTGACTGGC
<i>appA</i> (Q62W)-Forward	GTCACTAC <u>TGG</u> AGACAGCGTCTTGTTCG
<i>appA</i> (Q62W)-Reverse	GCAACAAGACGCTGTCT <u>CC</u> AGTAGTGAC
<i>appA</i> (A73P, K75C)-Forward	GGATTGTTGCCCAAG <u>TGT</u> GTTGTCCACAATC
<i>appA</i> (A73P, K75C)-Reverse	GATTGTGG <u>ACA</u> ACCACACTTGGGCAACAATCC
<i>appA</i> (S146E)-Forward	GCTATCTTG <u>GAG</u> AGAGCTGGAGGATC
<i>appA</i> (S146E)-Reverse	GATCCTCCAGCTCT <u>CT</u> CCAAGATAGC
<i>appA</i> (R159Y)-Forward	GACTTCACCGGTAC <u>TAC</u> CAGACTGCC TTCAGAG
<i>appA</i> (R159Y)-Reverse	CTCTGAAGGCAGTCTG <u>GTA</u> GTGACCGGTGAAGTC
<i>appA</i> (N204C)-Forward	GAAGGTCTCCGCCGAC <u>TG</u> CGTCTCTTTG
<i>appA</i> (N204C)-Reverse	CAAAGAGACG <u>CAG</u> TCGGCGGAGACCTTC
<i>appA</i> (Y255D)-Forward	CGCTCAATTC <u>G</u> ACTTGCTGCAGAGAACTCC
<i>appA</i> (Y255D)-Reverse	GGAGTTCTCTGCAGCAAGT <u>CG</u> AATTGAGCG
<i>appA</i> (Q258N)-Forward	CGACTTGCTG <u>AAC</u> AGAACTCCAGAGG
<i>appA</i> (Q258N)-Reverse	CCTCTGGAGTTCT <u>GTT</u> CAGCAAGTCG
<i>appA</i> (Q349N)-Forward	CTCTCAATGGATT <u>AAC</u> GTTTCGTTGG
<i>appA</i> (Q349N)-Reverse	CCAACGAAA <u>CGT</u> TAATCCATTGAGAG

1.2.2 pPIC9-*appAM10* 真核表达载体的构建及酵母工程菌 GS115/*appAM10* 的筛选

以 PMD18T-*appA* 为模板,通过 PCR 方法进行叠加突变,获得 PMD18T-*appAM10*。基因的定点突变采用 Stratagene 公司的快速突变试剂盒进行。将重组质粒 PMD18T-*appAM10* 和 pPIC9 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切,使目的基因 *appAM10* 以正确的阅读框架定向插入真核表达载体 pPIC9 的 *EcoR* I 和 *Not* I 位点之间,得到重组表达载体 pPIC9-*appAM10*。用 *Bgl* II 线性化重组质粒 pPIC9-*appAM10* 后,转化毕赤酵母 GS115,筛选得到高效表达植酸酶基因的酵母工程菌 GS115/*appAM10*。

1.2.3 重组植酸酶 AppA 和 AppAM10 的表达纯化及脱糖基化

将酵母工程菌 GS115/*appA* 与 GS115/*appAM10* 分别在 YPD 平板上划线,30℃ 恒温培养箱培养 72h。挑取单菌落,转接到装有 500mL BMGY 的 1L 摇瓶中,30℃,220r/min 培养 48h。将以上培养液 8000 r/min 离心 10min,弃掉上清,取沉淀,并换上新鲜的 500mL BMMY 培养基进行诱导培养。为保证甲醇的供给,每隔 12h 补充甲醇保证甲醇浓度为 0.5%。将诱导培养液 8000r/min、4℃ 下离心 15min,80% 硫酸铵沉淀上清,13000r/min、4℃ 离心 15min,收集沉淀,并通过阳离子交换层析 (SP Sepharose TM Fast Flow) 及分子筛凝胶层析 (Hiprep 26/10) 进一步纯化。植酸酶脱糖基化处理采用 New England Biolabs 公司的 Endo H_f。利用 SDS-PAGE 分析表达纯化后的植酸酶 AppA 和 AppAM10。

1.2.4 植酸酶活力测定

植酸酶活性测定采用钼蓝法。酶活力单位定义为:在 37℃ 下每分钟释放 1μmol 无机磷所需的酶含量^[11,12]。

1.2.5 重组植酸酶 AppA 和 AppAM10 的性质测定

最适酶促反应 pH:分别在 pH 1.0 ~ 3.5 的 250 mmol/L Glycine-HCl、pH 4.0 ~ 6.0 的 250 mmol/L NaAc-HAc、pH 6.5 ~ 7.0 的 250 mmol/L Tris-HCl 缓

冲液中测定酶活力。酶在上述不同 pH 缓冲液中 37℃ 保温 1h 后,在标准条件下测定酶活力,确定酶的最适 pH。

最适温度:在最适 pH 条件下,分别在 30 ~ 80℃ 反应 15min,测定酶的相对酶活力,以测得最大酶的相对酶活力为 100%,确定酶促反应的最适温度。

耐热性和热稳定性:将蛋白样品分别在 37℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 的恒温水浴中处理 15min 后,冰浴 30min,在标准条件下测定残余酶活力,以 37℃ 测得酶的相对酶活力为 100%,确定酶的耐热范围;在 75℃ 的恒温水浴中分别处理 5min、10min、15min、20min、25min、30min 后,冰浴 30min,在标准条件下测定残余酶活力,比较酶的热稳定性。

溶解温度 (T_m) 的测定:蛋白样品浓度为 2×10^{-7} mol/L。荧光激发波长为 280nm,发射波长扫描范围为 300 ~ 450nm。热变性每 3min 温度升高 5℃,温度范围为 10 ~ 95℃,狭缝为 5nm。溶解温度 (T_m) 由公式

$$Y = \frac{y_N + y_D \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_m}{RT} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_m}{RT} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)}$$

计算得出^[13,14]。

动力学常数 K_m 和 V_{max} :在最适条件下,让酶促反应分别在 1 ~ 15min 的时间段进行,测定酶活力。利用 Line weaver-Burk 曲线测定蛋白样品的动力学常数 K_m 和 V_{max} ^[12]。

1.2.6 Swiss-model 模拟分析

以大肠杆菌植酸酶的晶体结构模型 (PDB: 1dkqA) 为模板^[15],利用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线模拟植酸酶 AppAM10 的结构,并用 Swiss-PdbViewer 软件分析 10 个突变位点位置。

2 结果

2.1 重组植酸酶的表达纯化及脱糖基化

植酸酶 AppA 和 AppAM10 在毕赤酵母 GS115

中得到成功表达(图 1)。经 80% 硫酸铵沉淀、阳离子交换层析和分子筛凝胶层析纯化后, SDS-PAGE 结果分析表明: 植酸酶 AppA 的相对分子量约为 53kDa, 而 AppAM10 约为 53 ~ 55kDa。将植酸酶 AppA 和 AppAM10 进行脱糖基化处理后, 都变为一条分子量约为 47kDa 的蛋白条带(图 1 泳道 4, 5), 与理论值一致。植酸酶的氨基酸序列分析表明, 在 AppA 上存在 3 个 N - 糖基化位点(NVT139—141、NVS204—206 和 NWT317—319), 而 AppAM10 由于定点突变存在 4 个 N - 糖基化位点(NVT139—141、NRT258—260、NWT317—319 和 NVS349—351)。以上结果表明经毕赤酵母表达的植酸酶 AppA 和 AppAM10 有糖基化修饰, 表达的蛋白分子量的差异是由糖基化程度不同所造成的。

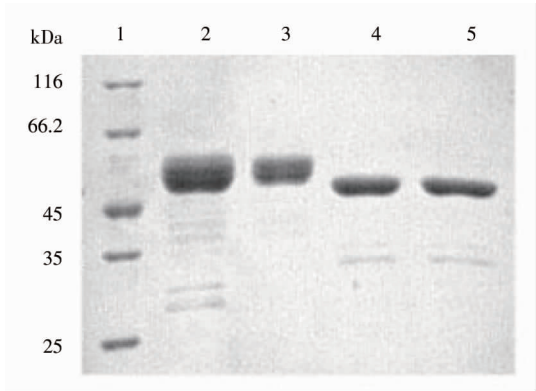


图 1 植酸酶 AppA 和 AppAM10 的纯化及脱糖基化的 SDS-PAGE 分析(泳道 1: 低分子量标准蛋白; 泳道 2: 纯化后的植酸酶 AppAM10; 泳道 3: 纯化后的植酸酶 AppA; 泳道 4: 脱糖基化后的植酸酶 AppAM10; 泳道 5: 脱糖基化后的植酸酶 AppA)

2.2 酶学性质的分析与比较

2.2.1 植酸酶 AppA 和 AppAM10 的最适 pH 和最适温度测定

对植酸酶 AppA 和 AppAM10 的最适 pH 分别进行了测定与比较, 结果表明二者最适 pH 都为 4.5 (图 2(a))。AppAM10 的最适温度为 65℃, 比 AppA 的最适温度提高了 5℃ (图 2(b))。

2.2.2 多位点突变对 AppA 温度稳定性影响

将植酸酶 AppA 和 AppAM10 分别在 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 孵育 15min 的标准条件下测定酶活, 结果表明: AppAM10 在 50℃、60℃ 处理残余活性为 70% 以上; 70℃ 时, AppAM10 的残余活性还能达到 68%, 而 AppA 仅剩 20%; 经 90℃ 孵育 15min 后, AppA 完全失活, 而 AppAM10 仍残留 18% 的活性(图 2(c))。

同一温度 75℃ 不同时间处理, AppAM10 处理 30min 后仍有 50% 的剩余活性, 而 AppA 在处理 20min 后残余活性仅达到 7% (图 2(d))。

以上结果说明: 与 AppA 相比, AppAM10 有更好的热稳定性及耐热性。并且, AppAM10 的溶解温度 ($T_m = 68^{\circ}\text{C}$) 比 AppA ($T_m = 60^{\circ}\text{C}$) 提高了约 8℃ (表 2)。

2.2.3 植酸酶 AppA 与 AppAM10 的动力学常数

植酸酶 AppA 与 AppAM10 的一级反应时间都是 5min, 即测定 K_m 与 $V_{\max}$ 的酶促反应时间。利用 Line weaver-Burk 曲线测定 AppA 与 AppAM10 的 K_m 分别为 480 $\mu\text{mol/L}$ 和 330 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论

本研究利用基因工程技术, 采用了两种策略对大肠杆菌来源植酸酶 AppA 进行了定向分子改造。一方面组合突变了位于酶分子表面的 8 个位点(W46E、Q62W、A73P、K75C、S146E、R159Y、N204C、Y255D), 增加植酸酶表面的极性, 使植酸酶形成了一个稳定的疏水性的核心(图 3A、B), 使植酸酶热稳定性提高, 且不会影响酶的催化特异性。选择的突变位点是依据 Garrett 等^[9] 利用点饱和突变 (GSSM) 高通量筛选法得到大肠杆菌植酸酶 AppA 突变体 Phy9X 的序列而设计的。有所改进的是, Phy9X 是在大肠杆菌中进行表达的, 而本研究利用的基因依据酵母偏爱密码子进行了优化, 在毕赤酵母中对野生型 AppA 及突变体 AppAM10 进行表达和性质比较, 从而有利于分析糖基化修饰对其稳定性

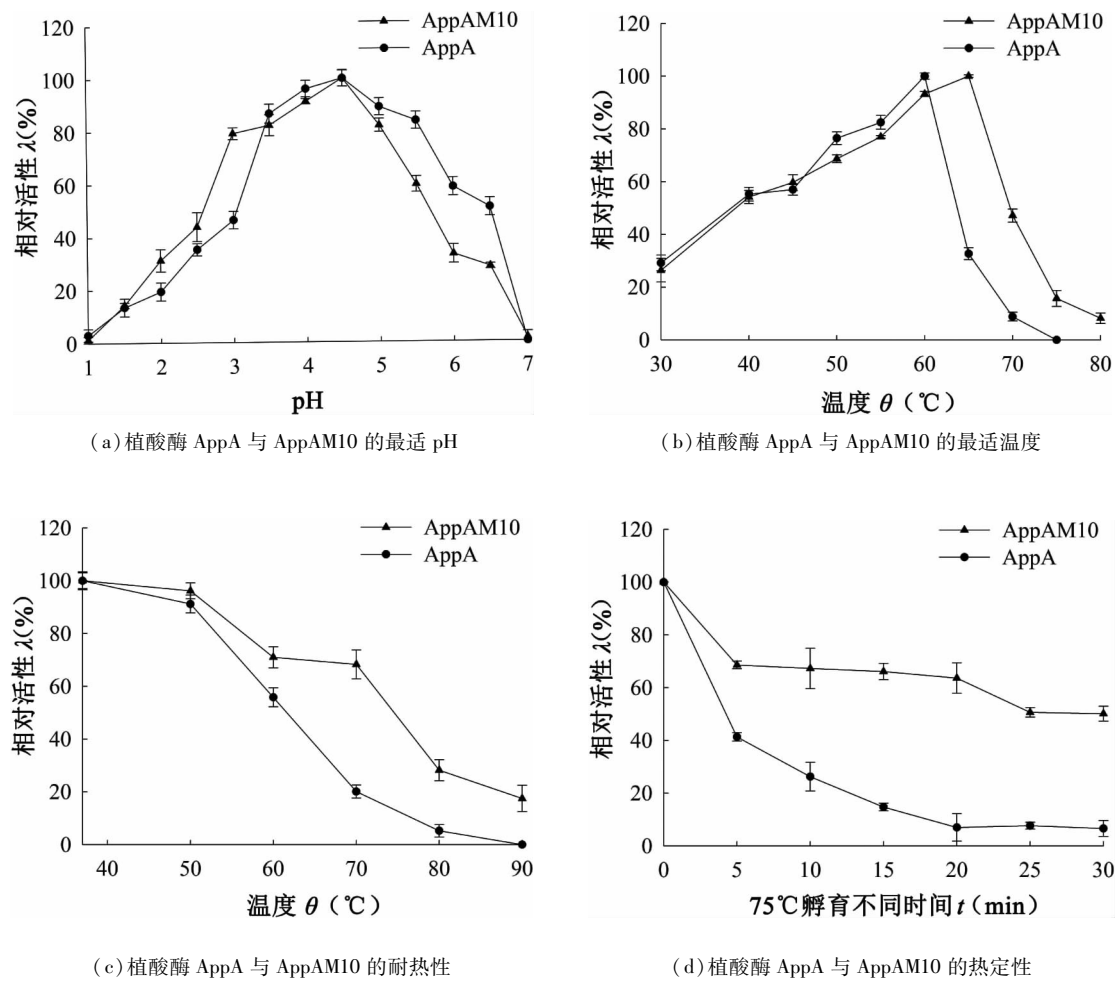


图 2 植酸酶 AppA 与 AppAM10 性质比较

表 2 植酸酶 AppA 与 AppAM10 溶解温度 (T_m)、动力学参数及比活性比较

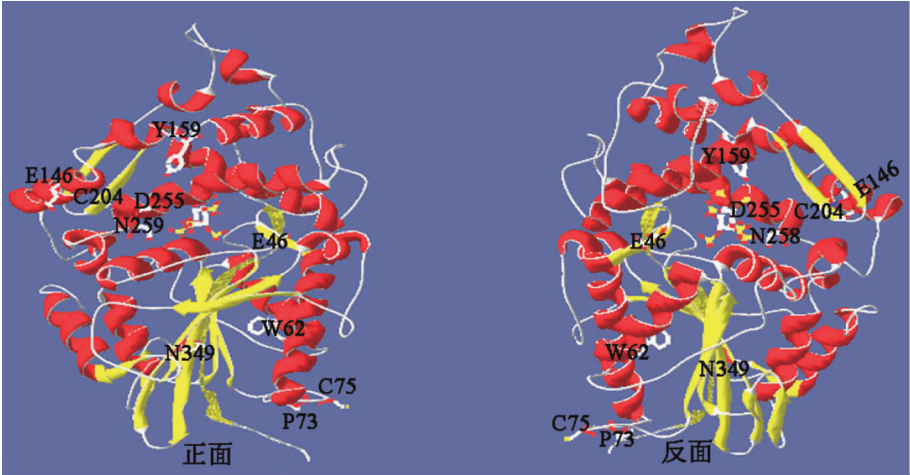
植酸酶	T_m (°C)	K_m (μmol/L)	V_{max} (U/mg)	比活性 (U/mg)
AppA	60	480 ± 19	3 848 ± 154	3 197 ± 127
AppAM10	68	330 ± 13	3 147 ± 126	3 022 ± 121

的影响。另一方面,通过突变 Q258N 和 Q349N 引进糖基化位点^[10],增加了植酸酶 AppA 的糖基化程度,使植酸酶热稳定性进一步提高。组合突变了 10 个位点后, T_m 值比单纯的 8 个位点突变和单纯的引进两个糖基化位点的突变均有所提高。

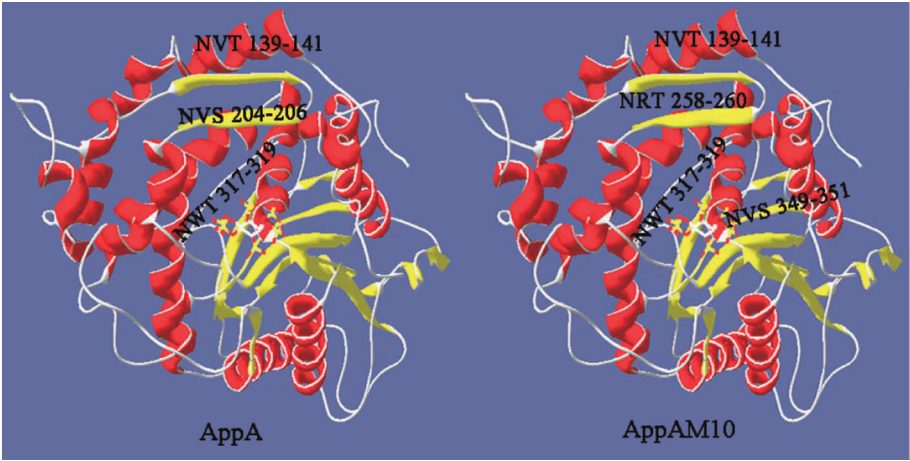
N-糖基化是真核生物蛋白质最重要的翻译后修饰之一,植酸酶在酵母中表达经 N-糖基化修饰,对植酸酶的热稳定性有促进作用^[16-19]。糖基化通过促进肽链定位或稳定肽链折叠结构而增加蛋白结构稳定性^[20-22],降低酶蛋白折叠过程的熵的损

失^[23],稳定蛋白结构。AppA 本身含有三个糖基化位点,分别位于 NVT139—141、NVS204—206 和 NWT317—319。本实验室前期工作对此 3 个位点进行了一定点突变,通过 SDS-PAGE 检测,结果表明 3 个糖基化位点都已被毕赤酵母识别,并且去除这 3 个糖基化位点,植酸酶的热稳定性显著下降。另外,将 *appA* 基因中引入潜在的可以糖基化的位点后,表明 AppAQ258N/Q349N 糖基化位点已被毕赤酵母识别,并且正确折叠。由于突变位点远离酶的活性中心,实验结果表明对酶的活性与 K_m 及其它动力学

参数影响不大。而热稳定性有显著的提高,可能是 增加糖基化导致酶分子侧链构象更加稳定^[10]。



A 植酸酶 AppAM10 结构模拟(模板:1dkqA),图中标出了突变的 10 个位点及其所处的位置



B 植酸酶 AppA 和 AppAM10 中 N - 糖基化位点的位置

图 3 植酸酶 AppA 和 AppAM10 结构模拟

然而,并不是所有的 N - 糖基化位点都可以提高植酸酶的热稳定性。Rodriguez 等^[18]的研究表明: 尽管突变体 A131N/V134N/C200N/D207N/S211N 和 A131N/V134N/D207N/S211N 的糖基化程度大幅提高,却使 AppA 的热稳定性下降。本研究的结果也说明了这一点,AppA 的 3 个糖基化位点在突变体 AppAM10 中,通过突变减少了 N204C 位点,增加了 Q258N 和 Q349N 位点。其中 N204C 位于底物结合位点附近。最近有文献报道,移除底物结合位点附近的糖基化位点(NVS204—206),可提

高酶与底物的亲和力^[24],本研究中测定的突变体 AppAM10 的 K_m 值较小,与该文献推测的相吻合。因此,这 3 个糖基化位点的变化可改善植酸酶 AppA 性质,在提高植酸酶 AppA 热稳定方面起着重要作用。AppA 中的 NVT139—141 和 NWT317—319 的糖基化位点的具体作用还不是很清楚,课题组目前也已经设计了逐一去除植酸酶 AppA 中糖基化位点的突变体,并借助化学分析的手段深入探讨糖基化引起的植酸酶结构与功能的变化。

总之,本研究通过多位点组合突变植酸酶 *appA*

基因上的 10 个位点,成功构建筛选出了一株耐高温且活性高的植酸酶基因酵母工程菌 GS115/*ap-pAM10*,为进一步研究植酸酶的结构与功能提供了实验数据。

参考文献

- [1] Dvorakova J. Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbio*, 1998, 43(4):323-338
- [2] Yao M Z, Zhang Y H, Lu W L, et al. Phytases: crystal structures, protein engineerinand potential biotechnological applications. *J Appl Microbiol*, 2012, 112(1):1-14
- [3] Reddy N R, Sathe S K, Salunkhe D K. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res*, 1982, 28:1-92
- [4] Lei X G, Stahl C H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(4):474-481
- [5] Rodriguez E, Porres J M, Han Y, et al. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2. 5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(2):262-267
- [6] Augspurger N I, Webel D M, Lei X G, et al. Efficacy of an E. cophytase ex pressed in yeast for releasing phyt ate bound phosphorous in yong chicks and pigs. *J Anmi Sci*, 2003, 81(2):474-483
- [7] 丁强,杨培龙,黄火清等. 植酸酶发展现状和研究趋势. 中国农业科技导报, 2010, 12(3):27-33
- [8] Zhu W, Qiao D, Huang M, et al. Modifying thermostability of AppA from *Escherichia coli*, *Curr Microbiol*, 2010, 61(4):267-273
- [9] Garrett J B, Kretz K A, O'Donoghue E, et al. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as aphosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(5):3041-3046
- [10] Yao M Z, Wang X, Wang W, et al. Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase, AppA, by enhancement of glycosylation. *Biotechnol Lett*, 2013, 35 (10) : 1669-1676
- [11] 张耀华,姚明泽,卢文亮等. 大肠杆菌植酸酶在毕赤酵母中的表达与纯化. 应用与环境生物学报, 2012, 18(4):678-681
- [12] 王茜,卢文亮,姚明泽等. 芽孢杆菌植酸酶 phy(ycD)基因在大肠杆菌中的异源表达与纯化. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2):295-299
- [13] Pace C N, Hebert E J, Shaw K L, et al. Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J Mol Biol*, 1998, 279(1):271-286
- [14] Correia A R, Adinolfi S, Pastore A, et al. Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *Biochem J*, 2006, 398(3):605-611
- [15] Lim D, Golovan S, Forsberg CW, et al. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat Structl Biol*, 2000, 7(2):108-113
- [16] Han Y, David B W, Lei X G Expression of an *A sperjillus niger* phytase gene(phyA) in *Saccharom yces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5):1915 -1918
- [17] Kim Y O, Kim H W, Lee J H, et al. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(1):33-38
- [18] Rodriguez E, Wood Z A, Karplus P A, et al. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2. 5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 382(1):105-112
- [19] Zou L K, Wang H N, Pan X, et al. Design and expression of a synthetic phyC gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38(11):803-811
- [20] Imberty A, Perez S. Stereochemistry of the N-glycosylation sites in glycoproteins. *Protein Eng*, 1995, 8(7):699-709
- [21] Petrescu A J, Milac A L, Petrescu S M, et al. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites; implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 2004, 14(2):103-114

- [22] Imperiali B, Rickert K W. Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(1):97-101
- [23] Hoffmann D, Florke H A structural role for glycosylation: lessons from the hp model. *Fold Des*, 1998, 3(5):337-343
- [24] Wu T H, Chen C C, Cheng Y S, et al. Improving specific activity and of *Escherichia coli* phytase by structure-based rational design. *J Biotechnol*, 2014, 17:1-6

Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA by multipoint mutation

Wang Xi^{*}, Yao Mingze^{*}, Song Mali^{*}, Fu Yuejun^{*}, Hu Fengyun^{**}, Liang Aihua^{*}

(^{*} Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

(^{**} Department of Neurology, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012)

Abstract

In order to enhance the thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA, an important feed supplement with the favorable properties of high specific activity and broad pH optimum, ten residue substitutions of W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D, Q258N and Q349N were sequentially introduced into the gene *appA*, named the *appAM10* after mutation. The recombinant genes of *appA* and *appAM10* were expressed in *pichia pastoris* GS115 and the enzymology properties of them were analyzed. The results showed that the purified AppAM10 had a specific activity of 3 022 U/mg and a molecular weight of approximately 55 kDa. The optimum pH of AppAM10 consistent with AppA was 4.5. However, the optimum temperature of AppAM10 was 65℃, 5℃ higher than that of AppA. Meanwhile, the K_m and V_{max} of AppAM10 were 330 μmol/L and 3147 U/mg respectively. AppAM10 exhibited 17.5 % residual activity after treatment at 90℃ for 15min (none for AppA) and about 8℃ increase in the melting temperature (T_m). In a word, compared with the wild type AppA, AppAM10 showed an enhancement in thermostability significantly. According to the results above, the ten residue substitutions were found beneficial in promoting the thermostability of the phytase AppA. Especially, N204C, Q258N and Q349N associated with N-glycosylation may play an important role in improving the enzymology properties.

Keywords: *Escherichia coli* phytase AppA, site-directed mutagenesis, thermostability, N-glycosylation, *Pichia pastoris*