

俞洁琼, 王洪成, 何正文, 等. 红色亚栖热菌耐热木聚糖酶的克隆表达及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1242-1249.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.008

红色亚栖热菌耐热木聚糖酶的克隆表达及生物信息学分析

俞洁琼, 王洪成, 何正文, 乐易林, 邵蔚蓝

(江苏大学环境与安全工程学院/生物质能源研究所, 江苏 镇江 212013)

摘要: 从自主分离的 *Meiothermus ruber* 菌株的基因组中克隆到木聚糖酶基因, 并进行了超量表达、重组酶的纯化和酶学性质研究。结果表明, 重组木聚糖酶 *Mru* 是热稳定性酶, 最适反应温度为 65 °C, 能够有效降解木聚糖产生木糖和木二糖。生物信息学分析发现, 木聚糖酶 *Mru* 与数据库中来自亚栖热菌的木聚糖酶的同源性为 60%~100%。在木聚糖酶 *Mru* 的结构模型中, GH10 木聚糖酶的保守位点大多位于 β 折叠, α 螺旋保守性很低。本研究揭示, 木聚糖酶 *Mru* 代表一类新型热稳定性 GH10 木聚糖酶。

关键词: 红色亚栖热菌; 木聚糖酶; 生物信息学分析; 高温酶

中图分类号: S943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1242-08

Gene cloning, expression and bioinformatics analysis of a novel xylanase from *Meiothermus ruber*

YU Jie-qiong, WANG Hong-cheng, HE Zheng-wen, LE Yi-lin, SHAO Wei-lan

(Biofuels Institute/School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: This paper reports a novel GH10 xylanase produced by thermophilic bacterium *Meiothermus ruber*. The xylanase gene was cloned from the genomic DNA of a new isolate of *M. ruber*, and overexpressed in *Escherichia coli*, and recombinant *Mru* xylanase was purified and characterized. *Mru* xylanase efficiently released xylose from oat spelt xylan at 55–75 °C with the highest activity at 65 °C. The bioinformatics analysis indicated that *Mru* xylanase shared $\geq 61\%$ similarities with the xylanases of *Meiothermus* spp., but $\leq 49\%$ similarities with the other GH10 xylanases in database. The prediction of the *Mru* xylanase structure revealed that the conserved sequences for GH10 xylanases mainly occurred in the β -sheets and few identities were observed in α -helices. *Mru* xylanase represents a type of heat-stable GH10 xylanase.

Key words: *Meiothermus ruber*; xylanase; bioinformatics analysis; thermophilic enzyme

中国农作物秸秆资源极其丰富, 在 2009 年其总产量已达到 7×10^8 t, 其中主要是稻草和玉米秸秆, 分

别为 2.5×10^8 t 和 2.3×10^8 t。然而每年约占总量 13%~17% 的秸秆被焚烧处理, 这是造成近年来被高度关注的雾霾的直接原因之一。目前, 秸秆再利用的主要途径是秸秆还田和饲料化, 而由于秸秆的木质纤维素结构特点, 半纤维素与木质素通过酯键形成紧密的外围, 阻碍饲用禽畜体内消化酶与秸秆内部营养物质的接触, 影响禽畜的生长性能。木聚糖是半纤维素的主要成分, 自然界储量大, 在被子植物中约占总干

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170027, 31300088)

作者简介: 俞洁琼(1989-), 女, 江西上饶人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。

通讯作者: 邵蔚蓝, (Tel) 13913856528; (E-mail) weilanshao@foxmail.com

质量的15%~30%,同时也是秸秆等饲料的一个主要的抗营养因子^[1]。往秸秆饲料中投放能够降解木聚糖的酶类,降低食糜粘度,可以有效地减少或消除木聚糖的抗营养作用^[2-5]。秸秆木聚糖降解的传统方法是使用物理和化学处理,相对而言,酶制剂的使用具有反应高度特异性,反应条件温和,以及不会由于化学条件限制造成底物损耗以及环境问题等优势,因而受到越来越多的关注。同时木聚糖酶的投入还可以帮助实现秸秆在其他方面的清洁利用,如秸秆粗纤维造纸以及在食品行业中生产低聚木糖等。然而木聚糖酶活性在实际应用中受到各方面的影响,例如饲料生产过程的高温、动物肠道内环境温度等都会抑制其催化降解活性,因此供应的木聚糖酶不仅要具有很高的热稳定性,其分解木聚糖反应最适温度也要接近动物肠道内环境温度,这样才能减少损失和最大程度发挥它的催化作用。因此,适合实际应用的木聚糖酶的研究与开发工作仍然十分紧迫。

栖热菌是地热高温菌的代表,其产生的高温酶由于拥有良好的热稳定性通常被开发应用于科研和工业生产中。其中最为典型的是从水生栖热菌(*T. aquaticus*)中分离纯化而来的用于PCR反应的TaqDNA聚合酶^[6]。红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*)属于革兰氏阴性、无芽孢好热杆菌,形成红色菌落,生长温度为35~70℃,最适生长温度为60℃^[7]。亚栖热菌属中,除*M. taiwanensis*有较深入的研究外,其他菌研究很少。本实验室从云南腾冲热海温泉采集样品中筛选出1株能够降解结晶纤维素的嗜热菌株,经形态特征、理化性质和16S rDNA序列同源性分析鉴定为红色亚栖热菌,并命名为*Meiothermus ruber* TC-1^[8]。该菌株具有木聚糖酶活性,因此本研究主要通过设计引物从*M. ruber* TC-1中扩增出木聚糖酶基因,测定木聚糖酶的温度特性和降解产物,并对该酶进行生物信息学分析,为研发具有应用价值的木聚糖酶制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

红色亚栖热菌*Meiothermus ruber* TC-1(CICIM B7007)由本实验室分离和保存,*Escherichia coli* DH5 α 购自Novagen(Billerica, MA, USA)。蛋白酶K、*Ex-Taq* DNA聚合酶和*rTaq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、RNase、DNA Marker、Protein Marker、质粒小

量抽提试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),pHsh-T质粒来自Shine E Biotech(中国南京)。2种细菌的生长使用LB培养基,1 000 ml液体LB培养基中含蛋白胨(Trypton) 10 g,酵母粉(Yeast Extract) 5 g,NaCl 10 g,121℃高压灭菌20 min。液体LB培养基中添加1.5%琼脂制备固体LB培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌株木聚糖酶活性测定 取500 μ l实验室保存的红色亚栖热菌TC-1菌液,涂布于斜面筛选培养基(含1%木聚糖、3%琼脂的LB培养基),以不添加木聚糖的斜面培养基作对照,60℃恒温静置培养4 d,观察菌落生长状况。挑选具有透明圈的菌落进行液体发酵,取上清液测定酶活性。

1.2.2 引物的设计与合成 *M. ruber* TC-1基因组文库构建和测序工作由Beijing Genomics Institute完成。将*M. ruber* TC-1中木聚糖酶基因序列(GenBank accession no. JRG A01000001.1, GL000978)导入信号肽分析软件SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>),获知其融合一段含19个氨基酸的信号肽。根据去除信号肽的木聚糖酶基因序列设计引物:xyn-fw(5'-TTTGATGGGCCCAGCCCGGCCC-3'), xyn-rev(5'-CTCCGGTTGTTGTAAGGTGCGCTG-3')。引物由上海生物工程公司合成。

1.2.3 木聚糖酶基因(*Mru*)PCR扩增与克隆 根据碱裂解法提纯红色亚栖热菌TC-1基因组DNA,以其为模板,xyn-fw和xyn-rev为引物扩增去除信号肽的木聚糖酶基因片段,PCR反应程序为:95℃ 5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 60 s,30个循环;72℃ 5 min。扩增产物经胶回收试剂盒纯化回收后,连接到pHsh-T上,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(自制),涂布于含25 μ g/ml氯霉素的固体LB培养基中,30℃倒置培养,然后筛选单菌落进行PCR验证和送上海生物工程公司测序。

1.2.4 重组酶粗酶液制备及酶活力测定 挑取含有重组质粒pHsh-xyn的阳性转化子接入含25 μ g/ml氯霉素的3 ml LB培养液中,30℃振荡培养至OD₆₀₀达0.6~0.8后,立即转入42℃摇床继续培养6~10 h,培养结束后,以6 000 r/min离心2 min收集菌体,用2 ml无菌水重悬细胞,然后在冰水浴中用超声破碎仪破碎菌体,每个循环超声9 s,冷却5

s, 运行 2 min, 细胞破碎液经 10 000 r/min 离心 5 min 后, 所得上清液即为粗酶液。木聚糖酶活性的测定以 1% 燕麦木聚糖为底物, 方法为: 往 90 μ l 50 mmol/L pH 6.0 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液中加入 0.1 ml 底物和 10 μ l 酶液, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 反应完成后往体系中加入 600 μ l PAHBAH 溶液 [0.5 mol/L NaOH 和溶于 0.5 mol/L HCl 的 5% PAHBAH 储存液 4:1 (体积比)] 终止反应, 最后将混合物沸水浴 10 min, 冰水冷却后, 测定 410 nm 光吸收值。木聚糖酶活性单位定义为在上述试验条件下, 每分钟催化反应产生 1 μ mol 木糖的使用酶量。

1.2.5 木聚糖酶解产物分析

1.2.5.1 酶解液制备 用 50 mmol/L pH 6.0 缓冲液配制浓度为 0.5% 的燕麦木聚糖溶液, 取出 200 μ l 加入 50 μ l 木聚糖酶 (20 U/ml), 65 $^{\circ}$ C 保温 12 h。向酶解液中加入等体积无水乙醇沉淀未水解的大分子聚合物和酶蛋白, 10 000 g 离心 5 min 去除沉淀, 将上清液风干后再加入 100 μ l 无菌水重新溶解水解产物。

1.2.5.2 TLC 法测定酶解产物 薄层板购自 Merck 公司, 型号为 60 F254。展开剂为正丁醇: 乙酸: 水 = 2:1:1 (体积比), 显色剂为浓硫酸: 甲醇 = 2:8 (体积比) 和 100 mg 5-甲基-1,3-苯二酚。展开剂距离顶部 2 cm 时停止展层, 取出薄层板自然风干, 再均匀喷上显色剂, 于 85 $^{\circ}$ C 显色。

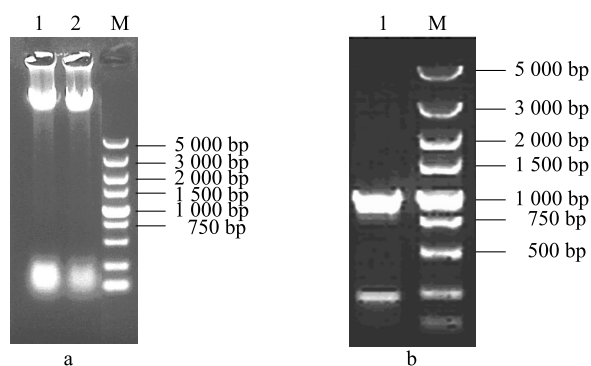
1.2.6 木聚糖酶 (*Mru*) 的生物信息学分析 一级结构分析: 保守区和蛋白家族分析预测采用在线 CCD 和 Pfam 程序 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 结合

BlastP, 氨基酸序列推测采用 <http://www.bio-software.net/sms/>, 信号肽分析使用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/> 服务器, 蛋白质理化性质分析预测采用 ProParam 服务器 <http://www.expasy.ch/tools/>, 将氨基酸序列输入 NCBI 进行在线 “tblastP” 同源性检索, 采用 MEGA5.05 构建系统进化树, 计算方法为邻位相连法 (Neighbor joining), 并运用自展内部分枝法 (Bootstrapping) 来评定进化树的置信度, 重复次数为 1 000。二级结构分析: 蛋白质二级结构的预测采用在线工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), 疏水性分析在线服务器 <http://web.expasy.org/protscale/>。同源建模: 蛋白质三级结构数据库 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; 蛋白质三级结构分析预测使用 Modeller 软件; 同源建模评价 <http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>。

2 结果

2.1 木聚糖酶基因 *Mru* 克隆

根据碱裂解提取基因组方法, 得到 *M. ruber* TC-1 基因组 DNA, 然后使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取结果 (图 1a)。以 *M. ruber* TC-1 的基因组 DNA 为模板, 用引物 xyn-fw 和 xyn-rev PCR 扩增 *M. ruber* TC-1 基因组中的木聚糖酶 DNA 片段, 得到约 950 bp 大小的片段, 与预期目的基因长度一致 (图 1b)。测序结果表明, 其开放阅读框的长度为 951 bp, 序列与红色亚栖热菌 DSM1279 木聚糖酶 (登录号为 WP_015586289.1) 一致性达 100%。



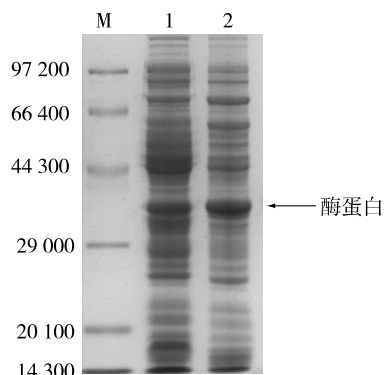
a: *Meiothermus ruber* TC-1 基因组 DNA; b: 木聚糖酶基因 PCR 扩增; 图 a 中 1、2 均为基因组 DNA; 图 b 中 1 为木聚糖酶 PCR 结果; M 为 DNA 分子标样。

图 1 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis

2.2 重组木聚糖酶的表达及温度特性

将空载质粒 pHsh 转化菌 *E. coli* DH5 α 和携带木聚糖酶基因的 pHsh-*xyn* 质粒转化菌 *E. coli* DH5 α 的表达结果用琼脂糖凝胶电泳对比分析,得出重组酶木聚糖酶蛋白大小约为36 000(图2)。在65℃下,磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浓度设定为50 mmol/L,pH 4.5~8.5,测得木聚糖酶最适反应pH为6.0。在pH为6.0的条件下,将反应体系分别以55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃保温10 min,酶活性测定结果如图3,由图3可知,木聚糖酶 *Mru* 最适反应温度为65℃,但在55~70℃范围内酶活性均很高,在75℃酶活性仍达最大酶活性的60%左右。在pH6.0、温度为65℃条件下,重组木聚糖酶粗酶液的比酶活性为20 U/ml。



M:蛋白质标样;1:对照;2:重组表达的木聚糖酶;

图2 SDS-PAGE 分析重组表达的木聚糖酶

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant xylanase

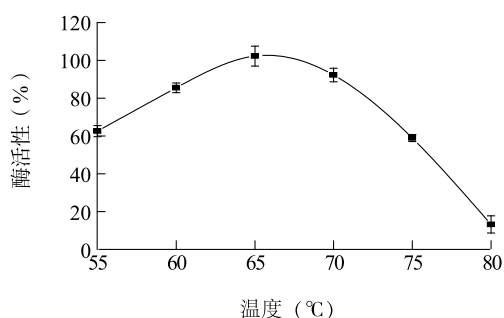


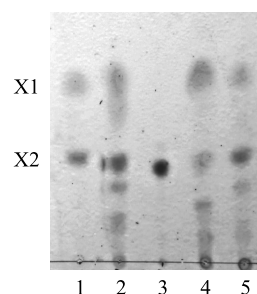
图3 温度对木聚糖酶 *Mru* 活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on *Mru* xylanase activity at pH6.0

2.3 木聚糖酶的水解产物

以燕麦木聚糖为底物,将木聚糖酶 *Mru* 的水解产物同其他已报道的1个第10家族来自 *Thermotoga maritima* 的木聚糖酶 *B*^[9]和2个第11家

族分别来自 *Bacillus pumilus* ARA^[10]和 *Thermomyces lanuginosus*^[11]的木聚糖酶的水解产物对比分析(图4)。木聚糖酶 *Mru* 和木聚糖酶 *B* 对燕麦木聚糖的水解产物主要是木糖和木二糖;*Bacillus pumilus* ARA 木聚糖酶对燕麦木聚糖的主要水解产物是木糖、木二糖和木三糖;*Thermomyces lanuginosus* 木聚糖酶对燕麦木聚糖的主要水解产物是木二糖。



1:木糖(X1)和木二糖(X2)标样;2~5:分别来自 *M. ruber*、*Thermomyces lanuginosus*、*Bacillus pumilus* 和 *Thermotoga maritima* 的木聚糖酶水解燕麦木聚糖的产物。

图4 不同来源木聚糖酶水解燕麦木聚糖的产物

Fig.4 Thin-layer chromatography of the products from the hydrolysis of oat spelt xylan

2.4 木聚糖酶 *Mru* 的生物信息学

2.4.1 木聚糖酶 *Mru* 一级结构

2.4.1.1 保守区预测 利用NCBI中的BlastP和CCD程序以及Pfam对序列测定结果进行保守区和蛋白家族预测。木聚糖酶 *Mru* 具有第10家族糖基水解酶的保守区域,位于Leu18~Leu317。

2.4.1.2 木聚糖酶 *Mru* 同源性分析 通过GenBank数据库的Blastp程序,对木聚糖酶 *Mru* 序列测定结果进行同源性分析,结果显示其与来源 *M. ruber* DSM1279 (WP_015586289.1)的木聚糖酶一致性为100%,与来源 *Meiothermus cerbereus* (WP_027878488)、*Meiothermus rufus* (WP_027881275)、*Meiothermus chliarophilus* (WP_027891604)、*Meiothermus timidus* (WP_018467010)的木聚糖酶一致性分别为89%、78%、65%、61%。选取表1中14种已有报道的第10家族木聚糖酶进行序列相似性比对分析,结果表明,木聚糖酶 *Mru* 具有第10家族木聚糖酶通常所包含的2个谷氨酸催化残基E150和E255,这2个残基被认为在木聚糖酶催化反应中具有重要作用^[12-13]。另外,比对的14个木聚糖酶有5个高度保守区,即靠近N端的

ENVMKW、GHTLVWH、WDVVNE、YNDY 以及 TELD。根据酶的温度耐受性,木聚糖酶可划分为中温酶(40~60℃)、高温酶(50~80℃)和超高温酶(>80℃)^[14],耐受性低于 40℃的酶称为

低温酶。对 14 个木聚糖酶进行系统发育分析结果(图 5)表明,木聚糖酶 *Mru* 与 7 种高温酶聚为一类,另 2 种高温酶(*Tthx*、*Tspx*)与 4 种低温酶聚为另一类。

表 1 14 个第 10 家族木聚糖酶的温度特性

Table 1 Temperature characters of 14 GH10 xylanases

来源微生物	木聚糖酶	登录号	最适温度(℃)	文献
<i>Glaciecola mesophila</i> KMM 241	<i>Gmex</i>	ACN76857.1	30	[15]
<i>Aeromonas caviae</i> ME-1	<i>Acax</i>	BAA31551.2	30~37	[16]
<i>Flavobacterium</i> sp. MSY2	<i>Fspx</i>	AAV98787.1	30	[17]
<i>Sphingobacterium</i> sp. TN19	<i>Sspx</i>	ACX30652.1	45	[18]
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-12	<i>Cspx</i>	ABX88978.1	60	[19]
<i>Streptomyces</i> sp. S9	<i>Ssp.S9x</i>	ABX71815.1	60	[20]
<i>Meiothermus ruber</i> TC-1	<i>Mru</i>	GL000978	65	
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	<i>Acax</i>	BAB40957.1	65	[21]
<i>Achaetomium</i> sp. Xz-8	<i>Aspx</i>	AHE13927.1	75	[22]
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	<i>Mcix</i>	AGV01049.1	80	[23]
<i>Thermotoga maritime</i> MSB8	<i>TmaxB</i>	NP_227886.1	90	[24]
<i>Thermotoga petrophila</i>	<i>Tpex</i>	ABQ46873.1	95	[25]
<i>Thermotoga thermarum</i>	<i>Tthx</i>	AEH51686.1	95	[26]
<i>Thermotoga</i> sp. strain FjSS3-B.1	<i>Tspx</i>	AAD32593.2	105	[27]

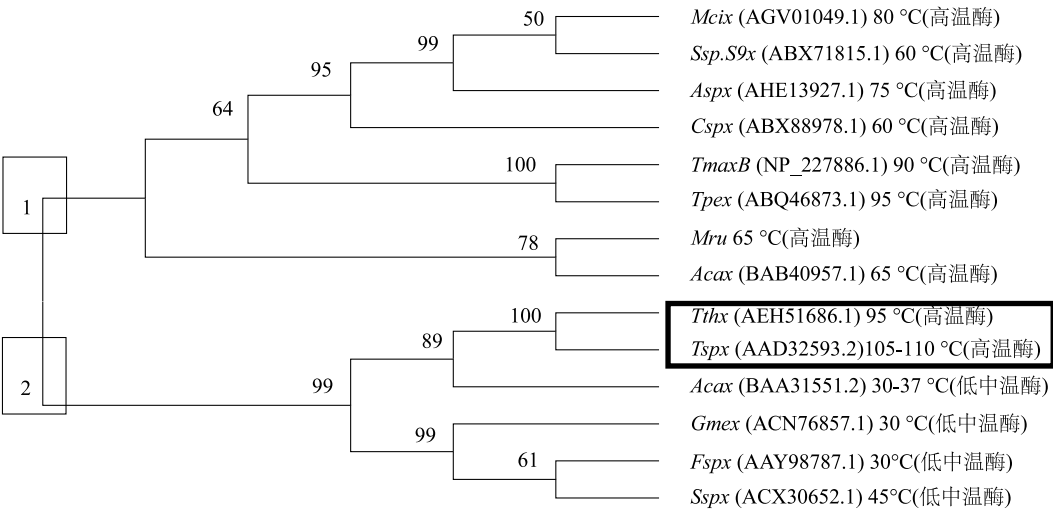
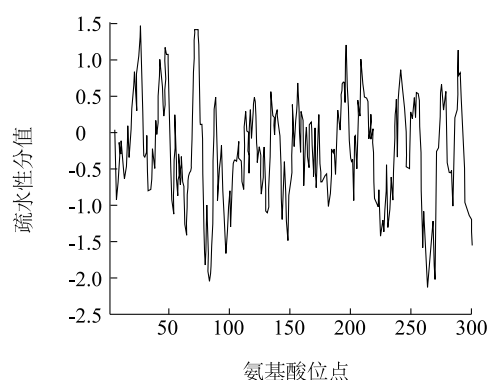


图 5 对 14 种第 10 家族木聚糖酶系统发育分析
Fig.5 The phylogenetic tree of 14 GH10 xylanases

2.4.2 木聚糖酶 *Mru* 二级结构 木聚糖酶 *Mru* 的疏水性最大值是 1.478,位于第 26 位点处。疏水性

最小值是-2.133,位于第 263 位点处。从图 6 可以看出亲水性氨基酸残基均匀分布于整条肽链,且多

图6 重组木聚糖酶 *Mru* 疏水性分析Fig.6 Hydrophobicity analysis of recombinant *Mru* xylanase

肽链整体疏水值小于零,该蛋白表现为一定的亲水性。经蛋白质理化性质分析得出,木聚糖酶 *Mru* 不稳定系数是 39.40,脂肪系数为 90.22,疏水性平均值为 -0.234,表明木聚糖酶 *Mru* 是稳定的亲水性蛋白。

由于肽链内部和多肽链之间的氢键,肽链在一维方向展示出许多周期性的结构,如 α -螺旋、 β -折叠等。通过 SOPMA 分析预测木聚糖酶 *Mru* 的二级结构, *Mru* 木聚糖酶是由 51.68% α -螺旋,15.90% β -

折叠,7.34% β -转角,25.08% 无规则卷曲组成(图7)。

2.4.3 木聚糖酶 *Mru* 同源建模 为了提高同源建模的可信度,采用多序列比对同源建模方法。使用 Blast 工具在 PDB 数据库搜索相似的序列之后,选择 4 个同源性较高的蛋白质结构。将这 4 个蛋白质结构作为模板,应用 Modeller 构建目标序列构象,结构如图 8。利用 PROCHECK 对目标蛋白质模型进行合理性分析,模建的三维结构 96% 氨基酸的 ψ 角和 φ 角位于 Ramachandran 图的合理区域,表明构建的木聚糖酶 *Mru* 蛋白催化域的三维结构是合理的。进一步利用 verify3D 软件检测模建结果的三维结构(3D)与序列结构(1D)的符合度,表明 93.38% 残基的 3D 与 1D 符合度大于 0.2,处于可接受水平。木聚糖酶 *Mru* 蛋白催化域的模建三维结构为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构。同源比对得到的 5 个保守区 ENVMKW、GHTLVWH、WDVVNE、YNDY 和 TELD 分别分布在木聚糖酶 *Mru* 蛋白的空间结构中的 β_2 末端、 β_3 末端、 β_4 部分、 β_5 部分和 β_7 部分,位于 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构的内壁。酸碱催化活性氨基酸 E150 位于 β_4 折叠的尾巴上,另外一个谷氨酸催化残基(E255)位于 β_7

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
VWAQPGPPLRLSLAEARKIQIGAAVEPSLLQEPQYAQVLAREFNLVVAENVMETKWGALQTARGEYNFAA
eecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ADLLNFAQRNRQAVRGHTLVWHQQLPRWME TYG SFTSAEMETEAILSDHIRT VVG RYRGQ IAYWDVNE
hhhhhhhhhhhtthhhhtcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
AIGDDARLRSTPFDVLPGLYKAFRLARAADPSAKLFYNDYGAELGAKSDAIYALLKELRARGVPVDGV
hhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GFQVHVDSSFSRQVRMETAEENLERFAQLGLEIHI TEMETDVLSSSTG SRAERLERQAQVYREV LQVCLR
eeeeeecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
QPRCKVFTLWGFDAHSWRGASEPLIFD VDYQPKPAYFALQRTLQQP
cttcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

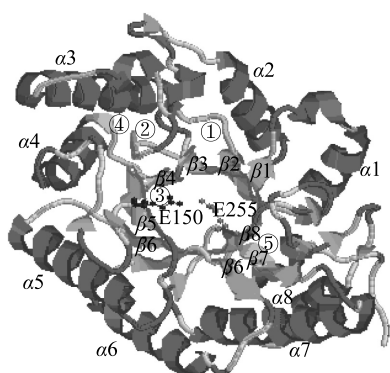
```

Sequence length : 327

SOPMA :

Alpha helix	(Hh) :	169 is	51.68%
3_{10} helix	(Gg) :	0 is	0
Pi helix	(Ii) :	0 is	0
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0
Extended strand	(Ee) :	52 is	15.90%
Beta turn	(It) :	24 is	7.34%
Bend region	(Ss) :	0 is	0
Random coil	(Cc) :	82 is	25.08%
Ambiguous states (?)	:	0 is	0
Other states	:	0 is	0

图7 木聚糖酶 *Mru* 二级结构预测Fig.7 Secondary structure prediction of *Mru* xylanase



$\alpha 1 \sim \alpha 8$: α 螺旋; $\beta 1 \sim \beta 8$: β 折叠; ① ~ ⑤: 分别为保守区 ENVMKW、GHTLVWH、WDVVNE、YNDY 和 TELD; E150、E255: 催化活性氨基酸。

图 8 木聚糖酶 *Mru* 蛋白催化域的模建三维结构

Fig.8 Overall structure of the CD domain of *Mru* xylanase predicted by Modeller

上。从木聚糖酶 *Mru* 蛋白 CD 区三维结构可以看出, α 螺旋几乎不含有保守氨基酸残基, 保守性远低于 β 折叠。催化位点位于 β 折叠区有利于保持酶的热稳定性, 同时 β 折叠区的高度保守性说明了嗜热酶在进化过程中形成了独特的热稳定结构模式。

3 讨论

本研究从亚栖热菌中成功克隆出了木聚糖酶基因, 通过蛋白的一级结构与二级结构分析, 初步论断该酶属于第 10 家族, 且是一个较稳定的亲水蛋白。以往许多研究者通过晶体结构分析、序列比对和突变研究结果说明中温酶和耐热酶一级结构上很相似, 于是推测影响木聚糖酶热稳定性的因素是蛋白质进行了一些微小的修饰, 如二硫键、盐键、氢键、表面带电残基及内部堆积力等, 同时提出了各种理论, 如疏水核堆积或芳香族氨基酸粘性斑形成多聚体, 脯氨酸规则, 螺旋偶极子的稳定, 热稳定结构域 (TSD) 等^[28]。本研究对已研究较深入的 4 种中低温木聚糖酶, 9 种耐热木聚糖酶和木聚糖酶 *Mru* 进行同源性比对, 这些酶均属于第 10 家族木聚糖酶。分析得到的结果是, 木聚糖酶 *Mru* 具有通常第 10 家族木聚糖酶所包含的 2 个谷氨酸催化残基 E150 和 E255, 有 5 个高度保守区, 即靠近 N 端的 ENV MKW 以及 GHTLVWH、WDVVNE、YNDY、TELD, 而且木聚糖酶 *Mru* 在进化树上体现出与其他耐热木聚糖酶具有类似的进化过程。木聚糖酶 *Mru* 蛋白催化域

的模建三维结构为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶装结构。催化位点位于 β 折叠区有利于保持酶的热稳定性, 同时 β 折叠区的高度保守性说明了嗜热酶在进化过程中形成了独特的热稳定结构模式。另外, 该木聚糖酶在 65 ~ 70 °C 酶活性最高, 说明具有良好的耐热性, 在 55 °C 的酶活性也达到最大酶活性的 70% 左右。

中国存在众多的廉价木质纤维原料, 目前对其使用方式仍然十分粗放, 不可避免的造成许多资源浪费和环境问题。木聚糖酶等酶制剂转化木质纤维生产实用产品, 反应温和, 效果突出, 因而备受关注, 但木聚糖酶在产业化过程中尚存在许多限制因素。第一, 酶的生产技术水平亟需提高。木聚糖酶要到达大批量生产要求, 目前的有效途径是通过基因工程筛选克隆子。第二, 需要筛选出产生耐高温、耐酸、耐碱性木聚糖酶的微生物, 从而有利于酶贮存和应用。第三, 在投入实际使用方面还要考虑如何实现酶的最佳性能, 如根据底物种类和浓度控制用酶量、复合酶制剂的配比以及酶载体的优化等。因此, 利用生物信息学分析方法结合基因工程手段是实现木聚糖酶制剂批量生产和有效应用的一个优良途径。

参考文献:

- [1] WONG KKY, TAN LU L, SADDLER J N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications[J]. Microbiol Rev, 1988, 52(3):305-317.
- [2] 白雪峰. 木聚糖酶在饲料中的应用进展[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(12):11-13.
- [3] TWOMEY L, PLUSKE J, ROWE J, et al. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility[J]. An Feed Sci Technol, 2003, 108(1-4):71-82.
- [4] 郗卫那, 张兰英, 何健, 等. 1 株饲用木聚糖酶产生菌的分离、鉴定、发酵、酶学性质及应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10):196-200.
- [5] 常桂英, 王俊玲, 徐亚维, 等. 木聚糖酶 *xynB* 基因序列分析及表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10):31-32.
- [6] 陈朝银, 刘丽, 袁昆. 栖热菌属热稳定 DNA 聚合酶[J]. 生物技术, 2001, 11(4):31-34.
- [7] BRIAN J T, JOHANNES S, SUSAN L, et al. Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21T) [J]. Stand Genomic Sci, 2010, 3(1):26-36.
- [8] 吴窃画, 邵蔚蓝. 产结晶纤维素酶的嗜热菌鉴定及其酶学性质[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2007, 30(2):84-88.
- [9] WU H, PEI J, WU G, et al. Overexpression of GH10

- endoxylanase XynB from *T. maritima* in *E. coli* by a novel vector with potential for industrial application[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 42:230-234.
- [10] QU W, SHAO W. Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA[J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33:1407-1416.
- [11] LE Y, PENG J, WU H, et al. An approach to the production of soluble protein from a fungal gene encoding an aggregation-prone xylanase in *Escherichia coli* [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(4):e18489.
- [12] COUGHLAN M P, HAZLEWOOD G P. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme system: biochemistry, molecular biology and application [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1993, 17:259-289.
- [13] MOREAU A, ROBERGE M, MANIN C, et al. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*[J]. *Biochem J*, 1994, 302:291-295.
- [14] POLIZELI MLTM, RIZZATTI ACS, MONTI R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial application [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67:577-591.
- [15] GUO B, CHEN X L, SUN C Y, et al. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84:1107-1115.
- [16] KUBATA B K, SUZUKI T, HORITSU H, et al. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 xylanase V, which produces exclusively xylobiose from xylan [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:531-535.
- [17] LEE C C, SMITH M, KIBBLEWHITE-ACCINELLI R E, et al. Isolation and characterization of a cold-active xylanase enzyme from *Flavobacterium* sp.[J]. *Curr Microbiol*, 2006, 52:112-116.
- [18] ZHOU J, HUANG H, MENG K, et al. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from the symbiotic *Sphingobacterium* sp. TN19 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85:323-333.
- [19] OH HW, HEO SY, PARK DS, et al. Biochemical characterization and sequence analysis of a xylanase produced by an exo-symbiotic bacterium of *Gryllotalpa orientalis*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-12 [J]. *Anton Leeuw*, 2008, 3:437-442.
- [20] LI N, MENG K, WANG Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80:231-240.
- [21] INAGAKI K, NAKAHIRA K, MUKAI K, et al. Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*[J]. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 1998, 62:1061-1067.
- [22] ZHAO L, MENG K, SHI P, et al. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(12):1879-1885.
- [23] FAN G, YANG S, YAN Q, et al. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 70:482-489.
- [24] JIANG Z Q, DENG W, ZHU Y P, et al. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2004, 27:207-213.
- [25] UL HAQ I, HUSSAIN Z, KHAN MA, et al. Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1,4- β -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(7):7251-7261.
- [26] SHI H, ZHANG Y, LI X, et al. A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6:26.
- [27] SIMPSON H D, HAUFLE U R, DANIEL R M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*[J]. *Biochem J*, 1991, 277:413-417.
- [28] LO LEGGIO L, KALOGIANNIS S, BHAT M K, et al. High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta) alpha-barrel architecture[J]. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1999, 36:295-306.

(责任编辑:陈海霞)