

# 纤维微菌 XM-8 木聚糖酶基因克隆及酶学性质 \* Gene Cloning and Enzymology Characteristics Analysis of a Xylanase Gene from *Cellulosimicrobium* XM-8

刘恒嘉<sup>1,2</sup>, 蔺小娅<sup>1,2</sup>, 罗春雷<sup>1,2</sup>, 杜丽琴<sup>1,2</sup>, 韦宇拓<sup>1,2\*\*</sup>

LIU Hengjia<sup>1,2</sup>, LIN Xiaoya<sup>1,2</sup>, LUO Chunlei<sup>1,2</sup>, DU Liqin<sup>1,2</sup>, WEI Yutuo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 亚热带农业资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004)

(1. College of Life Science & Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**【目的】为获得可应用于木聚糖水解的酶资源, 希望通过筛选分离得到能够水解木聚糖的木聚糖酶产生菌, 克隆表达木聚糖酶基因并研究其酶学性质。【方法】从环境中筛选分离出可水解木聚糖的菌株, 利用 16S rDNA 对其进行分子鉴定。扩增其木聚糖酶基因, 以 pET22b(+) 为表达载体, 构建共表达重组质粒, 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行异源表达, 并对重组酶进行酶学性质研究。【结果】经 16S rDNA 鉴定该菌株为纤维微菌。通过 PCR 成功克隆到该菌的木聚糖酶基因(*xyn-8a*), 并构建共表达质粒 pET22b-*xyn-8a*, 实现木聚糖酶 Xyn-8a 的活性表达。酶学性质研究表明 Xyn-8a 最适反应温度为 60℃, 最适反应 pH 值为 6.0, 只对木聚糖底物有活性; HPLC 分析其水解产物以木二糖为主, 还有少量的木糖和木三糖。【结论】XYN-8A 在 pH 值为 6 的条件下具有较高活力, 且可以催化水解反应, 在生产低聚木糖方面具有一定的应用价值。

**关键词:**纤维微菌 木聚糖酶 共表达 水解

**中图分类号:**Q78, TQ9251.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2017)01-0106-06

**Abstract:**【Objective】In order to obtain the enzyme resources which can be applied to the hydrolysis of xylan, xylanase producing strains are isolated and purified by screening, and the xylanase gene is cloned and characterized in this study. 【Methods】The hydrolyzable xylan are isolated from the environment and molecular identified by 16S rDNA. The xylanase gene is amplified and co-expressed with pET22b(+) vector. The recombinant plasmid is transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for heterologous expression and the enzymatic properties of the recombinant enzyme are studied. 【Results】The strain is identified as the genus of *Cellulosimicrobium* by 16S rDNA sequence. And the xylanase gene (*xyn-8a*) is cloned. The coexpression recombinant plasmid of pET22b-*xyn-8a* is successfully constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The maximum activity of Xyn-8a is obtained at 60℃, pH 6.0. It

is only active on xylan substrates. Through HPLC analyzing its hydrolyzate is dominated by xylobiose, it also contains a small amount of xylose and xylotriose. 【Conclusion】Xyn-8a has higher activity in pH 6, and can catalyze hydrolysis reaction. It has a certain application value in the production of xylo-oligosaccharides.

**Key words:** *Cellulosimicrobium*, xylanase, coexpression, hydrolase

收稿日期:2017-01-09

修回日期:2017-02-18

作者简介:刘恒嘉(1990-),男,硕士研究生,主要从事酶工程研究。

\* 国家自然科学基金项目(31460437)资助。

\*\* 通信作者:韦宇拓(1971-),男,教授,主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

## 0 引言

**【研究意义】**木聚糖是由木糖通过木糖苷键将多个吡喃木糖基相连而成,主要可分为 $\beta$ -1,4-木聚糖和 $\beta$ -1,3-木聚糖<sup>[1-2]</sup>。内切木聚糖酶是目前研究较多、应用较广泛的木聚糖降解酶,在食品、造纸、饲料、酶法生产功能性低聚木糖工业等方面都起到重要的作用<sup>[3-5]</sup>。但是当前大多数木聚糖酶仍很难满足工业上的要求,因此对新的木聚糖酶基因资源的挖掘,对已有的酶在分子水平上进行改造,以满足工业上对不同性质酶的需求仍然是目前的研究热点。**【前人研究进展】**纤维微菌属是一类具有分解木质纤维素特性的放线菌。纤维微菌属(*Cellulosimicrobium* sp.)在国外研究得比较多,但在国内还未见报道。OH Hyun-Woo 等<sup>[6]</sup>报道从 *Cellulosimicrobium* sp. HY-12 中纯化到大小为 39 kDa、无纤维素酶活性的木聚糖酶,并测定相应的酶学性质。Kim Do Young 等<sup>[7-8]</sup>报道从 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 中纯化到大小为 36 kDa、无纤维素酶活性的木聚糖酶,同时还克隆到 glycoside hydrolase (GH) family 6 enzymes 的木聚糖酶,其对 *p*-nitrophenyl(PNP) cellobioside 的转移酶活力达到 788.3 IU/mg; Kamble 等<sup>[9]</sup>报道从 *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 中纯化到大小为 78 kDa、无纤维素酶活性的木聚糖酶,并测定其酶学性质。**【本研究切入点】**从环境中筛选出可水解木聚糖的酶资源,研究酶的基本性质,降低酶的生产成本,提高酶的转化效率。**【拟解决的关键问题】**以木聚糖为底物,从土壤中筛选出对木聚糖具有较高水解能力的野生菌,克隆其木聚糖基因并实现异源表达,再深入研究其酶学性质。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

样品:从广西大学附近较多秸秆腐烂的地方采取土样,除去地表的覆盖土层,在地表下 5~20 cm 处取样。

菌株和载体: *Escherichia coli* BL21(DE3)、*E. coli* Trans10、pMD19-T、pET22b(+).

酶和试剂:限制性内切酶和 PCR 扩增聚合酶购自大连 TaKaRa 公司,T4 DNA 连接酶购自 Toyobo 公司;质粒提取试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒以及 PCR 产物纯化试剂盒购自 Bio Flux 公司;IPTG 和 X-gal 购自 Gibco 公司;三硬脂酸甘油酯购自 TCI 公司;对硝基苯酚及对硝基苯酚酯底物购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

广西科学 2017 年 2 月 第 24 卷第 1 期

### 1.2 培养基

筛选培养基(W/V):酵母粉 1%,20%马铃薯汁 10%,木聚糖 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,NaCl 0.05%,明胶 0.2%,琼脂 1.5%。

发酵培养基(W/V):酵母粉 1%,20%马铃薯汁 10%,木聚糖 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,NaCl 0.05%。

种子培养基:胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,酵母提取物 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值为 7.0,121℃ 高温灭菌 20 min。

液体发酵培养基:蛋白胨 3 g,酵母粉 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,木聚糖 10 g,加蒸馏水至 1 000 mL,121℃ 高温灭菌 20 min。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 产木聚糖酶菌株的筛选

取 10 mL 土壤稀释液加入装有 40 mL 富集培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30℃,200 r/min 摇床振荡培养 48 h。取培养 48 h 的富集液 10 mL 转入新鲜的富集培养基中,于 30℃,200 r/min 摇床振荡培养 48 h。再经木聚糖平板进行复筛,选取水解圈较大的菌落进行摇瓶培养,最终选取酶活力较高的菌株进行研究。

#### 1.3.2 野生菌株 16S rDNA 鉴定

以筛选出的野生菌总 DNA(DNA 提取方法参考文献[10])为模板,利用 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增反应,扩增产物连接 pMD19-T 载体后送测序,将测序获得的 16S rDNA 序列进行 blastn 分析。

#### 1.3.3 木聚糖酶 *xyn-8a* 基因的克隆

通过序列比对获得该酶保守区,并设计简并引物,扩增木聚糖酶基因 *xyn-8a* 中的部分序列。最终获得一段 310 bp 的 DNA 序列,NCBI 网站 blastn 结果为内切木聚糖酶的部分序列。反向 PCR 测序结果拼接后 NCBI 比对结果表明该序列为内切木聚糖酶部分序列,在 3' 端缺少部分序列,继续以扩增获得的序列设计引物进行反向 PCR 最终获得完整编码的木聚糖酶基因。

#### 1.3.4 木聚糖酶基因 *xyn-8a* 的构建

在 Signal P 4.1 Server 网站进行信号肽分析及在 SMART 网站上进行结构域分析,去掉信号肽,设计 *xyn-8a* 表达引物同时引入 *Nco* I 和 *Eco* R I 酶切位点以及加入 6 组氨酸标签。引物序列如下:

xy1p-6F:5'-CATGCCATGGATCACCATCAT-

CATCATCATGCCGGCTCCACCCCTCGAGGC-3';

xylp-4R: 5'-CCGGAATTCTCAGGCCGAG-CAGGTGGCCGTC-3'.

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切载体和外源片段,试剂盒回收载体酶切产物及外源片段酶切产物。用 T4 连接酶将基因 *xyn-8a* 与表达载体连接过夜,将连接产物转化克隆宿主 *E. coli* Trans10 感受态细胞,涂布含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄霉素的 LB 平板上,筛选并鉴定长出的单菌落。提取质粒酶切验证,并进行 DNA 序列测定。

### 1.3.5 木聚糖酶基因 *xyn-8a* 的表达

将构建成功的重组质粒 pET-*xyn-8a* 在 *E. coli* BL21(DE3)中进行诱导表达中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至  $OD_{600}$  为 0.4~0.6 时,加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 诱导 8 h。SDS-PAGE 分析其表达产物并进行后续的酶学性质测定。

### 1.3.6 木聚糖酶活力的测定

木聚糖酶水解产生的木糖等还原糖能将碱性条件下的 3,5-二硝基水杨酸还原,呈棕红色,于 540 nm 波长处有最大光吸收,在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色深度呈线性关系,利用比色波长法测定其还原糖生成的量就可测定木聚糖酶的活力。在 80  $\mu\text{L}$  含有 1% (W/V) Beechwood 木聚糖缓冲液中加入 20  $\mu\text{L}$  适当稀释的酶液,在适当温度条件下反应 10 min,然后加入 400  $\mu\text{L}$  的 DNS 溶液终止反应,反应结束后沸水浴 5 min,迅速冷却,取 200  $\mu\text{L}$  反应液于 96 孔板中在 540 nm 波长下测定吸光度值,每组 3 个重复,计算木聚糖酶活力 (IU/mL)。酶活力单位 (IU) 定义:在最适条件下,每分钟水解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  木糖所需的酶用量。比酶活定义:每毫克蛋白质所含的酶活力 (IU/mg)。

### 1.3.7 酶学性质的研究

#### (1) pH 值对酶活力的影响

取稀释的酶液,以 1% (W/V) 的 Beechwood 木聚糖为底物,在 40 $^{\circ}\text{C}$  测定不同 pH 值的缓冲液<sup>[11]</sup> (柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液:pH 值 2.0~7.5; Tris-HCl 缓冲液:pH 值 7.5~8.5; 甘氨酸-NaOH 缓冲液:pH 值 8.5~10) 对木聚糖酶酶活力的影响,以最高酶活力为 100%,绘制 pH 值-相对活力曲线。

#### (2) 温度对酶活力的影响

取稀释的酶液,以 1% (W/V) 的 Beechwood 木聚糖为底物,在最适 pH 值的条件下,于不同温度下测定木聚糖酶的酶活力,以最高酶活力为 100%,绘

制温度-相对活力曲线。

#### (3) pH 值耐受性的测定

用 pH 值 2.5~10 的缓冲液稀释纯酶,于 4 $^{\circ}\text{C}$  处理 24 h,在最适条件下以 1% (W/V) 的 Beechwood 木聚糖为底物测定残余活力,以未经处理的酶活力为 100%,绘制 pH 稳定性曲线。

#### (4) 温度耐受性的测定

将纯化后的酶液经稀释后分别置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$  恒温处理,隔一段时间取出酶液,在各自的最适条件下测其酶活力。以未经处理的酶液酶活力作为 100%,绘制温度稳定性曲线。

#### (5) 木聚糖酶的底物特异性

以 1% (W/V) 的山毛榉木木聚糖 (Beechwood xylan)、甘蔗渣木聚糖 (Bagasse xylan)、羧甲基纤维素钠 (Carboxymethylcellulose)、淀粉 (Soluble starch) 及结晶纤维素 (Avicel) 为底物,在最适条件下测定酶活力。

#### (6) 螯合剂、表面活性剂、还原剂和金属离子对酶的影响

在最适条件下,取经过稀释的纯酶与终浓度为 5 mmol/L 的金属离子  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  以及终浓度为 5 mmol/L 的金属离子螯合剂 EDTA、离子表面活性剂 SDS 和还原剂 DTT、 $\beta$ -巯基乙醇进行反应,测定它们对酶活力的影响,以不添加影响因子的酶活力为 100%,计算各种试剂对酶的相对酶活。

#### (7) 以 Beechwood 木聚糖或甘蔗渣木聚糖为底物时 $K_m$ 值和 $V_{\max}$ 值的测定

在最适条件下,以 Beechwood 木聚糖或甘蔗渣木聚糖为底物,在不同底物浓度下测定木聚糖酶比活力。用 GraphPad Prism 5 软件进行分析。

#### (8) 木聚糖水解产物的鉴定与分析

以木糖 xylose (X1),木二糖 xylobiose (X2),木三糖 xylotriose (X3) 为标准样,测定木聚糖水解产物 (以 1% (W/V) Beechwood 木聚糖和甘蔗渣木聚糖为底物,加入纯化的木聚糖酶在 40 $^{\circ}\text{C}$  作用 24 h;然后将反应物沸水中煮沸 10 min 终止反应,室温冷却,12 000 r/min 离心 20 min)。使用安捷伦 1100 色谱仪进行 HPLC 分析,检测器为 Alltech 200ES 型蒸发光散色。色谱条件:色谱柱为 Alltima Amino 氨基柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈:水 (75 : 25); 流速为 1 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 产木聚糖酶菌株的筛选

通过稀释平板法获得有透明圈的菌株 23 株,在以木聚糖为唯一碳源的筛选培养基上反复划线纯化,挑取生长良好且具有明显透明圈的菌株 5 株。进一步通过液体发酵复筛获得一株木聚糖酶产量相对较高的菌株,命名为 XM-8。

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Cellulosimicrobium sp. BD-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2573	2573	98%	0.0	99%	<a href="#">GU085227.1</a>
<a href="#">Cellulosimicrobium funkei strain R6-417 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2569	2569	98%	0.0	99%	<a href="#">JQ659848.1</a>
<a href="#">Cellulosimicrobium sp. TUT1222 gene for 16S rRNA, partial sequence</a>	2569	2569	98%	0.0	99%	<a href="#">AB188217.1</a>

图 1 16S rDNA 序列比对结果

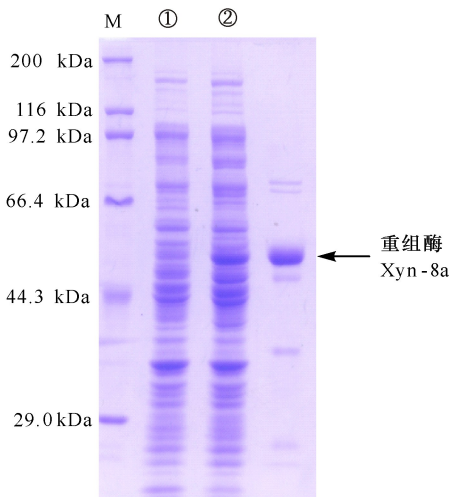
Fig. 1 NCBI alignments results of 16S rDNA sequencing

### 2.3 木聚糖酶基因 *xyn-8a* 的克隆

通过序列比对获得该酶保守区,并设计简并引物,扩增木聚糖酶基因 *xyn-8a* 中的部分序列,获得一段 310 bp 的 DNA 序列,NCBI 网站 blastn 结果为内切木聚糖酶的部分序列。继续以扩增获得的序列设计引物进行反向 PCR 获得 *xyn-8a* 的完整 ORF 序列。

### 2.4 重组木聚糖酶的表达纯化

将目的基因与表达载体连接构建 Xyn-8a 重组表达质粒,并导入大肠杆菌表达经镍柱亲和层析纯化后。SDS-PAGE 电泳表明纯化的重组蛋白为较为单一的蛋白质条带(图 2),纯度可以满足下一步酶学性质的研究分析。



M 为蛋白质 marker,①为未诱导菌株,②为诱导菌株

M: marker, ①Uninduced strains, ②Induced strain

图 2 纯化后重组酶 Xyn-8a 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 Analysis of SDS-PAGE to the purified recombinant xylanase Xyn-8a

### 2.2 菌株的鉴定

将获得菌株 XM-8 的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 中比对,结果显示与原小单胞菌科的 *Cellulosimicrobium* sp. 有最高的相似性为 99%(图 1),结合菌株 XM-8 的形态特征(菌落生长呈圆形,表面隆起,光滑湿润,呈黄色且不透明),将该菌株初步鉴定为 *Cellulosimicrobium* sp.。

### 2.5 重组酶 Xyn-8a 的酶学性质

#### 2.5.1 pH 值对 Xyn-8a 酶活力的影响

如图 3 所示,在 pH 值为 6.0 时酶的活力最高,随着 pH 值的增加酶活力逐渐减少,在 pH 值为 8 时,重组酶 Xyn-8a 只保留 30% 以下的酶活力。而酶在 pH 值为 5.5 到 7.0 时能保持 70% 以上的相对酶活力,表明重组酶 Xyn-8a 是一种弱酸性酶。

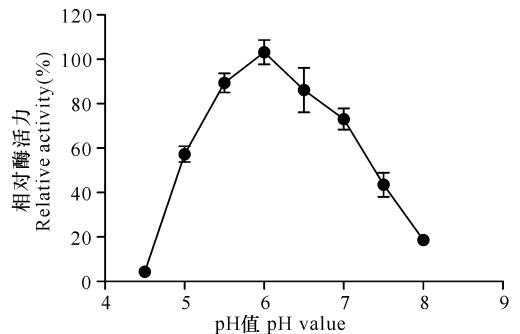


图 3 pH 值对木聚糖酶 Xyn-8a 酶活力的影响

Fig. 3 Effects of pH on the  $\beta$ -1-4-xylanase activity of Xyn-8a

#### 2.5.2 温度对 Xyn-8a 酶活力的影响

温度对于酶活的影响很大。木聚糖酶 Xyn-8a 的活性在温度为 60℃ 时达到最大值,当温度超过 65℃ 时,酶活力急剧下降,到 75℃ 时酶完全失活(图 4)。另外,从图 4 中可以看出在 45~65℃ 时,Xyn-8a 酶的相对活性能保持在 60% 以上,说明该酶具有良好的工业应用潜力。

#### 2.5.3 Xyn-8a 的 pH 稳定性

Xyn-8a 酶在 pH 值 4~10、4℃ 条件下放置 24 h 仍有 60% 以上的相对活力,而在 pH 值 7.5~10 时相对活力保持在 100% 以上,表明 Xyn-8a 在偏碱性条

件下更稳定,并且相对活性有所增加(图5),这对于 Xyn-8a 酶的保存十分有利。

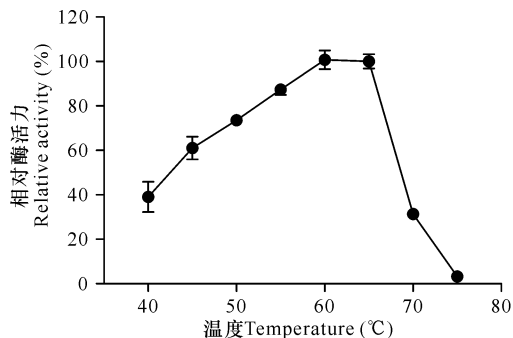


图4 温度对 Xyn-8a 的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the  $\beta$ -1-4-xylanase activity of Xyn-8a

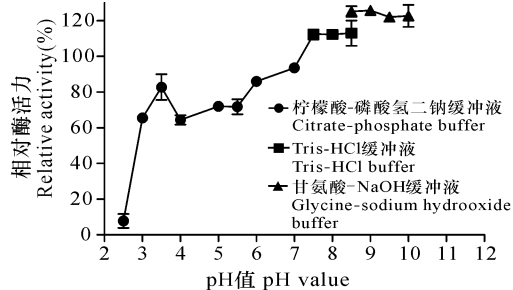


图5 Xyn-8a 的 pH 稳定性

Fig. 5 pH stability of Xyn-8a xylanase

#### 2.5.4 Xyn-8a 的温度稳定性

如图6所示, Xyn-8a 具有较好的温度稳定性,在40°C以下保存时几乎不损失活性,55°C处理8h后仍有50%的酶活力;当温度达到60°C时, Xyn-8a 酶的稳定性急剧下降,这意味着在 Xyn-8a 酶最适反应温度条件下(60°C),反应不能持续太久。

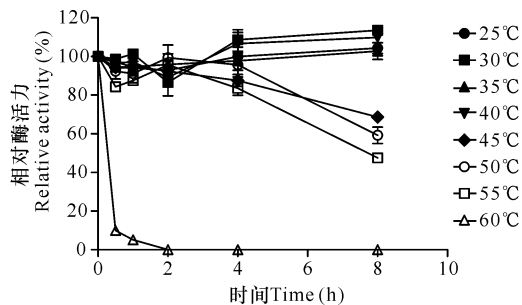


图6 木聚糖酶 Xyn-8a 的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of Xyn-8a xylanase

#### 2.5.5 木聚糖酶 Xyn-8a 的底物特异性

如表1所示,来自纤维微菌 XM-8 的 Xyn-8a 酶对木聚糖底物表现出很高的活性,而对其它底物如羧甲基纤维素等则不表现出活性,表明该重组酶为专一的木聚糖酶。因此在木聚糖底物纯度不高的情况下,使用 Xyn-8a 酶也能得到较高纯度的反应产物。

#### 2.5.6 金属离子和化学试剂对 Xyn-8a 酶活的影响

在最适条件下,测定金属离子和化学试剂对酶活

力的影响。如表2所示,5 mmol/L 的  $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对重组木聚糖酶 Xyn-8a 有较强的抑制作用,  $Fe^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  有轻微的抑制作用,而  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  则对酶有轻微的激活作用,由此可知在一般情况下重金属离子对 Xyn-8a 的酶活力有抑制作用。化学试剂 SDS 对酶影响显著,几乎造成酶完全失活。  $Na_2EDTA$  对酶有轻微抑制,表明 Xyn-8a 酶的活性不完全依赖于金属离子的激活。 $\beta$ -巯基乙醇的影响则不明显。

表1 Xyn-8a 底物特异性的分析

Table 1 Substrate specificity of the Xyn-8a

Substrate	Specific activity of Xyn-8a (IU · mg <sup>-1</sup> )
Beechwood xylan	589.55 ± 23.77
Bagasse xylan	585.27 ± 25.20
Carboxymethylcellulose	ND
Soluble starch	ND
Avicel	ND
Casein	ND
pNPO	ND

Note: ND means not detected

表2 5 mmol/L 金属离子和化学试剂对 Xyn-8a 酶活力的影响

Table 2 Effects of 5 mmol/L metal ions and chemical reagent on the enzyme activity of Xyn-8a

Agents	Relative activity (%)
Control	100.00 ± 4.83
$MnCl_2$	56.50 ± 2.00
$PbAc_2$	69.66 ± 1.13
$MgCl_2$	99.09 ± 5.26
$MgSO_2$	103.44 ± 2.05
$CuCl_2$	24.27 ± 1.44
$FeCl_2$	74.87 ± 3.80
$CoCl_2$	87.92 ± 2.06
$CaCl_2$	107.30 ± 5.07
$BaCl_2$	109.56 ± 4.40
$NiCl_2$	108.27 ± 8.13
$ZnSO_4$	106.23 ± 1.22
EDTA-Na	91.49 ± 4.56
$\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol)	100.20 ± 0.97
DTT	102.82 ± 9.04
SDS	1.29 ± 2.30

#### 2.5.7 以 Beechwood 木聚糖或甘蔗渣木聚糖为底物时重组酶的 $K_m$ 和 $V_{max}$ 测定

在最适条件下,以 Beechwood 木聚糖或甘蔗渣木聚糖为可溶性底物,在不同浓度下测定木聚糖酶比活力。用 GraphPad Prism 5 软件进行分析,如图7所示。 Xyn-8a 以 Beechwood 木聚糖为可溶性底物时的  $K_m$  (mg/mL) 值为 3.48,  $V_{max}$  ( $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ ) 值为 791.13,  $K_{cat}/K_m$  ( $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ) 值为

30 177.25;以甘蔗渣木聚糖为可溶性底物时的  $K_m$  (mg/mL)值为 5.52,  $V_{max}$  ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )值为 1 122.08,  $K_{cat}/K_m$  ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )值为 26 982.46。

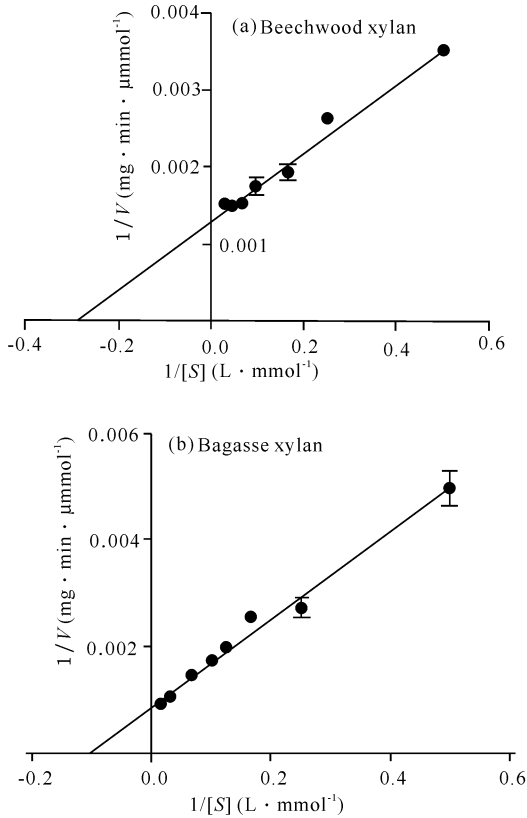


图7 以 Beechwood 木聚糖或甘蔗渣木聚糖为底物时 Xyn-8a 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 7 The Lineweaver-Burk of the recombinant Xyn-8a for Beechwood xylan or bagasse xylan

### 2.5.8 水解产物的分析

如图 8 所示,以 Beechwood 木聚糖和蔗渣木聚糖为底物,充分反应后使用 HPLC 法检测所生成的产物,结果显示反应产物均以木二糖为主(71.07%),还存在少量的木糖(7.78%)及木三糖(21.15%)。

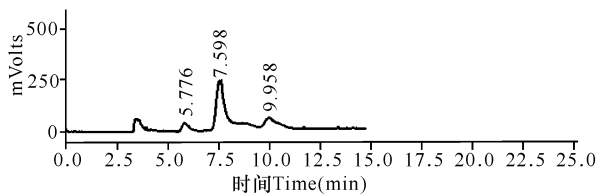


图8 Xyn-8a 水解木聚糖产物的 HPLC 图谱

Fig. 8 HPLC chromatograms analysis of hydrolysis products on xylan hydrolyzed by Xyn-8a

## 3 结论

木聚糖酶在自然界中有广泛的分布,许多微生物如真菌、细菌、放线菌等都能合成木聚糖酶<sup>[12]</sup>。内切

木聚糖酶作用于由  $\beta$ -1,4-糖苷键相连的  $\beta$ -D-吡喃木糖主链,产生长度不同的低聚木糖和少量木糖<sup>[13]</sup>,为降解木聚糖关键酶,而木糖苷酶主要作用于这些低聚木糖释放出木糖<sup>[14]</sup>。本研究从土壤中筛选到一株纤维微菌属产木聚糖酶菌株,酶学性质研究表明 Xyn-8a 的最适 pH 值为 6.0,在 pH 值 3.5~10.0 时具有良好的稳定性;最适温度为 60℃,具有较好的温度稳定性,在 50℃处理 8 h 仍具有 50%的酶活力。底物特异性单一,水解产物以木二糖为主,还含有少量的木三糖及木糖。这些性质表明木聚糖酶 Xyn-8a 在生物催化水解领域具有潜在的应用价值,可在造纸工业、生产功能性低聚木糖及促进动物肠道健康的饲料行业发挥重要的作用。

### 参考文献:

- [1] CHEN W P, MATSUO M, YASUI T.  $\beta$ -1,3-Xylanase and  $\beta$ -1,4-xylanase action on rhodymenan[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(5): 1195-1200.
- [2] OKAZAKI F, SHIRAKI K, TAMARU Y, et al. The first thermodynamic characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium[J]. The Protein Journal, 2005, 24(7/8): 413-421.
- [3] 石军, 陈安国. 木聚糖酶生产与应用研究进展[J]. 饲料工业, 2001, 22(9): 40-43.  
SHI J, CHEN A G. Progress in production and application of xylanase[J]. Feed Industry, 2001, 22(9): 40-43.
- [4] 吴香波, 谢益民. 木聚糖酶在制浆造纸工业中的应用和研究进展[J]. 华东纸业, 2008, 39(5): 6-9.  
WU X B, XIE Y M. Progress in research and application of xylanases in the pulping and paper industry [J]. Shanghai Paper Making, 2008, 39(5): 6-9.
- [5] 杨禄良. 木聚糖酶在饲料工业中的应用[C]//第四届中国动物营养与保健品国际研讨会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学学会, 2006.  
YANG L L. Application of xylanase in feed industry [C]//Fourth International Symposium on animal nutrition and health products in China. Beijing: China Animal Husbandry and Veterinary Institute, 2006.
- [6] OH H W, HEO S Y, KIM D Y, et al. Biochemical characterization and sequence analysis of a xylanase produced by an exo-symbiotic bacterium of *Gryllotalpa orientalis*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-12 [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2008, 93(4): 437-442.
- [7] KIM D Y, MI K H, LEE J S, et al. Isolation and characterization of a cellulase-free endo- $\beta$ -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(9): 1055-1059.

(下转第 119 页 Continue on page 119)

tory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. Journal of Biotechnology, 1992, 23(3): 257-270.

[25] POUTANEN K, PULS J. Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 28(4/5): 425-432.

[26] KALLEL F, DRISS D, CHAARI F, et al. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 5: 1-10.

[27] 陈红歌, 朱静, 梁改芹, 等. 酸性木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件 [J]. 微生物学报, 1999, 39(4): 350-354.  
CHEN H G, ZHU J, LIANG G Q, et al. Screening of acidic xylanase producing strain and studies on its enzyme production conditions [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(4): 350-354.

[28] 王金华. 黑曲霉酸性木聚糖酶基因在毕赤酵母中的高

效表达及其表达产物性质及应用特性研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2003.

WANG J H. Cloning and overexpression of gene encoding acidic endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from *Aspergillus niger* (N402) in *Pichia pastoris* and analysis of properties of the recombinant xylanase [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2003.

[29] FREDERICK M M, KIANG C, FREDERICK J R, et al. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27(4): 525-532.

[30] TENKANEN H, PULS J, POUTANEN K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1992, 14(7): 566-574.

(责任编辑: 米慧芝)

(上接第 111 页 Continue from page 111)

[8] KIM D Y, HAM S J, KIM H J, et al. Novel modular endo- $\beta$ -1, 4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes [J]. Bioresource Technology, 2012, 107: 25-32.

[9] KAMBLE R D, JADHAV A R. Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(3): S1790-S1797.

[10] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法 [J]. 生物技术, 2007, 17(1): 39-41.  
JIANG S M, ZHANG L, DAI S K, et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from actinobacteria [J]. Biotechnology, 2007, 17(1): 39-41.

[11] ÖSTLING S, VIRTAMA P. A modified preparation of the universal buffer described by teorell and stenhagen

[J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1946, 11(4): 289-293.

[12] 孙超, 陈卫平. 微生物木聚糖酶及其应用研究进展 [J]. 中国酿造, 2013, 32(4): 24-29.  
SUN C, CHEN W P. Research progress in microorganism xylanase and its application [J]. China Brewing, 2013, 32(4): 24-29.

[13] SIBTAIN A, SABA R, AMER J. Molecular cloning of fungal xylanases: An overview [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 19-35.

[14] KNOB A, TERRASAN C R F, CARMONA E C.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: An overview [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 26(3): 389-407.

(责任编辑: 米慧芝)