



Thermoanaerobacterium saccharolyticum JW/SL-YS485 来源的 GH11 家族木聚糖酶的克隆表达及其应用

裴建军^{1,2}, 李杰^{1,2}, 李琦^{1,2}, 赵林果^{1,2}

(¹南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037; ²江苏省农林生物质化学与利用国家重点实验室培育点, 江苏 南京 210037)

摘要: 对 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 来源的 GH11 家族木聚糖酶基因 xyn11 进行了克隆表达研究。xyn11 基因全长 636bp, 编码 211 氨基酸。通过构建重组质粒, 使其在大肠杆菌中实现了活性表达, 酶活达到 13.8U/mL。重组酶通过热处理和 Ni 亲和层析达到电泳纯, SDS-PAGE 显示其分子量为 20000, 与理论分子量吻合。重组酶的最适反应温度为 65℃, 最适反应 pH 为 4.5, 在 pH 3.5~6.0 范围内保持较高的稳定性, 60℃ 保温 1h, 酶活还残存 60%, Cu²⁺ 对该酶有激活作用。重组酶底物特异性强, 且不能降解木二糖和木三糖。重组酶以桦木木聚糖为底物, 其 $V_{\max}$ 和 K_m 分别为 9809U/mg 和 5.9mg/mL。桦木木聚糖质量浓度为 25g/L, 重组木聚糖酶用量为 20U/g, 在 50℃、pH 4.5 条件下水解 12h 低聚木糖的得率为 27.8%, 水解产物主要由木二糖和木三糖组成, 且不产生任何木糖。结果表明, 该木聚糖酶催化特性优异, 可用于低聚木糖的制备。

关键词: 木聚糖酶; 嗜热糖杆菌; 水解; 低聚木糖

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1000-6613(2018)04-1544-08

DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2017-1273

Expression and characterization of a GH11 xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 and its application in xylooligosaccharide production

PEI Jianjun^{1,2}, LI Jie^{1,2}, LI Qi^{1,2}, ZHAO Linguo^{1,2}

(¹ College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; ² Jiangsu Key Lab for the Chemistry & Utilization of Agricultural and Forest, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The GH11 xylanase gene, xyn11, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The protein (AFK85913.1) consists of 636bp fragment encoding 211 amino acids. The activity of recombinant xylanase was 13.8U/mL in LB medium after IPTG induction. The recombinant xylanase was purified by heat treatment followed by Ni-NTA affinity, and the protein's molecular weight was approximately 20000. The optimal activity occurred at pH 4.5 and 65℃. The enzyme was stable over the pH range of 3.5 to 6.0 and had a 1-h half-life at 60℃. The activity of recombinant xylanase was significantly enhanced by Cu²⁺. The $V_{\max}$ and K_m for beechwood xylan were 9809U/mg and 5.9mg/mL, respectively. When 25g/L beechwood xylan was treated with 20U/g xylanase for hydrolysis 12h, the xylooligosaccharides ranging from

收稿日期: 2017-06-25; 修改稿日期: 2017-07-17。

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0601001)、江苏省高校自然科学基金重大项目(13KJA220004)、江苏省“青蓝工程”项目及江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)。

第一作者: 裴建军(1977—), 男, 副教授, 研究方向为代谢工程。
E-mail: peijj2000@sina.com.cn。通讯作者: 赵林果, 教授。E-mail: lg.zhao@163.com。

xylobiose (X_2) to xylohexaose (X_6) yield was 27.8% without the production of xylose. All these favorable enzymatic properties make xyn11 attractive for potential applications in the xylooligosaccharide production.

Key words: xylanase; *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*; hydrolysis; xylooligosaccharide

半纤维素是一类可再生资源,在自然界的含量仅次于纤维素和淀粉。木聚糖是半纤维素的主要类型之一,是一种高分子量的杂多糖。木聚糖的主链主要由木糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成,同时阿拉伯糖基、乙酰基、葡萄糖醛酸基等组成侧链。因此木聚糖完全水解需要木聚糖酶 (EC 3.2.1.8)、木糖苷酶 (EC 3.2.1.37)、阿拉伯糖苷酶 (EC 3.2.1.55)、乙酰酯酶 (EC 3.1.1.72)、葡萄糖醛酸酶 (EC 3.2.1.139) 的协同作用。其中木聚糖酶主要作用是降解木聚糖的主链,是木聚糖降解的关键酶^[1-3]。

根据氨基酸序列的同源性,木聚糖酶可分为糖苷水解酶 (GH) 5, 7, 8, 10, 11, 43, 62 家族,但其中 GH10 和 GH11 是木聚糖酶的主要来源^[4]。和其他来源的木聚糖酶相比, GH11 家族木聚糖酶的主要优势在于: ①对木聚糖有很高的特异性,除木聚糖外几乎不水解其他任何底物; ②分子量较小,更容易渗透进木质纤维原料,从而提高水解效率; ③催化效率高。因此 GH11 木聚糖酶被广泛应用于生物制浆、生物漂白、木质纤维降解、饲料添加剂、酿造工业、低聚糖制备等方面^[5-11]。但目前 GH11 家族木聚糖酶主要来源于黑曲霉、木霉、青霉等真菌,这些真菌来源的木聚糖酶的热稳定性和最适反应温度还无法适应目前的工业应用需求^[12-14]。而嗜热菌来源的木聚糖酶应用于木聚糖的水解具有能防止杂菌污染、减少酶用量、延长反应时间等优点。

嗜热菌 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 是一种嗜热厌氧菌,生长温度范围为 33~66℃,能以木聚糖为唯一碳源生长^[15]。嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 能产两种不同类型的木聚糖酶,其中一种高分子量、膜结合的木聚糖酶已经被克隆表达定性^[15]。但嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 来源的 GH11 家族木聚糖酶还没有被克隆表达。因此本文主要对该酶基因在大肠杆菌中的表达进行研究,并对其催化特性及降解木聚糖制备低聚木糖进行探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

pTrc-99a 表达质粒由本实验室保存,重组质粒

pTrc-xyn11 由本次实验构建。大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3) 由本实验室保存。嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 的基因组购于 DSMZ 公司 (www.dsmz.de)。重组菌 BL21-xyn11 是由重组质粒 pTrc-xyn11 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 而获得,由本研究构建。

1.2 酶和化学试剂

限制性内切酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量 Marker 均购自大连 TaKaRa 生物公司;实验所使用的酵母粉 (yeast extract) 和蛋白胨 (Tryptone) 购自 Oxoid 公司;蛋白质分子量标准购自 Promega 公司;琼脂糖购自 BBST 公司;桦木木聚糖购自 Sigma 公司;其他常规试剂均为国产分析纯,购自大光明生物试剂有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 基因操作

质粒的提取、DNA 片段的分离纯化、感受态细胞的制备等均按照分子克隆技术操作。

1.4 重组质粒 pTrc-xyn11 的构建

以嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 的 GH11 木聚糖酶基因序列为模板 (GenBank ID: AFK85913.1), 设计引物如下: xyn11-1: CCCGAATTCGATACAACAACTACTGGC 和 xyn11-2: CCCAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCAACTGTTACATTAG。下划线分别表示 *EcoR* I 和 *Hind* III 的限制性酶切位点;斜体加粗表示组氨酸标签。以购买的嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 的基因组为模板进行 PCR, PCR 产物割胶回收后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切克隆到 pTrc-99a, 得到重组质粒 pTrc-xyn11。

1.5 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g/L, NaCl 10g/L。培养时添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp)。

1.6 重组酶的表达条件优化及纯化

挑重组菌 BL21-xyn11 的单菌落到 5mL LB 试管 (100 μ g/mL Amp), 37℃ 培养至 OD₆₀₀=0.8 左右, 添加终浓度分别为 0.01mmol/L、0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L 和 5mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 37℃ 下诱导 8h, 取样, 超声波破碎, 测定酶活。选

定 IPTG 浓度为 1mmol/L, 分别于 28℃、30℃、37℃、40℃ 和 45℃ 诱导 10h, 取样, 超声波破碎, 测定酶活。选定 IPTG 的浓度为 1mmol/L, 37℃ 诱导 2h、4h、6h、8h、10h, 分别取样测定酶活。

挑重组菌 BL21-xyn11 的单菌落到 50mL LB 试管 (100μg/mL Amp), 37℃ 培养过夜。将菌液按照 1% 接种量转接到 1L LB 培养基中, 37℃ 培养至 OD600=0.8 左右, 添加诱导剂 1mmol/L IPTG, 37℃ 下诱导 8h, 收集菌体, 用 50mL Binding 缓冲液 (5mmol/L 咪唑, 0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 重悬, 用高压细胞破碎仪在 1500psi (1psi=6895Pa) 条件下破碎 3 次。细胞破碎液 60℃ 下热处理 30min, 20000g, 4℃ 离心 30min, 取上清液。随后上清液用 Ni 亲和柱纯化, 洗脱用 Eluting 缓冲液 (1mol/L 咪唑, 0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)。将收集的蛋白样品透析脱盐后进行酶活分析和 SDS-PAGE 检测。

1.7 酶活测定

木聚糖酶活性测定使用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法^[16], 反应体系为: 100μL 5g/L 桦木木聚糖, 50μL 200mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 4.5), 10μL 适宜稀释度的酶, 组成 200μL 的反应体系。60℃ 反应 10min, 加入 600μL 的 DNS 试剂, 沸水 10min, 冷却到室温, 540nm 测定吸光度。酶活单位为该条件下 1min 释放 1μmol 还原糖所需要的酶量为 1 个单位。

1.8 重组酶学性质测定

最适反应温度: 在 50~100℃ 范围内, 每隔 5℃ 分别测定酶活。缓冲液为柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液, pH 4.5。根据不同温度下酶活力的大小来确定重组木聚糖酶的最适反应温度, 以测得的最高酶活为相对 100%。

最适反应 pH: 在不同的 pH (3.0~6.0, 50mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液) 条件下, 65℃ 分别测定酶活。根据不同 pH 条件下酶活力的大小确定酶的最适反应 pH, 以测得的最高酶活力为相对 100%。

温度稳定性: 在 pH 4.5 下, 使酶在 55℃、60℃、65℃ 温度下分别保温不同时间 (0min、20min、40min、60min、90min、120min), 再测定相对酶活, 以未保温 (4℃ 保存) 的木聚糖酶活力为 100%。

pH 稳定性: 将纯化的极耐热糖苷酶在不同的 pH (3.0~6.0, 50mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液) 下 50℃ 处理 2h, 再测定相对酶活, 以未保温 (4℃ 保存) 的木聚糖酶活力为 100%。

金属离子的影响: 在标准反应体系中分别添加 EDTA、Fe³⁺、Ca²⁺、Na⁺、Li⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Al³⁺、Fe²⁺、NH⁴⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Ba²⁺、Hg²⁺、Co²⁺ 至终浓度为 1mmol/L, 65℃ 孵育 10min, 最适条件下测定酶活, 以未加离子的木聚糖酶活力为 100%。

重组木聚糖酶反应动力学常数测定: 木聚糖浓度范围在 3~10mg/mL, 按照酶最适合反应条件测定重组木聚糖酶在不同底物浓度下的酶活性。以浓度的倒数 1/S 为横坐标、反应速率的倒数 1/V 为纵坐标做 Lineweaver-Burk 图。

底物特异性测定: 在最优条件下, 分别以 1% 桦木木聚糖、CMC、淀粉, 1mmol/L 对硝基苯-β-木糖苷 (pNP-X)、对硝基苯-α-鼠李糖苷 (pNP-R)、对硝基苯-β-葡萄糖苷 (pNP-G) 为底物, 测定木聚糖酶活力。

重组木聚糖酶低聚木糖的降解测定: 反应体系 16μL, 包括 8μL 低聚木糖 (低聚木糖浓度为 10mg/mL)、4μL 适当稀释倍数的木聚糖酶、4μL 200mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 4.5), 65℃ 下反应 1h。以不加酶的反应为对照。反应结束后, 分别取反应组与对照组各 2μL 进行薄层色谱上样。流动相为正丁醇: 乙酸: 水=2:1:1, 体积比。显色剂为 8mL 甲醇中加入 2mL 浓硫酸后, 加入 100mg 5-甲基-1,3-苯二酚充分混合均匀, 避光保存。

1.9 重组酶水解木聚糖制备低聚木糖

反应体系为: 桦木木聚糖的浓度为 25g/L, 重组木聚糖酶的添加量分别为 5U/g、10U/g、15U/g、20U/g, 在 50℃、50mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 4.5) 条件下, 分别反应 0、2h、4h、8h、12h、16h、24h 和 48h 取样测定低聚糖的含量, 如式(1)、式(2)。

$$\text{酶解率} = \frac{\text{还原糖浓度} \times 0.88}{\text{木聚糖浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{低聚木糖得率} = \frac{X_2 + X_3 + X_4 + X_5 + X_6}{\text{木聚糖浓度}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, X₂、X₃、X₄、X₅ 和 X₆ 分别为木二糖、木三糖、木四糖、木五糖和木六糖的浓度, mg/mL。

1.10 低聚糖的测定

木二糖、木三糖、木四糖、木五糖和木六糖的测定是利用高效离子色谱, 以 CarboPac™ PA200 柱为色谱柱; 100mmol/L NaOH 和 500mmol/L NaAc 为流动相, 流速 0.3mL/min; 柱温 30℃; 进样量 10μL; 检测方式: 标准四电位脉冲安培检测。

1.11 序列分析

基因序列从 NCBI 和 CAZy 数据库下载获得, 基因序列的比对使用基因比对工具 Clustal X2.0^[17]。

2 结果与讨论

2.1 木聚糖酶基因的序列分析及克隆

对嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 基因组序列进行分析, 发现共有两个木聚糖酶基因序列的开发阅读框被识别。其中一个为 GH10 家族的木聚糖酶, 该酶具有膜结合结构域^[15]。另一个是 GH11 家族的木聚糖酶 xyn11 (Genbank: AFK85913.1), 该基因全长 636bp, 编码 211 氨基酸, N 端编码有 28 个氨基酸组成的信号肽。氨基酸序列分析, 发现 GH11 家族的木聚糖酶 xyn11 与 *Clostridium* sp. DL-VIII 来源的木聚糖酶 (Genbank: WP_009171363.1) 有 81% 的同源性, 与 *Bacillus licheniformis* 来源的木聚糖酶 (Genbank: WP_043926362.1) 有 73% 的同源性。与蛋白结构数据库 (PDB) 中 *Bacillus subtilis* 1A1 来源的 GH11 家族木聚糖酶 (PDB code: 1XXN) 有 78% 的同源性。xyn11 的三维结构显示其具有典型的“右手半握”状结构。序列比对发现 xyn11 具有 GH11 家族典型的保守结构域 (见图 1), 如 GTVTSDGGTYDIYTATR (氨基酸残基位置 123-139), PSIXG (氨基酸残基位置 143-147, X 表示任意氨基酸), NHVNAWKS (氨基酸残基位置 174-181)。同时发现 xyn11 具有 GH11 家族木聚糖酶相似的活性中心谷氨酸残基 (E105、E198)。

根据 NCBI 网站公布的来源于嗜热菌 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 的 xyn11 成熟基因序列设计特异性引物 (Genbank: AFK85913.1), 扩增获得 xyn11 基因片段, 将其克隆到 pTrc-99a, 获得

重组质粒 pTrc-xyn11。

2.2 重组木聚糖酶表达条件优化

诱导剂 IPTG 浓度、诱导时间及诱导温度与重组菌表达重组酶密切相关, 通过对不同诱导条件下重组木聚糖酶活力的比较, 发现重组木聚糖酶诱导表达的最佳条件分别为: 在 37℃ 条件下, 添加 1mmol/L 的 IPTG, 诱导 8h, 所测木聚糖酶活力最高, 达到 13.8U/mL, 见图 2。

2.3 重组木聚糖酶的纯化及酶学性质

收集诱导 8h 的重组菌 1L, 用高压细胞破碎仪破碎细胞, 经热处理和镍亲和柱纯化得到电泳纯的重组木聚糖酶 xyn11, 见表 1。结果显示, 经过热处理和镍亲和柱纯化后, 重组酶的比酶活达到 4450U/mg, 纯化倍数为 198 倍, 最终重组酶的得率为 70%。从电泳谱图上可以发现, 经过热处理和镍亲和柱纯化后, 重组蛋白达到电泳纯, 分子量 20000 左右, 与预期的蛋白相对分子量大小一致, 见图 3。

利用纯化获得的重组木聚糖酶 xyn11 进行酶学性质分析, 结果如图 4 所示。该酶的最适反应 pH 为 4.5, 在 pH 3.5~5.0 范围内保持较高的酶活, 在 pH 3.5~6.0 范围内该酶保持很好的稳定性。该酶的最适反应温度为 65℃, 在 45~70℃ 的温度范围内, 该重组酶的酶活力都在最高酶活的 70% 以上, 60℃ 保温 1h, 该酶还残存 60% 的酶活。而适中的反应温度和良好的热稳定性对于酶的工业应用具有重要的意义。迄今已有大量的木聚糖酶被克隆表达^[18], 一

表 1 重组木聚糖酶 xyn11 的纯化

步骤	总蛋白 /mg	总酶活 /U	比酶活 /U·mg ⁻¹	得率 /%
粗酶	580	13000	22.4	100
热处理	370	11700	31.6	90
Ni-NTA 亲和柱	2	9100	4450	70

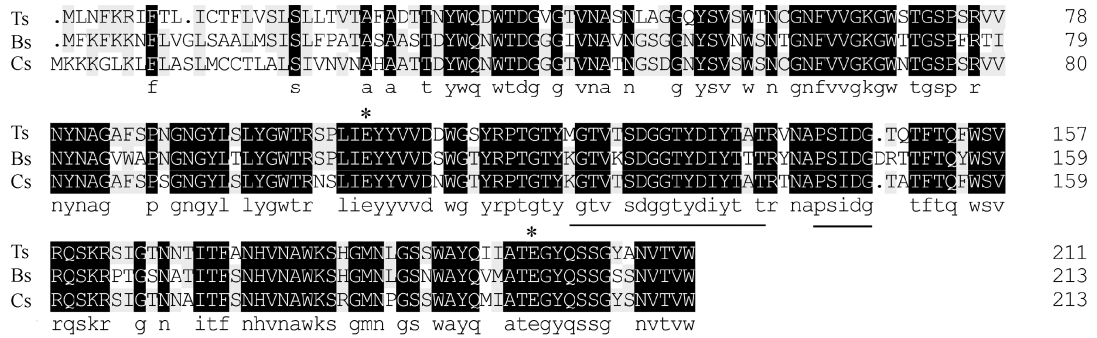


图 1 GH11 家族木聚糖酶氨基酸序列比对

Ts—*T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 (AFK85913.1); Bs—*Bacillus subtilis* (CAA84276.1); Cs—*Clostridium* sp. DL-VIII (WP_009171363.1); *—活性位点

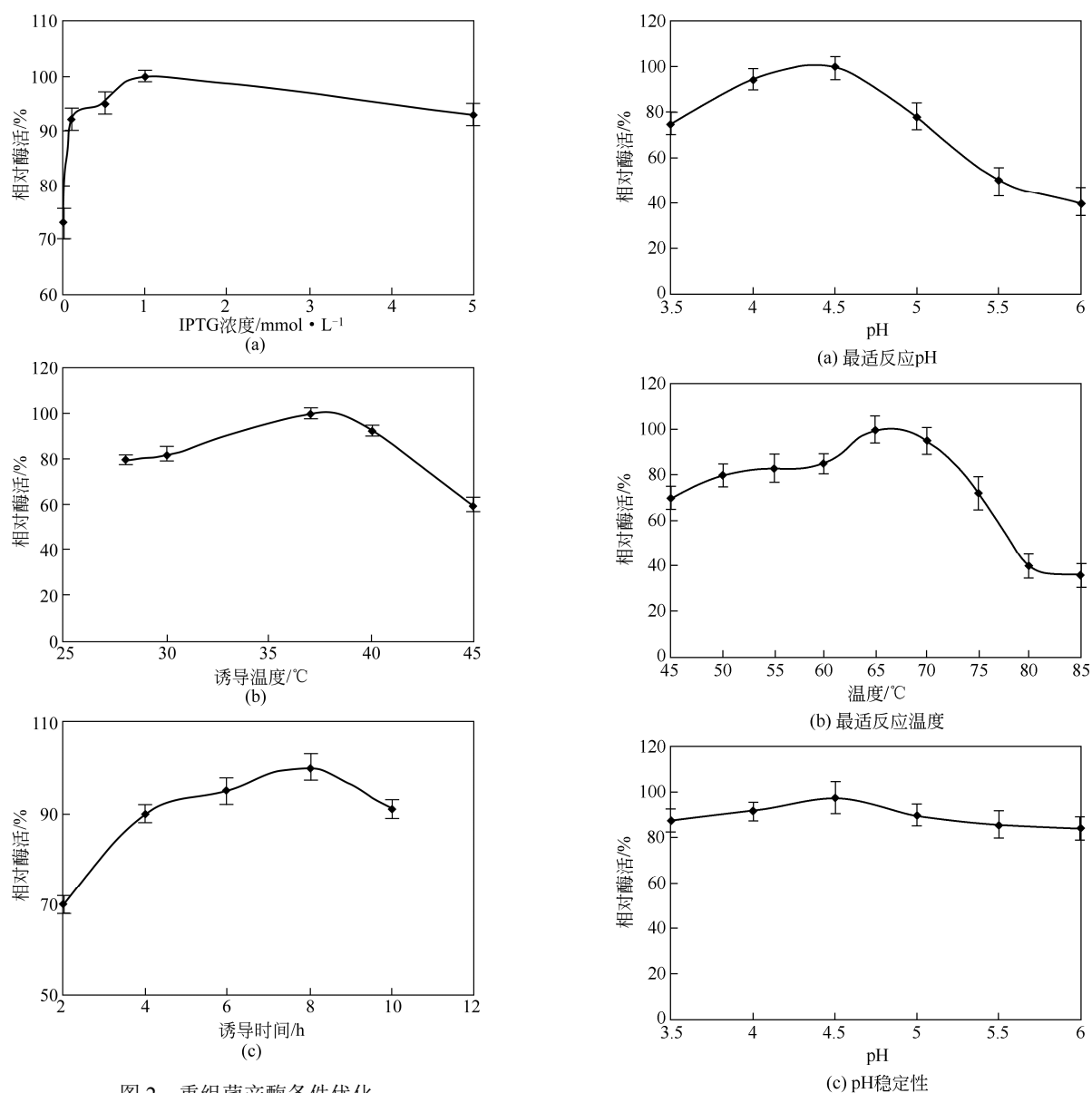


图2 重组菌产酶条件优化

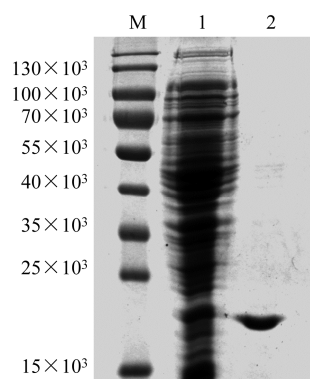


图3 重组木聚糖酶的 SDS-PAGE 电泳图

M—标准蛋白样品；1—全细胞破碎后的粗酶液；
2—纯化后的重组木聚糖酶

些极端嗜热菌来源的木聚糖酶的酶学性质也被报道，如 *Thermotoga* sp. FjSS3-B.1 来源木聚糖酶最适

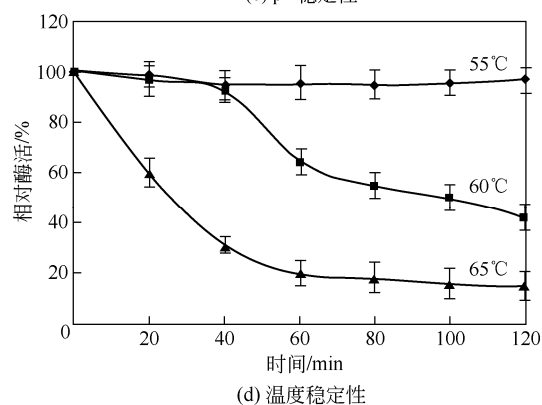


图4 重组木聚糖酶的酶学性质

反应温度为 105℃，是目前报道的热稳定性最好的木聚糖酶^[19]。但这些极耐热酶主要属于 GH10 家族的木聚糖酶。而 GH11 家族热稳定性木聚糖酶主要

来源于 *Thermomyces lanuginosus*、*Dictyoglomus thermophilum* 和 *Bacillus strain* 等,但热稳定性与 GH10 家族の木聚糖酶相比还有一定的差距^[18]。

金属离子和 EDTA 对酶活的影响如表 2 所示。重组木聚糖酶 xyn11 的活性受 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 和 Hg^{2+} 轻微抑制,而 Li^{+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 NH_4^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 和 EDTA (10mmol/L) 对该酶的活性没有影响。研究发现,该重组酶受 Cu^{2+} 激活,结果如图 5 所示, Cu^{2+} 浓度在 0~4.5mmol/L 时,对 xyn11 的酶活有促进作用,最高酶活可达 133.2%;当 Cu^{2+} 浓度达到 8mmol/L 时,xyn11 的残余活力为 52.8%。 Cu^{2+} 和 EDTA 是 GH11 家族许多酶的抑制剂^[20-21],而 xyn11 表现出对 Cu^{2+} 的耐受性和无需添加额外金属离子的特性,预示该酶可广泛应用于半纤维素水解、纸浆造纸、低聚糖制备等方面。

表 2 金属离子 (1mmol/L) 及 EDTA (10mmol/L) 对重组酶酶活的影响

试剂	酶活/%	试剂	酶活/%
对照	100	Mg^{2+}	105
Li^{+}	98	Cu^{2+}	131
K^{+}	95	Mn^{2+}	78
Zn^{2+}	102	Hg^{2+}	77
Al^{3+}	98	Ba^{2+}	85
Ca^{2+}	99	Co^{2+}	87
NH_4^{+}	96	Ni^{2+}	100
EDTA(10mmol/L)	103		

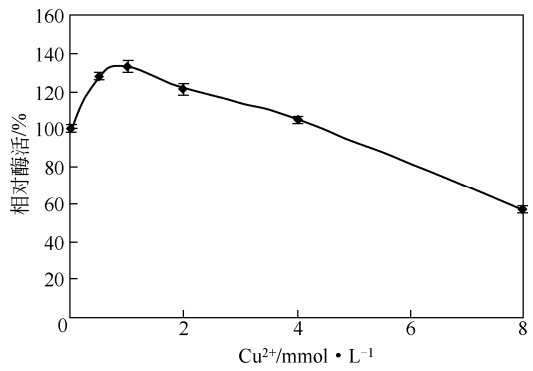


图 5 Cu^{2+} 对木聚糖酶酶活的影响

在不同的木聚糖浓度下测定重组的酶活力,采用双倒数法计算该酶的米氏常数, $1/V$ 表示酶促反应速度的倒数, $1/S$ 表示底物浓度的倒数,该直线在 X 轴上的截距为 $1/K_m$ 的值,在 Y 轴上截距为最大反应速度的倒数。该酶以桦木木聚糖为底物,在最适反应条件下的 V_{max} 和 K_m 分别为 9809U/mg 和 5.9mg/mL。该酶的 K_{cat} 值为 $3288s^{-1}$,远大于该菌来

源的 GH10 家族木聚糖酶^[15]。目前报道的具有高比活力 GH11 家族木聚糖酶主要来源于 *Aspergillus usamii* E001 (22174U/mg) 和 *Thermomyces lanuginosus* 195 (6182U/mg) 等真菌^[22-23],而 *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 来源的 xyn11 的最高比活力为 9809U/mg,接近真菌来源的 GH11 家族の木聚糖酶,具有很好的应用开发潜力^[18]。

重组木聚糖酶 xyn11 能高效降解木聚糖,但无法降解羧甲基纤维素 (CMC) 和纤维二糖,显示 xyn11 具有很高的底物特异性,主要降解由木糖组成的多聚糖,而对纤维素多聚糖没有活性。xyn11 完全不能降解木二糖、木三糖、pNP-X、pNP-R 和 pNP-G,而能缓慢降解木四糖、木五糖、木六糖等低聚糖 (见图 6),这表明 xyn11 是一个典型的内切型木聚糖酶,仅能降解木糖残基达到或超过 4 个木糖单位的低聚糖。由此可见,xyn11 在底物特异性方面与 GH11 家族の木聚糖酶具有一定的相似性。

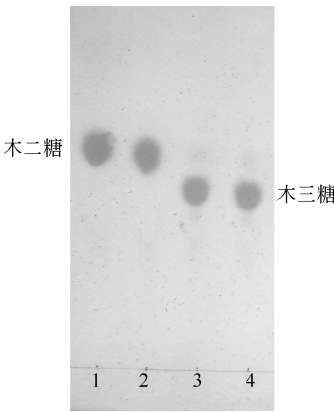


图 6 重组木聚糖酶水解木二糖、木三糖的 TLC 分析
1—木二糖不加重组酶; 2—木二糖加重组酶; 3—木三糖不加重组酶;
4—木三糖加重组酶

2.4 酶解木聚糖制备低聚糖

木聚糖酶用量对木聚糖的水解有显著影响,当底物量和酶解时间一定,加酶量不足时,底物酶解不充分,而加酶量大于一定值虽然能继续提高酶解率,但会造成成本大幅上升。本实验选取的木聚糖酶 xyn11 的用量为 5U/g、10U/g、20U/g、40U/g,桦木木聚糖浓度为 25g/L,酶解 48h,分不同时间点取样,结果如图 7 所示,酶用量由 5U/g 提高到 20U/g,木聚糖 12h 的水解率由 17.8% 增加到 20.1%。继续延长水解时间及增大酶用量,水解率也有所提高,但提高幅度不大且不经济。因此选择 20U/g 的酶用量,酶解 12h 对低聚糖的组成进行分析,结果如表 3 所示,低聚糖得率随着时间的增加而增加,

表 3 低聚木糖成分分析

时间/h	木二糖/mg·L ⁻¹	木三糖/mg·L ⁻¹	木四糖/mg·L ⁻¹	木五糖/mg·L ⁻¹	木六糖/mg·L ⁻¹	总单糖/mg·L ⁻¹	低聚木糖质量分数/%
1	921.8	1889.3	1626.7	519.1	337.1	4956.9	19.8
4	1427.9	2327.8	1650.8	367.1	309.0	6082.6	24.3
8	2095.2	2608.2	1405.8	180.1	208.3	6497.6	25.9
12	3064.3	2885.1	731.8	69.2	195.4	6945.8	27.8

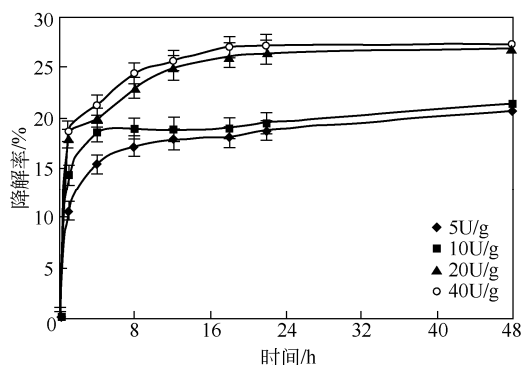


图 7 重组酶降解木聚糖制备低聚糖

但 4h 后低聚糖的得率增加速度减缓。低聚糖的最终得率为 27.8%，在反应初期主要是由木三糖和木四糖组成，但随着反应的进行，木四糖、木五糖及木六糖等低聚糖被缓慢降解，产生木二糖和木三糖，最终木二糖和木三糖占低聚糖的比例为 85.6%，且没有任何木糖产生。聚合度在 2~4 范围内的功能性低聚木糖更能促进肠道内益生菌的增殖，改善肠道功能，因此在食品中应用更为广泛，附加值也更高。本论文提供的重组木聚糖酶 xyn11 可降解木聚糖主要产生木二糖和木三糖，因此具有很好的应用前景。

3 结论

(1) xyn11 基因全长 636bp，编码 211 氨基酸，N 端编码有 28 个氨基酸的信号肽。xyn11 的三维结构显示其具有典型的“右手半握”状结构，序列比对发现 xyn11 属于 GH11 家族木聚糖酶。通过克隆成功获得其重组质粒 pTrec-xyn11，优化获得最佳表达条件：在 37℃ 条件下，添加 1mmol/L 的 IPTG，诱导 8h，木聚糖酶酶活达到 13.8U/mL。

(2) 重组酶通过热处理和 Ni 亲和层析达到电泳纯，SDS-PAGE 显示其分子量为 20000，与理论分子量吻合。重组酶的最适反应温度为 65℃，最适反应 pH 为 4.5，在 pH 3.5~6.0 范围内保持较高的稳定性，60℃ 保温 1h，酶活还残存 60%，Cu²⁺ 对该酶有激活作用。重组酶以榉木木聚糖为底物，其 V_{max} 和 K_m 分别为 9809U/mg 和 5.9mg/mL。

(3) 重组木聚糖酶用量为 20U/g，在 50℃、pH 4.5 条件下水解 12h，低聚糖的得率为 27.8%，水解产物主要由木二糖和木三糖组成，木二糖和木三糖占低聚糖的比例为 85.6%，且不会产生任何木糖。

参考文献

- [1] 何敏超, 张宇, 许敬亮, 等. 木聚糖酶高产菌筛选研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32 (1): 145-150.
HE M C, ZHANG Y, XU J L, et al. Research progress of screening of high xylanase-producing strain[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32 (1): 145-150.
- [2] HAKI G D, RAKSHIT S K. Developments in industrially important thermostable enzyme: a review[J]. Bioresource Technol., 2003, 89 (1): 17-34.
- [3] HUANG H, YANG P, LUO H, et al. High-level expression of a truncated 1,3-1,4-β-D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78 (1): 95-103.
- [4] HENRISSAT B, BAIRDOCH A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochem. J., 1993, 293 (3): 781-788.
- [5] POOSARLA V G, CHANDRAT S. Purification and characterization of novel halo-acid-alkali-thermo-stable xylanase from *Gracilibacillus* sp. TSCPVG[J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 173 (6): 1375-1390.
- [6] NG C H, HE J, YANG K L. Purification and characterization of a GH11 xylanase from biobutanol-producing *Clostridium beijerinckii* G117[J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2015, 175 (6): 2823-2844.
- [7] MAMO G, HATTI-KAUL R, MATTIASSEN B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7[J]. Extremophiles, 2007, 11 (1): 169-177.
- [8] WONG K K Y, SADDLER J N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application[J]. Crit. Rev. Biotechnol., 1992, 12: 413-435.
- [9] LIU M Q, LIU G F. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it[J]. Protein Expr. Purif., 2008, 57 (2): 101-107.
- [10] 李永泉, 陈时飞, 岑沛霖. 微波辐照选育木聚糖酶高产菌株佐美曲霉[J]. 中国化学工程学报, 2003, 11 (5): 594-597.
LI Y Q, CHEN S F, CEN P L. Mutagenesis and screening of high yield xylanase production strain of *Aspergillus usami* by microwave irradiation[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2003, 11 (5): 594-597.
- [11] CAMPBELL J M, FAHEY G C, WOLF B W. Selected indigestible

- oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats[J]. *J. Nutr.*, 1997, 127 (1): 130-136.
- [12] SHI P J, DU Y L, YANG H, et al. Molecular characterization of a new alkaline-tolerant xylanase from *Humicola insolens* Y1[J]. *Biomed. Res. Int.*, 2015, 2015: 149504.
- [13] SIBTAIN A, SABA R, AMER J. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 84 (1): 19-35.
- [14] PAES G, BERRIN J G, BEAUGRAND J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2013, 30 (3): 564-592.
- [15] SHAO W L, DEBLOIS S J. A high-molecular-weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485[J]. *Appl. Environ. Microb.*, 1995, 61 (3): 937-940.
- [16] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal. Chem.*, 1959, 31 (3): 426-428.
- [17] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. ClustalW and ClustalX version 2[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947-2948.
- [18] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(1): 3-23.
- [19] SIMPSON H D, HAUFLE U R, DANIEL R M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*[J]. *Biochem. J.*, 1991, 277 (2): 413-417.
- [20] YANG Y, SHAN K, PING L, et al. Cloning, sequencing and expression of a novel xylanase cDNA from a newly isolated *Aspergillus awamori* in *Pichia pastoris*[J]. *Afr. J. Biochem.*, 2008, 7 (23): 4251-4259.
- [21] ZHOU C Y, WANG Y T, WU M C, et al. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*[J]. *Food Technol. Biotech.*, 2009, 47 (1): 90-95.
- [22] ZHANG H M, WANG J Q, WU M C, et al. Optimized expression, purification and characterization of a family 11 xylanase (AuXyn11A) from *Aspergillus usamii* E001 in *Pichia pastoris*[J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 94 (4): 699-706.
- [23] GAFFNEY M, CARBERRY S, DOYLE S, et al. Purification and characterisation of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*[J]. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2009, 45: 348-354.