

文章编号:2095-7386(2022)01-0016-09

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2022.01.003

海洋微生物 *Cellulophaga algicola* DSM 14237 木聚糖酶的分子鉴定及酶学性质

丁睿, 谢会芳, 韩正刚, 杨江科
(武汉轻工大学 生命科学与技术学院, 武汉 430023)

摘要:从海洋微生物中挖掘酶基因资源是获取新型工业酶的重要途径。从海洋微生物基因组资源库中发掘到一个来源于海洋微生物 *Cellulophaga algicola* DSM 14237 的木聚糖酶基因 (*Xyn14237*)。通过氨基酸序列比对和三维结构模拟分析得知 *Xyn14237* 属于糖苷水解酶第10家族。将部分截短并密码子优化后的 *Xyn14237* 在大肠杆菌 BL21 内进行重组表达,通过镍柱亲和纯化获得重组 *Xyn14237*,采用还原糖法测定其酶学性质。结果显示 *Xyn14237* 的最适催化温度和 pH 分别 40 °C 和 7.0。酶分子在 pH 5~10 之间稳定性较好,相对酶活均保持在 90% 以上。酶分子不耐热,当温度超过 30 °C 时其活性急剧下降。以桦木木聚糖为底物, *Xyn14237* 的最大反应速度为 1627.31 U/mg, K_m 为 3.15 mg/mL, k_{cat} 为 975.98 s⁻¹。薄层层析分析显示 *Xyn14237* 水解木聚糖释放出的产物为木三糖、木二糖及木糖。从分子和酶学性质层面上分析了来自海洋微生物 *C. algicola* 的第一个木聚糖酶基因。

关键词:海洋微生物;木聚糖酶;10 家族糖苷水解酶;酶学性质;原核表达;亲和纯化;蛋白质三维结构模拟

中图分类号:Q 814.9

文献标识码:A

Molecular identification and enzymatic properties of marine microorganism *Cellulophaga algicola* DSM 14237 xylanase

DING Rui, XIE Hui-fang, HAN Zheng-gang, YANG Jiang-ke

(School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Mining enzyme gene resources from marine microorganisms is an important way to obtain novel industrial enzymes. In this study, a xylanase gene (*Xyn14237*) derived from the marine microorganism *Cellulophaga algicola* DSM 14237 was discovered from the marine microbial genome resource bank. Through amino acid sequence alignment and three-dimensional structure simulation analysis, it was known that *Xyn14237* belonged to the 10th family of glycoside hydrolases. The codon-optimized *Xyn14237* was recombined and expressed in *Escherichia coli* BL21, and the pure recombinant *Xyn14237* was obtained by affinity purification with a nickel column, and its enzymatic properties were determined by the reducing sugar method. The results showed that the optimal catalytic temperature and pH of *Xyn14237* were 40 °C and 7.0, respectively. Enzyme molecules had good stability between pH 5–10, and the retained relative enzyme activity was above 90% at this pH range. *Xyn14237* was not heat resistant, and its ac-

收稿日期:2021-12-07.

作者简介:丁睿(1996-),男,硕士研究生,E-mail:1252181910@qq.com.

通信作者:韩正刚(1981-),男,博士,E-mail:zhengganghan@whpu.edu.cn.

tivity dropped sharply after 1 h incubation at 30°C. Using beechwood xylan as the substrate, Xyn14237 showed maximum xylanase activity of 1627.31 U/mg, K_m value of 3.15 mmol/L, and k_{cat} value of 975.98 s⁻¹. Thin-layer chromatography analysis showed that the products released by Xyn14237 hydrolyzing xylan were xylotriose, xylobiose, and xylose. This study analyzed the first xylanase gene from the marine microorganism *C. algicola*.

Key words: marine microorganisms; xylanase; 10 family glycoside hydrolase; enzyme properties; prokaryotic expression; affinity purification; three-dimensional structure simulation

1 引言

半纤维素是仅次于纤维素的第二大类多聚类型碳水化合物^[1]。相对于纤维素物质,半纤维素的成分较为复杂,组成的糖类因来源不同也差异极大。主要的半纤维素物质有木聚糖、木葡聚糖、甘露聚糖等^[1]。其中木聚糖是半纤维素的主要成分,约占自然界中半纤维素物质的 20%~40%^[2]。木聚糖以 β -1,4 糖苷键连接的木糖残基为主链。不同来源的木聚糖存在不同程度的侧链修饰,例如乙酰基、阿拉伯糖残基、葡萄糖醛酸残基等^[3]。由于木聚糖分子在结构上存在极大的多样性,木聚糖分子的生物降解需要众多不同酶分子的联合作用。这些酶分子包括 β -1,4-内切木聚糖酶 (EC 3.2.1.8)、木二糖酶、阿拉伯糖苷酶、木糖乙酰酯酶^[2]。其中, β -1,4-内切木聚糖酶是降解木聚糖分子的主要酶种,因此通常也将其简称为木聚糖酶。木聚糖酶在工业上和生物工程领域有着极为重要的用途。在造纸工艺上,木聚糖酶被用于纸浆的生物漂白^[4],也可用于去除废纸中的墨水^[5];将木聚糖酶加入到饲料中,可以促进食物的消化^[6];木聚糖酶也可以将面粉中水不溶性半纤维素转化为可溶性形式,降低面团的硬度,增加面团发酵的体积,使得面包更加精细和均匀^[7]。

木聚糖酶的来源较为丰富。已经鉴定的木聚糖酶来自于真菌、细菌、酵母、海洋产生藻类、原生动物、蜗牛、甲壳类动物、昆虫、种子等^[8]。基于氨基酸序列的相似性,木聚糖酶被分类到糖苷水解酶 (GH) 第 7、8、10、11、43 五个家族,以第 10 和 11 家族最为常见^[9]。GH10 家族木聚糖酶的研究报道最多。GH10 家族糖苷水解酶在结构上呈 α 螺旋和 β 折叠片组成的桶状结构。其分子表面有一条长长的沟槽,是底物结合的区域。底物结合沟槽包括保守的糖基端 (glycone) 亚位点 (-3、-2、-1) 和较为不保守的糖苷配基端 (aglycone) 亚位点 (+1、+2、+3)^[10]。糖基端亚位点与木二糖和木三糖具有非常强的结合能力,所有长于木二糖或者木三糖长度的底物分子都会被酶分子从非还原端切割下来。

GH10 木聚糖酶通常受底物侧链修饰影响较小,对不溶性底物的水解作用很弱^[10]。

由于木聚糖酶在工业领域有着很大的应用场景,近些年来大量的研究致力于从自然环境中寻找能够产生木聚糖酶的微生物^[9]。在大多数细菌种属中都发现木聚糖酶的存在^[9]。这些来自不同细菌的木聚糖酶在反应温度、反应 pH、温度稳定性、pH 稳定性、底物特异性等方面都不尽相同。不同的酶学性质特征使得这些木聚糖酶分子具有差异化的潜在应用。然而,由于微生物发酵产物成分复杂,从天然木聚糖酶生产菌中分离获得较纯的酶分子是一个很大的挑战。因此,研究者倾向于从微生物中克隆木聚糖酶基因,然后通过重组 DNA 技术在异源细胞中表达木聚糖酶分子^[11]。

我们在前期的研究中,从海洋微生物基因资源库中挖掘到了数个木聚糖酶基因,并且成功地实现在大肠杆菌或者毕赤酵母细胞中的重组表达。通过酶分子特征分析和酶学性质鉴定,这些木聚糖酶显示出较好的应用潜力^[12,13]。本研究发现一种来自海洋微生物 *Cellulophaga algicola* DSM 14237 木聚糖酶基因 (Xyn14237)。氨基酸序列比对分析和三维结构模拟显示 Xyn14237 与之前报道的木聚糖酶序列相似性很低,三维结构上具有较明显的差异。通过大肠杆菌表达系统,我们成功实现 Xyn14237 的可溶性表达。重组 Xyn14237 对榉木木聚糖显示出较高的木聚糖酶活性。酶学性质测定显示, Xyn14237 具有明显的低温酶特征,即在较低的温度维持较高的酶活力。低温酸性等特征使得 Xyn14237 在面团发酵,在改善馒头和面包品种上具有很大的应用潜力。

2 材料与方法

2.1 基因、载体、菌株与试剂

Xyn14237 基因的编码信息来自于 GenBank (序列登录号为: WP_013549674.1)。Xyn14237-GH10 结构域的基因片段由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。人工合成的编码基因置于测序载体 pUC57-mini 的多克隆位点。表达载体 pET-28a 由本实验

室保存。大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存。限制性内切酶 (*EcoRI*、*NotI*)、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 硅胶板购自青岛海洋化工有限公司; 其他常用试剂按照实验室配方进行配制。

2.2 氨基酸序列比对和蛋白质三维结构模拟

GH10 家族糖苷水解酶氨基酸序列来自 Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy) (<http://www.cazy.org/>)。使用 MEGA 软件包中的 ClustalW 程序对 Xyn14237 和其他 GH10 木聚糖酶进行氨基酸序列比对分析。使用 Neighbor-Joining 法构建 GH10 木聚糖酶的系统进化树。通过 Swiss-model 在线程序 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建 Xyn14237 的三维结构模型。

2.3 大肠杆菌表达载体的构建及摇瓶发酵

将重组质粒 pUC57-mini-Xyn14237 通过限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切, 回收 Xyn14237 基因片段。将基因回收片段与同样经 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切的表达载体 pET-28a 连接并转化大肠杆菌 DH5 α 。经试剂盒提质粒、*EcoRI* 和 *NotI* 双酶切、凝胶核酸验证后正确的重组质粒 pET-28a-Xyn14237 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。含有重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 在含有浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中振荡培养至光密度达到 0.6 左右, 加入终浓度为 0.25 mM 的诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷。诱导后培养温度调整至 20 $^{\circ}\text{C}$, 继续培养 20 h。

2.4 木聚糖酶 Xyn14237 的纯化

5 000 r/min 离心收集菌体, 用 10 mL 缓冲液 A (10 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, pH 8.0) 重悬, 经超声波破碎后高速离心 (13 000 r/min) 收集上清液。上清液经 0.45 μm 滤器过滤之后加入到镍柱中。重组蛋白质经缓冲液 B (10 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0) 洗脱获得。收集洗脱的蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 检测。通过 Bradford 法测定纯化后的 Xyn14237 的浓度。

2.5 木聚糖酶 Xyn14237 的酶活测定

使用还原糖法测定木聚糖酶 Xyn14237 的酶活力。一个反应体系包括 100 μL 0.1 M 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液, 100 μL 1% 的榉木木聚糖溶液, 100 μL 适当稀释的后 Xyn14237 溶液。混匀后置于水浴锅中孵育 10 min, 然后立刻加 300 μL DNS 终止反应, 沸水

浴 5 min, 自来水冷却至室温, 用蒸馏水定容至 2 mL。混匀在 520 nm 处测定吸光度。木聚糖酶的活力单位定义为每分钟催化生成 1 μmol 还原糖所需的酶量。使用木糖标准品测定并绘制标准曲线。配制 1 mg/mL 木糖标准溶液, 准确量取 0 μL 、30 μL 、36 μL 、42 μL 、48 μL 、54 μL 、60 μL 、66 μL 、72 μL 、84 μL 、90 μL 用蒸馏水补至 300 μL , 再加入 300 μL DNS, 沸水浴 5 min, 然后用自来水冷却至室温, 在 520 nm 进行光吸收测定, 绘制木糖标准曲线。

2.6 重组木聚糖酶 Xyn14237 的酶学性质测定

2.6.1 最适反应温度和最适反应 pH 测定

在 10 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 区间内, 每隔 10 $^{\circ}\text{C}$ 设置一个反应测定酶活力, 以测得的最高酶活定为 100%, 计算其他反应温度的相对酶活。在 pH 3 ~ 11 之间, 每隔 1 个 pH 单位测定酶活力, 以测得的最高酶活定为 100%, 计算其他反应 pH 的相对酶活性。产生 pH 梯度所用的缓冲液为 0.1 M 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 3 ~ 8) 和 0.1 M 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9 ~ 11)。每个反应都设置三个重复。

2.6.2 温度稳定性和 pH 稳定性测定

在最适 pH 条件下, 将分装的重组 Xyn14237 分别置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 1 h, 然后在最适温度和最适 pH 条件下反应 10 min 测定酶活力, 以未保温的酶液的活性定义为 100%。将适当稀释的酶液在 pH 3 ~ 11 的条件下, 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h, 再分别测定残留酶活性。以未 pH 孵育的木聚糖酶酶活定为 100%。每个反应都设置三个重复。

2.6.3 金属离子及添加剂对 Xyn14237 活性的影响

在上述的标准木聚糖酶活性测定反应体系中, 加入不同的金属离子、金属离子螯合剂、蛋白质变性剂、表面活性剂、有机溶剂、还原剂, 测定其对 Xyn14237 活性的影响。各种添加物的含量设置高和低两个浓度。以未添加的反应测出的酶活力定义为 100%。每个反应都设置三个重复。

2.6.4 重组木聚糖酶的动力学参数

以不同浓度 (0.5 ~ 5.0 mg/mL) 的榉木木聚糖溶液为底物, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7 的反应条件下反应 2.5 min 测定木聚糖活性。通过 Lineweaver-Burk 作图法求得 Xyn14237 的酶促动力学参数 K_m 、 k_{cat} 及 V_{max} 。

2.6.5 薄层层析法分析 Xyn14237 的水解产物

将 Xyn14237 与不同长度的木聚寡糖 (木二糖、木三糖、木四糖、木五糖、木六糖) 在最适条件下反应 1 h。将反应体系置于煮沸 10 min 灭酶分子后, 水解物上样到硅胶板上。层析所用的展开剂成分为正

丁醇: 异丙醇: 乙酸: 水 = 7: 5: 2: 4 (体积比)。显色剂为 5% 浓硫酸的甲醇溶液。以没有水解的木聚寡糖作为层析的标准品显示水解产物的大小。

3 结果与分析

3.1 序列比对结果

将 Xyn14237 氨基酸序列与已报道的 GH10 家族

木聚糖酶进行多序列比对分析可以发现, Xyn14237 含有该家族保守的 VVNE 和 NDY 基序(图 1)。基于已报道 GH10 的结论, 可以推测 Xyn14237 上负责催化的氨基酸残基为 Glu259 和 Glu364。这两个谷氨酸分别起到酸碱催化剂和催化亲核基团的功能。其中 Glu259 位于 VVNE 基序中。

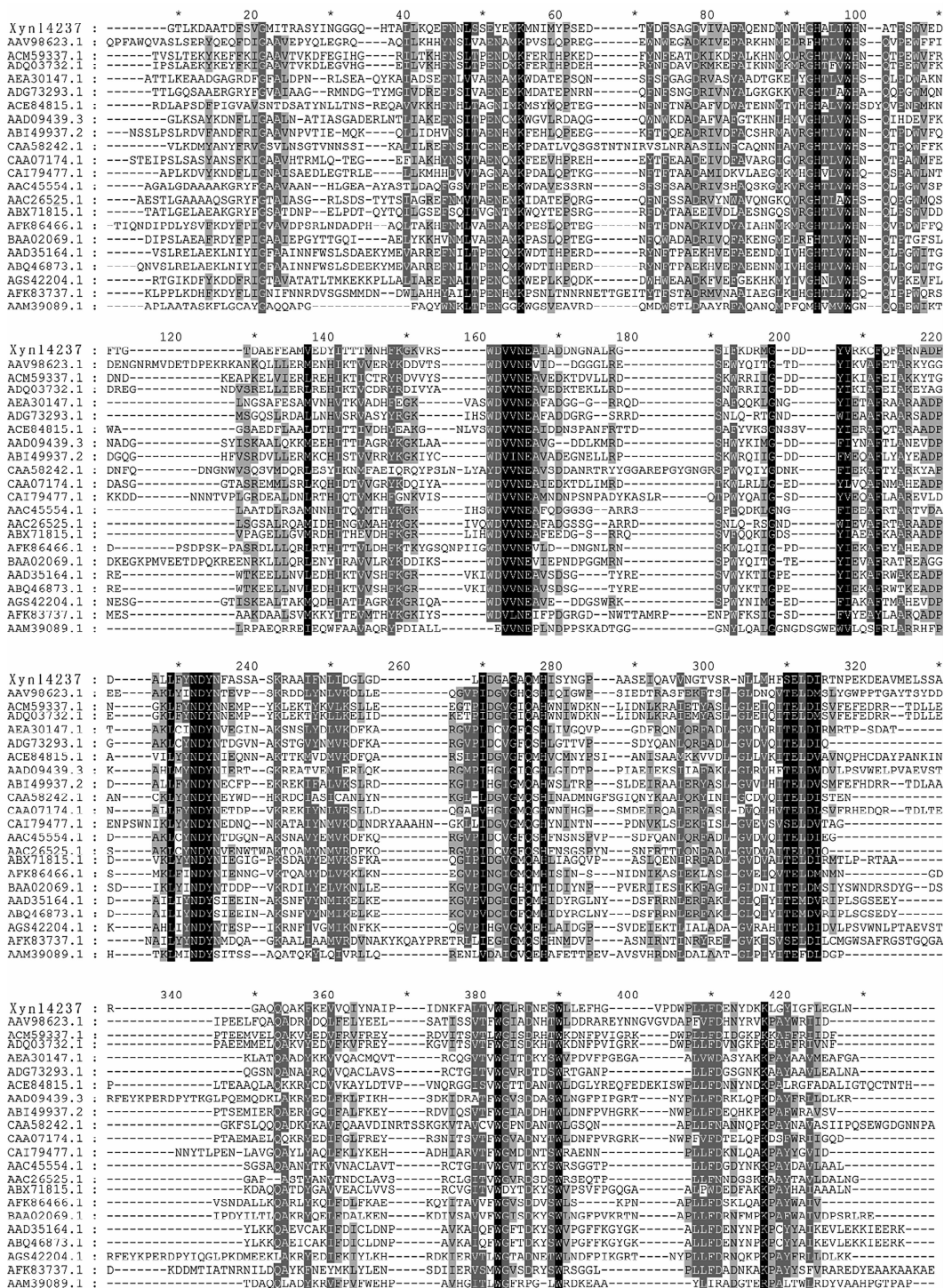


图 1 Xyn14237 与 GH10 家族木聚糖酶氨基酸序列比对

其他木聚糖酶氨基酸序列用其 GenBank 登录号命名。AAV98623.1 来自 *Bacillus halodurans*; ACM59337.1 来自 *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725; ADQ03732.1 来自 *Caldicellulosiruptor owensensis* OL; AEA30147.1 来自 *Cellulomonas fimi* ATCC 484; ADG73293.1 来自 *Cellulomonas flavigena* DSM 20109; ACE84815.1 和 ACE85439.1 来自 *Cellvibrio japonicus* Ueda107; ABI49937.2 来自 *Geobacillus stearothermophilus*; CAA58242.1 来自 *Hungateiclostridium thermocellum* YS; CAA07174.1 来自 *Paenibacillus barcinonensis*; CAI79477.1 来自 *Paenibacillus* sp. JDR-2; AAC45554.1 来自 *Streptomyces halstedii*; AAC26525.1 来自 *Streptomyces lividans* 1326; ABX71815.1 来自 *Streptomyces* sp. S9; AFK86466.1 来自 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485; BAA02069.1 来自 *Thermoclostridium stercorarium*; AAD35164.1 来自 *Thermotoga maritima* MSB8; ABQ46873.1 来自 *Thermotoga petrophila* RKU-1; AAM39089.1 来自 *Xanthomonas citri* pv. citri str. 306; AGS42204.1 和 AFK83737.1 来自未培养的细菌。

将多序列比对的结构通过 Neighbor-Joining 构建系统进化树可以看到 Xyn14237 与来自 *Cellvibrio japonicus* Ueda107 的 GH10 木聚糖酶 (CjXyn10C, GenBank 登录号为 ACE84815.1) 最为接近 (图 2)。两者的氨基酸序列一致性为 35%。

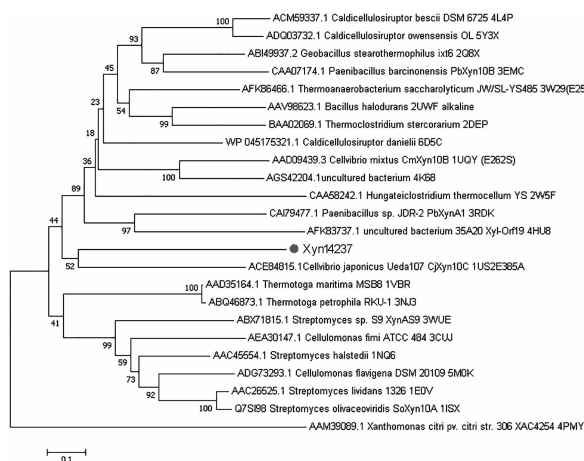


图2 以氨基酸序列构建的 GH10 家族木聚糖酶进化树 (bootstrap = 1000)

3.2 Xyn14237 的重组表达与纯化

Xyn14237 基因开放阅读框含有 1 362 个碱基, 编码一个由 453 个氨基酸组成的多肽链。在构建重组表达质粒构建时, 选取多肽链上编码 GH10 糖苷水解酶结构域的区域进行重组表达。该区域起始于 132 位为丝氨酸结束于 453 位的天冬酰胺。由于基因片段

插入在 pET-28a 多克隆位点的 *EcoRI* 位点, 因此重组蛋白质的氨基端含有来自载体核苷酸编码的 36 个氨基酸残基。加上该氨基端融合的 36 个氨基酸, 多肽链总共有 358 个残基, 理论分子量为 39 805.24 Da。

含有重组质粒的大肠杆菌在 16 °C 诱导培养 20 h 后, 通过超声破碎, 离心收集上清液, 镍柱亲和纯化进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 (图 3)。纯化获得的 Xyn14237 在蛋白质凝胶图中显示为一条单一的条带, 大小位于分子量 44 kDa 和 29 kDa 的标准蛋白质之间, 符合其理论大小, 可见 Xyn14237 表达和纯化成功。

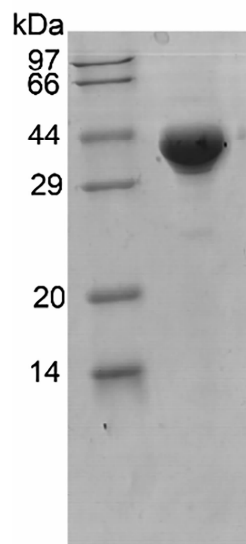


图3 SDS-PAGE 分析纯化后的 Xyn14237 蛋白质

3.3 Xyn14237 木聚糖酶的最适温度和最适 pH

在不同 pH 条件下, 重组 Xyn14237 在 pH 7 缓冲液中表现出最高酶活力。在 pH 5~8 缓冲液中呈现不低于 40% 的最高酶活力 (图 4A)。在温度方面, Xyn14237 在 40 °C 的酶活最高。在低温条件下, 10 °C 到 40 °C 区间里, Xyn14237 可以维持 55% 以上的最高活性。Xyn14237 明显在高温条件下活性较差, 50 °C 到 80 °C 的温度区间里, 酶分子的活性低于 30% (图 4B)。

3.4 Xyn14237 木聚糖酶的温度稳定性和 pH 稳定性

酶分子的稳定性方面, Xyn14237 在 pH 3 和 pH 4 条件下完全失去活性。在 pH 4 到 pH 10 条件下, Xyn14237 可以维持至少 90% 的活性 (图 4C)。经在 10 °C 到 30 °C 条件下孵育 1 h 后, Xyn14237 可以保持酶活性不受损失, 而且有小幅的提升 (图 4D)。从 40 °C 开始, 酶分子的活力开始急剧下降。具体来说, 40 °C 孵育之后, Xyn14237 残留大约 60% 的酶活力; 50 °C 孵育 1 h 之后, Xyn14237 则完全失去活性 (图 4D)。

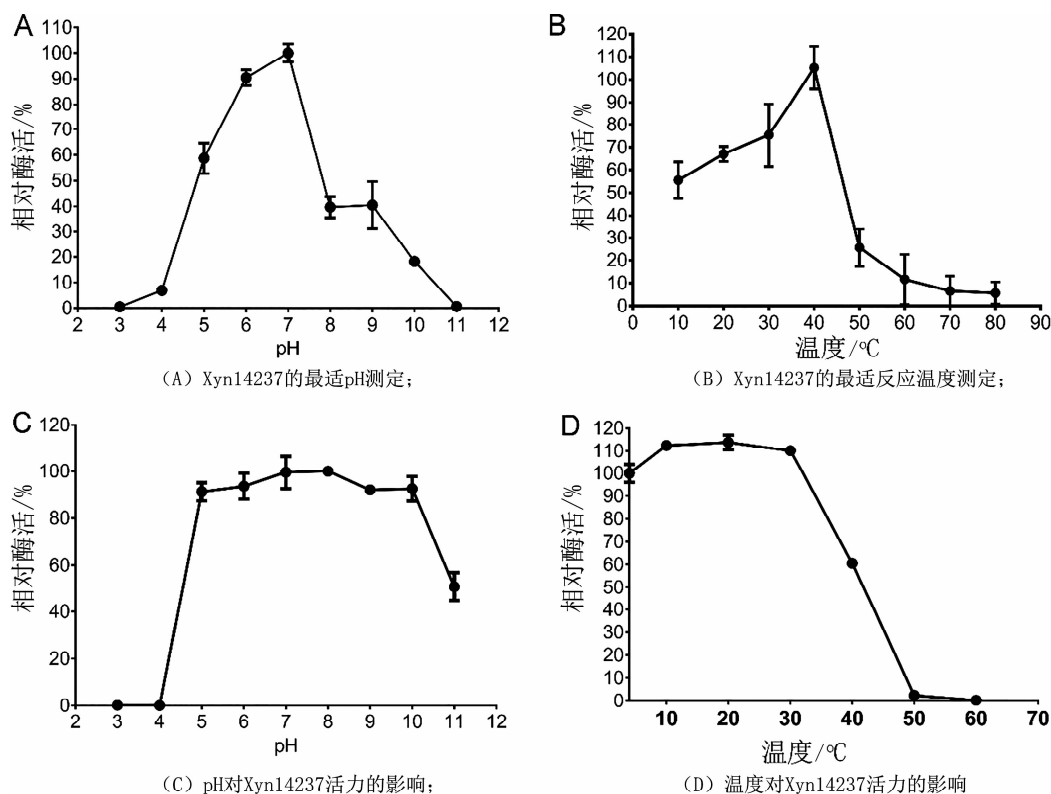


图4 Xyn14237 的温度和 pH 特征

3.5 不同金属离子和添加剂对 Xyn14237 活性的影响

在木聚糖酶反应体系中加入不同的金属离子或者添加剂,分别测定其对 Xyn14237 活性的影响。从测定的结果来看,只有 Ca^{2+} 在低浓度时(5 mM)对 Xyn14237 的活性有小幅度的提升作用,大约提高 20%;然而 10 mM Ca^{2+} 对酶分子的活性则显示出抑制作用(图 5)。其他所测定的金属离子无论在低浓度和高浓度都对 Xyn14237 的活性有着不同程度的抑制作用(图 5)。其中, Fe^{2+} 对 Xyn14237 的抑制作用最为明显。在 10 mM Fe^{2+} 的条件下,酶分子只残留 40% 左右的活性。金属离子螯合剂 EDTA 对 Xyn14237 的活性也显示出一定的抑制作用。

离子型表面活性剂 SDS 对 Xyn14237 的活性有稍微的抑制效果;而非离子表面活性剂 Triton X-100 则对 Xyn14237 的活性有有一定的增强作用(图 5)。尿素在低浓度(100 mM)和高浓度(200 mM)的抑制程度都非常低。硫酸铵在高浓度(200 mM)下几乎完全抑制 Xyn14237 的活性。各种测定的有机溶剂基本都对 Xyn14237 的活性表现出抑制效果。具体来看,Xyn14237 可以耐受 5% 的甲醇、10% 的丙酮;异丙醇对酶分子的抑制效果最为强烈(图 5)。

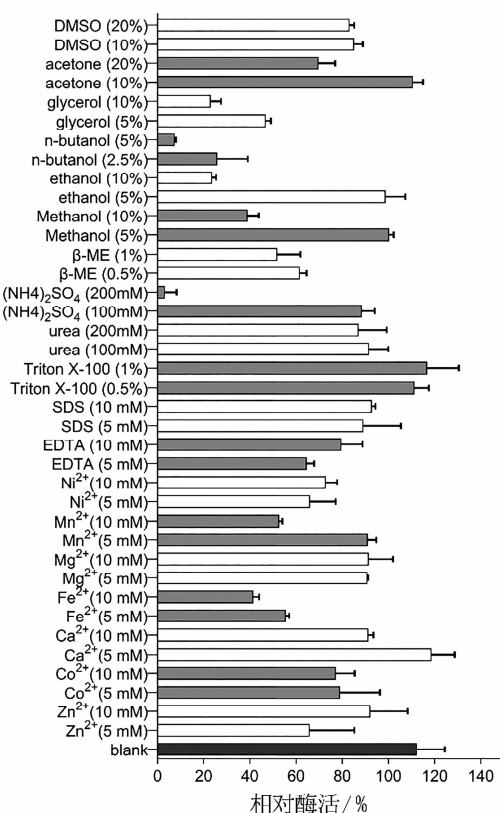


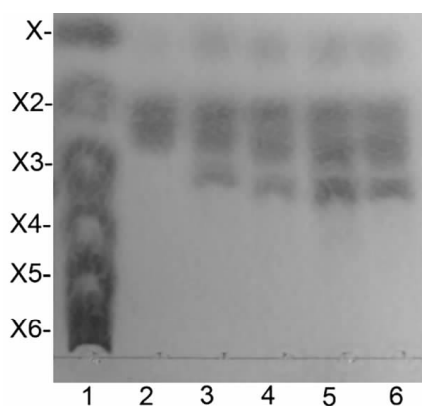
图5 金属离子和各种添加剂对 Xyn14237 活性的影响

3.6 Xyn14237 的酶促动力学

在最适反应条件下,使用梯度梓木木聚糖(0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL)测定 Xyn14237 的酶促动力学参数,其 $V_{\max}$ 、 K_m 和 k_{cat} 分别为 1627.31 U/mg、3.15 mg/ml 和 975.98 s⁻¹。

3.7 Xyn14237 的水解产物分析

以不同长度的木聚寡糖作为底物,用薄层层析法分析重组 Xyn14237 水解木聚寡糖的产物的类型。从结果看,Xyn14237 可以水解木三糖及更长的木聚糖分子,不能水解木二糖(图 6)。Xyn14237 水解木三糖生产木二糖和木糖;水解木四糖、木五糖、木六糖释放出木三糖、木二糖和木糖。

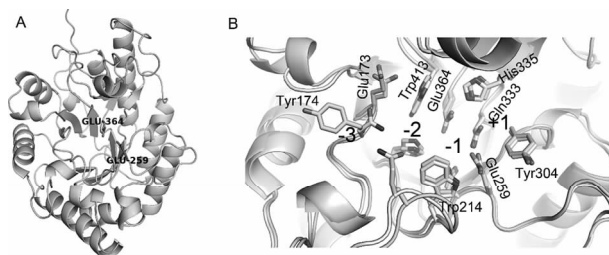


第一泳道:不同长度木聚寡糖标准品;X:木糖;X2:木二糖;X3:木三糖;X4:木四糖;X5:木五糖;X6:木六糖。第二泳道:Xyn14237 水解 X2 的产物;第三泳道:Xyn14237 水解 X3 的产物;第四泳道:Xyn14237 水解 X4 的产物;第五泳道:Xyn14237 水解 X5 的产物;第六泳道:Xyn14237 水解 X6 的产物

图 6 薄层层析法分析 Xyn14237 水解木聚寡糖的产物

3.8 Xyn14237 的三维结构特征分析

利用蛋白质三维结构模拟程序产生出 Xyn14237 GH10 结构域的三维结构模型。结构模型显示,Xyn14237 具有 GH10 糖苷水解酶典型的由 8 个 α 螺旋和 8 个 β 折叠片组成的桶状结构(图 7)。在桶状结构的中部为两个催化氨基酸(Glu259 和 Glu364)。对比其他研究较为深入的同家族木聚糖酶,组成 Xyn14237 上负责与底物结合的氨基酸基本是保守的,例如 +1 位点酪氨酸(Tyr340)、-1 位点的谷氨酰胺(Gln333)、-2 位点的色氨酸(Trp413)、-3 位点的谷氨酸(Glu173)。一个显著的差异是位于 -3 位点的氨基酸残基,原本为天冬酰胺的残基在 Xyn14237 上为一个酪氨酸(Tyr174)(图 7)。



A:Xyn14237 的三维结构模型全局图;B:Xyn14237 的底物结合沟槽及其氨基酸组成;浅色为同家族的海栖热袍菌木聚糖酶(TmxB)的晶体结构;深色为 Xyn14237 的结构模型

图 7 Xyn14237 的三维结构模型

4 讨论

半纤维素水解酶是一类可以将木聚糖和甘露糖两类自然界最丰富的半纤维素物质生物分解的复合酶类。由于其在食品、动物饲料、造纸等行业具有极为重要的应用^[9],发掘自然界中的半纤维素水解酶及其基因资源受到生物工程研究者和行业人员的极大关注。海洋环境是地球上最大的生态系统。海洋中存在大量的古细菌、细菌、真菌以及各种病毒。这些生命的存在使得海洋成为潜在酶分子的重要资源库^[14]。源自海洋微生物的酶分子被认为具有很好的极端环境耐受性^[14]。在这项研究中,研究者自海洋微生物中发掘到一种新型的木聚糖酶基因(Xyn14237),并通过基因工程技术,在大肠杆菌细胞中对其进行异源表达。本研究为半纤维素的生物工程应用提供了一种新颖且性质独特的酶分子资源。

氨基酸序列比对显示,Xyn14237 与已经报道的 GH10 家族木聚糖酶相似的较低,只有 35%。这一点符合其来自海洋微生物的特征。从酶分子的局部来看,Xyn14237 保持 GH10 家族木聚糖酶保守的一些基序,可见酶分子不同区域在进化过程中的速率并不一致。现如今,科学家可以通过生物信息学手段预测酶分子比较宽泛意义上的功能,但是单从 Xyn14237 的氨基酸序列,我们无法预测出其在催化方面的特征,比如酶分子的反应温度和反应 pH。这也是目前该领域科学家面临的一个重要问题。因此,需要获取酶分子蛋白质,或者对其编码基因进行重组表达获取蛋白质,然后通过体外的酶活实验确定酶分子在催化方面的特征显得十分有必要。

大肠杆菌表达系统以快速、方便、高效为特征,是目前酶分子首次进行功能鉴定的首选基因表达系统^[15]。但是,大肠杆菌表达的蛋白质往往是不可溶

的包涵体形式^[16]。我们首先尝试了对 Xyn14237 全长蛋白质的表达。但是带有氨基端信号肽和一些未知功能的氨基酸残基的情况下,全长的 Xyn14237 是完全不可溶的。在使用同源建模法获得 Xyn14237 的三维结构之后,以结构作为参考,只选择表达 GH10 糖苷水解酶球形蛋白质区域,才成功地对 Xyn14237 进行了重组表达。

酶分子的温度和 pH 特征对于其生物工程应用十分重要。高温或者热稳定性较高的木聚糖酶具有可以有效地增加底物和产物的溶解性、减少酶促反应所需的时间、降低底物的粘性以及最小化地降低反应过程中微生物的污染等优点^[1];低温木聚糖酶也有自己的优势,例如,低温催化反应无需加热而节省能源、防止底物因为高温而发生不希望的化学转化、可以方便地通过高温而终止酶促反应等^[15]。Xyn14237 木聚糖酶的最适温度为 40 °C,这一点与已经报道的低温酶的非常一致^[15]。Xyn14237 在室温条件下可以维持超过 60% 的最大酶活力以及其具有非常明显的热不稳定性这两点也符合经典的低温酶的特征(图 4)^[15]。在 pH 适应性方面,Xyn14237 在酸性条件下,pH 5~7 的区间里,保持 60% 以上的最大酶活力;在 pH 稳定性方面,Xyn14237 在酸性条件下,pH 5~7 的区间里,保持 90% 以上的最大酶活力(图 4)。Xyn14237 的 pH 特征和其温度特征提示其非常适合于在酸性低温条件下发挥功能。如此的使用场景可见于面团发酵,通过木聚糖酶提高面团发酵的体积。实验结果显示多种金属离子、蛋白质变性剂以及有机溶剂对 Xyn14237 的催化活力有所抑制(图 5)。但是在食品加工过程中,这些金属离子或者有机溶剂是很少存在的。金属离子和有机溶剂的测试结果通常用于评估木聚糖酶在印刷品脱墨以及造纸工业中的应用,这些工艺过程中往往存在大量的金属离子或者有机溶剂。

在酶促动力学参数上,低温酶往往也较中温酶和高温酶显示出不同的特征。例如,低温酶通常表现出较高的 K_m 值^[17]。Xyn14237 的 K_m 值大于 3 mg/mL,这个数值大于多数高温木聚糖^[18]。由于酶促反应温度较低,低温酶往往在催化活力上较中温酶和高温酶低^[12]。但是 Xyn14237 的 k_{cat} 值为 975.98 s⁻¹,高于大部分报道的 GH10 木聚糖酶^[12]。由此可见,Xyn14237 是一种具有较高催化效率的木聚糖酶。这一特征进一步提高了 Xyn14237 在生物工程应用中的潜力。

目前,三维结构模拟已经成为深入分析酶分子结构与功能关系的重要方法。Xyn14237 在总体结构上保持 GH10 家族木聚糖酶的桶状结构(图 7)。具体到与底物结合的沟槽中,通过三维结构重叠分析可以看出,Xyn14237 的 -3 位点存在一个较大的变化。一个芳香族氨基酸(Tyr174)取代常规的天冬酰胺占据 -3 位点的底部(图 7)。这一变化很可能改变酶分子在 -3 位点结合的空间构象。我们之前的研究发现,木聚糖酶底物结合沟槽中的芳香族氨基酸倾向于与底物木糖糖环的平面形成疏水性的 π - π 相互作用^[19,20]。因此,可以推测 Xyn14237 采用一种不常规的 -3 位点结合方式,而这种结合方式很可能增强 Xyn14237 与底物在非还原端的结合力。

5 结论

随着工业生产,尤其是食品加工过程中对绿色催化剂需求的增加,发掘新型酶分子已成为当下研究的热点。我们在海洋微生物基因组中找到一种与报道的木聚糖酶序列相似的很低的木聚糖酶 Xyn14237,并实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。木聚糖酶活性实验显示 Xyn14237 属于一种高效的低温酸性木聚糖酶。Xyn14237 的酶学性质适用于食品加工,特别是在面团发酵。

参考文献:

- [1] Basit A, Liu J, Rahim K, et al. Thermophilic xylanases; from bench to bottle [J]. Crit Rev Biotechnol, 2018, 38(7): 989-1002.
- [2] Moreira L R, Filho E X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(12): 5205-5214.
- [3] Ramalingam A. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review [J]. Journal of Experimental Sciences, 2010, 1: 1-11.
- [4] Chapla D, Patel H, Madamwar D, et al. Assessment of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. ASCD2 for application in prebleaching of eucalyptus kraft pulp [J]. Waste Biomass Valor, 2012, 3: 269-274.
- [5] Dhiman S S, Garg G, Sharma J, et al. Reduction in acute ecotoxicity of paper mill effluent by sequential application of xylanase and laccase [J]. PLoS One, 2014, 9: 1-13.
- [6] Harris A D, Ramalingam C, Xylanases and its

- application in food industry:a review [J]. J Exp Sci,2010,1:1-11
- [7] Butt M S,Tahir-Nadeem M,Ahmad Z,et al. Xylanases and their applications in baking industry [J]. Food Technol. Biotechnol,2008,46:22-31.
- [8] Polizeli M,Rizzatti A,Monti R,et al. Xylanases from fungi:properties and industrial applications [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol,2005,67:577-591.
- [9] Chakdar H,Kumar M,Pandiyan K,et al. Bacterial xylanases:biology to biotechnology [J]. 3 Biotech,2016,6(2):150.
- [10] Nordberg Karlsson E, Schmitz E, Linares-Pastén JA, et al. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol,2018,102(21):9081-9088.
- [11] Ahmed S,Riaz S,Jamil A,Molecular cloning of fungal xylanases:an overview [J]. Appl Microbiol. Biotechnol,2009,84:19-35.
- [12] Han Z,Shang-Guan F,Yang J,Characterization of a novel cold-active xylanase from *Luteimonas* species [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2018,34(8):123.
- [13] Han Z,Shang-Guan F,Yang J,Molecular and biochemical characterization of a bimodular xylanase from *Marinifilaceae* bacterium strain SPP2 [J]. Front. Microbiol,2019,10:1507.
- [14] Zhang C,Kim S K. Research and application of marine microbial enzymes:Status and prospects [J]. Marine Drugs,2010,8(6):1920-1934.
- [15] Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, et al. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes [J]. Front. Microbiol,2016,7:1408.
- [16] Bjerga GEK,Lale R,Williamson AK,Engineering low temperature expression systems for heterologous production of cold-adapted enzymes [J]. Bioengineered,2016,7:33-38.
- [17] Georlette D,Blaise V,Collins T,et al. Some like it cold:biocatalysis at low temperatures [J]. FEMS Microbiol Rev,2004,28:25-42.
- [18] Basit A,Liu J,Rahim K,et al. () Thermophilic xylanases:from bench to bottle [J]. Crit. Rev. Biotechnol,2018,17:1-14.
- [19] Yang J, Han Z. Understanding the positional binding and substrate interaction of a highly thermostable GH10 xylanase from *Thermotoga maritima* by molecular docking [J]. Biomolecules,2018,8(3):64.
- [20] Yang J, Ma T, Shang-Guan F, et al. Improving the catalytic activity of thermostable xylanase from *Thermotoga maritima* via mutagenesis of non-catalytic residues at glycone subsites [J]. Enzyme Microb Technol,2020,139:109579.