



嗜碱细菌 *Cellulomonas bogoriensis* 69B4^T 木聚糖酶的表达纯化及性质研究

袁鸣一, 董佳莹, 陈爱玲, 鞠斯成, 李凡*

东北师范大学生命科学学院, 吉林 长春 130024

摘要: 【目的】对嗜碱细菌 *Cellulomonas bogoriensis* 69B4^T 产碱性木聚糖酶进行研究, 克隆来源于该菌株的木聚糖酶基因, 并对其进行异源表达、纯化及酶学性质的表征, 为后续研究碱性木聚糖酶的耐碱机制及应用奠定基础。【方法】采用单因素分析法对菌株产碱性木聚糖酶情况进行研究; 通过基因组分析, 锚定5个内切木聚糖酶基因, 利用同源扩增的方法进行克隆, 并在大肠杆菌中重组表达, 利用亲和层析对重组酶进行纯化, 以木聚糖为底物表征木聚糖酶的酶学性质。【结果】来源于 *C. bogoriensis* 69B4^T 的5种木聚糖酶 Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 均在大肠杆菌内实现了异源表达, 并经亲和层析获得纯酶组分, 其最适反应温度分别为 60、50、40、40、60 °C, 在 50 °C 范围内保温 2 h, 残余酶活均在 90% 以上; 最适反应 pH 分别为 7.0、8.0、8.0、8.0、9.0, 在 pH 5.0–9.0 时具有较好的稳定性; 5种重组木聚糖酶对部分金属离子和高浓度盐表现出较好的耐受性, 对榉木木聚糖的酶活性最高, 均为内切型木聚糖酶。【结论】本研究表达纯化的5种重组木聚糖酶具有耐盐碱的优良特性, 且对温度、某些金属离子和化学试剂耐受, 为研究木聚糖酶的耐碱机制及工业应用提供了酶源。

关键词: 嗜碱细菌, 木聚糖酶, 异源表达, 酶学性质

木聚糖是植物细胞的主要结构多糖和第二丰富的可再生资源, 它在植物生物量中的重要性及自然界中的丰富性使可用于其降解和转化的木聚糖酶备受关注。在 CAZy 数据库中, 木聚糖酶归类

于 16 个不同的糖苷水解酶家族, 目前研究最广泛的大多属于 GH10 和 GH11 两个家族^[1], 其中内切-β-木聚糖酶是可随机切割木聚糖内部的 β-1,4-D-木糖苷键的关键酶, 主要来源是细菌和真菌。

基金项目: 吉林省自然科学基金(20180101346JC)

*通信作者。Tel: +86-431-85098130; E-mail: lif885@nenu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-08; 修回日期: 2021-01-23; 网络出版日期: 2021-03-08

木聚糖酶在饲料、食品、造纸、纺织、医药、环境和能源等领域具有广泛的应用潜力,目前也已经具有成熟的应用范例。但很多工业生产通常处于高温、高 pH 环境,已有的大多数天然木聚糖酶在高温和高 pH 条件下酶活性和稳定性都难以适应工业生产的需求,开发能够满足工业生产的耐碱木聚糖酶受到广泛关注。极端环境中的嗜碱性微生物被认为是产碱性木聚糖酶的良好来源,它们的最适生长 pH 一般在 9.0 以上,有的甚至可以在 pH 为 12 的条件下生长。目前,已有来源于菌株 *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13、*Bacillus* sp. NG-27 及嗜碱嗜热菌 *Bacillus* sp. NCIM59 等微生物的碱性或耐碱性木聚糖酶被报道^[2-4],但对于木聚糖酶耐碱性机制的研究及工业应用远远不够,仍需要大量新的耐碱性木聚糖酶的酶源。

C. bogoriensis 69B4^T 是一株来源于肯尼亚博格利亚湖沿岸沉淀物中的嗜碱细菌^[5],在前期的研究中已经从该菌株中克隆了一个最适 pH 为 11.0 的碱性蛋白酶和两个耐碱性纤维素酶^[6-7],实验同时显示该菌株在碱性条件下对木聚糖具有较好的降解特性。本文即以该菌株为对象,对其基因组预测的 5 种内切 β -1,4-木聚糖酶基因进行了克隆和表达,并对纯化的重组酶进行了酶学特性的表征,为碱性木聚糖酶耐碱机理的研究及木聚糖酶的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒: *C. bogoriensis* 69B4^T 购自德国微生物菌种保藏中心 DSMZ,大肠杆菌菌株 DH5 α 、Rosetta(DE3)购于 TaKaRa 公司,质粒

pMAL-c2x 为本实验室保存。

1.1.2 培养基: 发酵培养基:麸皮 1%,酵母浸粉 0.5%, NaCl 4%, NaCO₃ 1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.02%; LB 培养基: NaCl 1%, 胰蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器: 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司, T4 DNA ligase、*Eco*R I、*Hind* III 购于 TaKaRa 公司, 2 \times Power *Taq* PCR MasterMix 购于北京百泰克生物技术有限公司, Amylose Resin 购于 NEB 公司, 其他试剂药品均为国产分析纯。使用的主要仪器包括: PCR 仪(美国 ABI 公司), 全自动凝胶成像系统(上海天能科技有限公司), 电泳仪(北京六一仪器厂), 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司), 高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司)。引物合成及测序由长春库美生物科技有限公司完成。

1.2 培养基初始 pH 对菌株产酶的影响

发酵培养基的初始 pH 值分别调至 5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5 和 12.5, 将种子液接入到不同 pH 值的培养基中, 30 °C、130 r/min 恒温振荡培养 4 d, 4000 r/min 离心取上清液测定木聚糖酶活性, 绘制培养基初始 pH 值对菌株产木聚糖酶的影响曲线。

1.3 基因克隆及重组质粒构建

根据 *C. bogoriensis* 69B4^T 基因组中预测的木聚糖酶基因序列设计引物, 引物如表 1 所示, 以 *C. bogoriensis* 69B4^T 菌株的基因组 DNA 为模板, 利用 PCR MasterMix 酶对 5 种目的基因进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR

表 1. 扩增目的基因的引物
Table 1. Primers for amplification of target genes

Primers	Sequences (5'→3')
Xyn370 Fsp	CCTTGCATCCGCGTGCGGGGACCGAGCCACC
Xyn370 Rsp	CCCAAGCTTGCGCGCGCTCGCGCTCGGCGTTG
Xyn393 Fsp	GGAATTCGATGCAGCACCGTCGGAGC
Xyn393 Rsp	CCCAAGCTTCCGGGCCGCTCGAGTGC
Xyn425 Fsp	CCTTGGATCCATGACGACCACCCCTGGTGCCG
Xyn425 Rsp	CCCAAGCTTGCGCCCAGACGCACCTCGGCCG
Xyn466 Fsp	CCTTGGATCCGCGCCGAGCACCTGCAGGAAG
Xyn466 Rsp	CCCAAGCTTGCCGAGCAGGTGACCCGCGGCCAG
Xyn486 Fsp	CCTTGGATCCATGCCGGCCGCGGCGAACGACAC
Xyn486 Rsp	CCCAAGCTTGCGCTCGCCGAGCAGCTCACCG

产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后使用 T4 DNA ligase 与酶切后的 pMAL-c2x 载体相连, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 并对重组子进行测序验证。

1.4 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组子活化后接入 200 mL 含有 Amp 的 LB 培养液中, 37 °C、150 r/min 进行培养, 待 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 18 °C 诱导 22 h。离心收获的菌体悬浮于裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 中, 置于冰上超声破碎(功率 260 W, 工作 4 s, 间歇 6 s, 共 60 次)。将破碎液于 4 °C、12000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。利用 Amylose Resin 亲和层析柱进行重组蛋白的纯化, 将上清液与 Amylose Resin 结合 2 h, 之后分别使用含有 200 mmol/L 和 1 mol/L NaCl 的裂解缓冲液洗涤介质, 最后使用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 麦芽糖)洗脱目的蛋白。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

利用 SDS-PAGE 对重组酶的纯化结果进行检测, 分离胶浓度为 10%, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 通过与标准分子量 Marker (北京全式金生物技术有限公司)进行比较, 确定纯酶组分的分子量。

1.6 酶活性及蛋白浓度测定

使用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制 1% (W/V) 的榉木木聚糖底物, 适当浓度的重组酶与底物混合后置于 50 °C 反应 30 min, 释放的还原糖通过 3,5-二硝基水杨酸(DNS)定糖法进行检测, 以木糖为标准。每分钟催化水解木聚糖底物产生 1 μ mol 木糖所需的酶量, 定义为一个酶活力单位 U。

蛋白浓度使用 BCA 蛋白质测定试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)进行测定, 标准蛋白为牛血清白蛋白 BSA。

1.7 温度和 pH 对重组酶活性的影响

在 30–70 °C 条件下检测酶活力, 确定酶反应的最适温度。将重组酶分别置于 4–70 °C 环境中保温 2 h 后, 于最适酶反应条件下测定重组酶的残余活性。

在 pH 3.0–13.0 的条件下检测酶活力, 确定重组酶的最适酶反应 pH, 使用的缓冲液分别为柠檬酸缓冲液(pH 3.0–6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–13.0)。将重组酶分别置于 pH 值 3.0–13.0 的缓冲液中 4 °C 保温 24 h 后, 于最适酶反应条件下测定重组酶的残余活性。

1.8 金属离子及化学试剂对重组酶活性的影响

向酶反应体系中加入不同金属离子, 使其终浓度为 1 mmol/L, 或分别加入化学试剂甲醇、乙醇、SDS、 β -巯基乙醇、Triton X-100 和 Tween-80, 使其终浓度为 1% (V/V), 酶反应在最适条件下进行, 以未加金属离子或化学试剂的酶活性作为 100%, 计算加入不同试剂后酶的残余活性。

1.9 盐对重组酶活性的影响

配制不同盐浓度的木聚糖底物, 使得 NaCl 或 KCl 终浓度为 0.5–5.0 mol/L, 加入适量纯酶进行酶反应, 以未加盐离子的酶活作为 100%, 计算各实验组的相对酶活力。在纯酶组分中分别加入不同浓度的 NaCl, 终浓度分别为 1、3、5 mol/L, 4 °C 放置 3–24 h, 每间隔一定时间进行酶活性的检测。

1.10 重组酶的底物特异性分析

分别以榉木木聚糖、羧甲基纤维素(CMC)、对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷(pNPX)、微晶纤维素和滤纸为底物, 于最适酶反应条件下检测重组酶的活性, 使用酶的比活力来表征酶的底物特异性。

1.11 重组酶降解木寡糖的产物分析

将稀释至一定浓度的纯酶组分分别与木寡

糖底物 xylotetraose 和 xylopentaose 混合, 底物终浓度为 5 mg/mL, 反应 48 h 后 10000 r/min 离心 2 min 取上清。采用薄层层析法(TLC)对产物进行分析, 上清液及木寡糖标准品点样至硅胶板上 (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck), 展层剂为氯仿:甲醇:冰乙酸:水(50:50:15:5, V/V/V/V), 展层后的层析板置于 5% 的硫酸-无水乙醇溶液中浸泡 1–2 min, 置于 110 °C 烘箱中显色。

2 结果和分析

2.1 菌株产碱性木聚糖酶的研究

C. bogoriensis 69B4^T 能够在碱性条件下生长, 并在木聚糖等半纤维素生物质诱导下分泌大量木聚糖酶。实验显示(图 1), 培养基初始 pH 为 9.5 时, 发酵液酶活性最高, 当 pH 在 6.5–10.5 时, 菌株仍保持较高的产酶能力, 发酵液活性达到最高酶活性的 80% 以上, 暗示该菌株可能能够分泌耐碱性木聚糖酶。

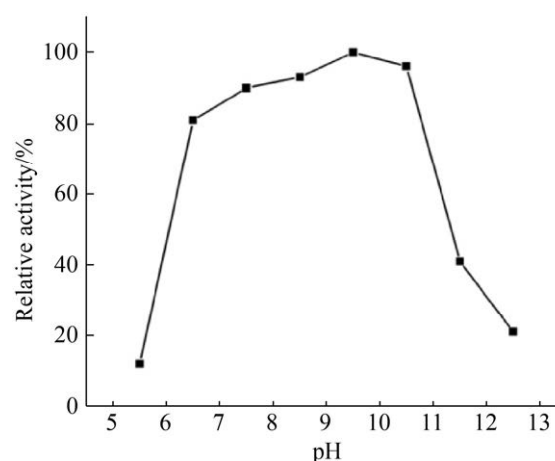


图 1. 培养基初始 pH 对菌株产木聚糖酶的影响
Figure 1. Effect of initial pH on production of xylanase.

2.2 木聚糖酶的序列分析

对菌株 *C. bogoriensis* 69B4^T 的基因组进行了分析, 结果显示基因组中含有 5 个预测的木聚糖酶基因。根据基因编码的氨基酸数目, 将其对应的重组酶分别命名为 Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486。表 2 列出了预测的重组酶理化性质, 根据稳定系数推测 5 种木聚糖酶组分的稳定性为 Xyn425>Xyn466>Xyn486>Xyn370>Xyn393; 脂肪族系数显示出 Xyn425 的脂肪族侧链所占比例较高, Xyn370 和 Xyn393 次之。电荷比例方面, Xyn370、Xyn393、Xyn425 和 Xyn486 的负电荷数量都远高于正电荷数, 这与报道的酸性氨基酸的存在使酶更适宜碱性条件是相符的^[8], 但 Xyn466 的负电荷总数与正电荷的相当。

分别对 5 种木聚糖酶进行了序列相似性比对分析和结构域预测, 结果显示 Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 与 NCBI 中蛋白序列的一致性最高分别为 68%、71%、74%、72% 和 59% (图 2), 暗示 5 种木聚糖酶在序列上具有一定的新颖性。结构域预测显示 5 种木聚糖酶均属于 GH10 家族, 其中 Xyn466 和 Xyn486 除催化结构域外, 还具有典型的碳水化合物结合模块 CBM2。

2.3 木聚糖酶的异源表达及纯化

以 *C. bogoriensis* 69B4^T 菌株基因组为模板, 利用方法中所述引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 产物分子量与目的片段相符。将扩增产物分别连接至 pMAL-c2x 载体构建重组质粒, 流程示意图见图 3。

表 2. 五种木聚糖酶理化性质预测结果

Table 2. The physicochemical properties of the five xylanases

Characteristic	Xyn370	Xyn393	Xyn425	Xyn466	Xyn486
Number of amino acids	370	393	425	466	486
Molecular weight	41645.37	43959.16	47297.07	50571.18	51728.33
Theoretical pI	4.82	4.24	4.83	8.66	5.19
Instability index	43.63	53.24	33.20	37.38	41.00
Aliphatic index	72.05	73.05	76.68	62.70	68.42
Hydropathicity	-0.470	-0.496	-0.353	-0.521	-0.311
Negatively charged residues (Asp+Glu)	60	75	64	42	47
Positively charged residues (Arg+Lys)	36	24	40	46	32

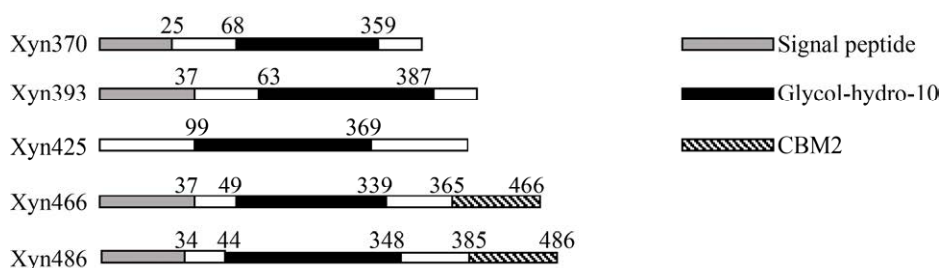


图 2. 五种木聚糖酶的结构域分析

Figure 2. Analysis of domain of the five xylanases.

重组酶在 *E. coli* Rosetta(DE3)中进行表达, 采用支链淀粉亲和层析柱进行分离纯化。电泳结果(图 4)显示, 重组酶均得到了有效表达及纯化, 经迁移率计算, 5 种木聚糖酶组分的分子量分别约为 83、86、89、92 和 93 kDa, 与预测的带有 MBP 融合蛋白(约 42 kDa)的木聚糖酶组分分子量一致。

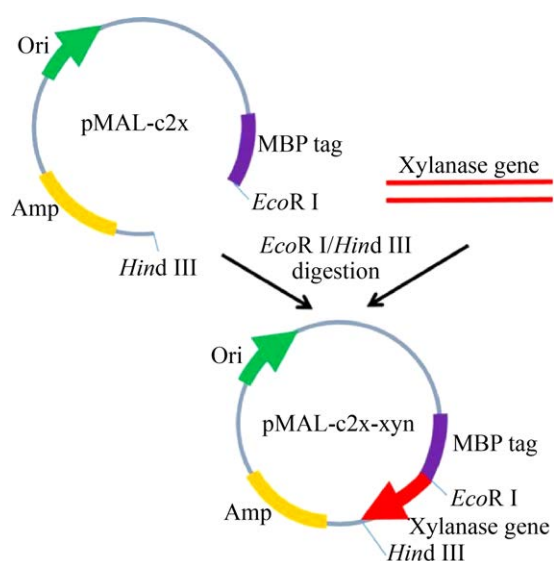


图 3. 重组质粒构建示意图

Figure 3. The construction of the five recombinants.

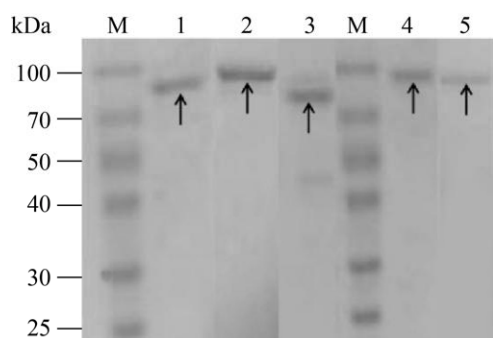


图 4. 五种木聚糖酶组分的 SDS-PAGE 图谱

Figure 4. SDS-PAGE of the five recombinant xylanases. Lane M molecular mass markers; lane 1–5 purified recombinases with MBP fusion protein: Xyn393 (86kDa), Xyn466 (92 kDa), Xyn370 (83kDa), Xyn486 (93kDa) and Xyn425 (89 kDa).

2.4 温度对重组酶的影响

图 5 显示了温度对 5 种重组木聚糖酶组分活力的影响, 从 30 °C 开始, 随着温度的升高, 酶促反应速率随之改变, Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 分别在 60、50、40、40、60 °C 时酶的活力达到最高, 之后随着温度的升高, 酶活力逐渐降低。然而, 在温度升至 60 °C 时, Xyn370、Xyn393、Xyn425 和 Xyn486 的酶活力仍能保持在最高酶活力的 80% 以上; 继续升至 70 °C 时, 5 种木聚糖酶组分的酶活力仍为最高酶活力的 50% 以上。对其中耐热性最好的 Xyn393 组分进行了进一步检测, 发现当温度升至 80 °C 时, 其酶活力仍为最高酶活力的 60% 左右(结果未在图 5 中显示)。上述结果说明 5 种重组木聚糖酶组分具有一定的耐高温特性。

同时, 5 种重组木聚糖酶也显示了较好的温度稳定性。在 50 °C 以下保温处理 2 h, 重组酶活力均保持在初始酶活的 90% 左右; Xyn370、Xyn393、Xyn425 和 Xyn466 在 60 °C 条件下保温 2 h, 酶活力仍保持初始酶活的 80%、60%、60% 和 40%; Xyn393 组分在 70 °C 保温 2 h 后残存酶活力仍为初始酶活的 40% 以上。

2.5 pH 对重组酶的影响

检测了不同 pH 对重组酶活性的影响, 结果如图 6 所示。重组酶 Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 分别在 pH 7.0、8.0、8.0、8.0、9.0 处酶活力达到最高; Xyn486 在 pH 11.0 条件下酶活力仍能保持最高酶活力的 80% 左右, Xyn370 和 Xyn466 在 pH 10.0 条件下酶活力也可达到最高酶活力的 40%–50%, 显示 5 种重组木聚糖酶组分均为耐碱性木聚糖酶。这些木聚糖酶的最适 pH 接近或高于同样来源于嗜碱性细菌

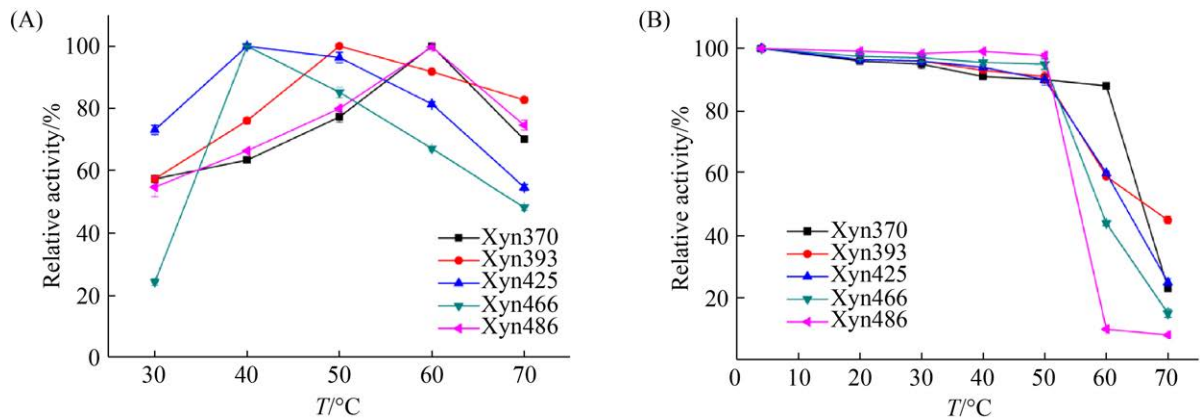


图 5. 温度对重组木聚糖酶活性(A)和稳定性(B)的影响

Figure 5. Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of recombinant xylanases.

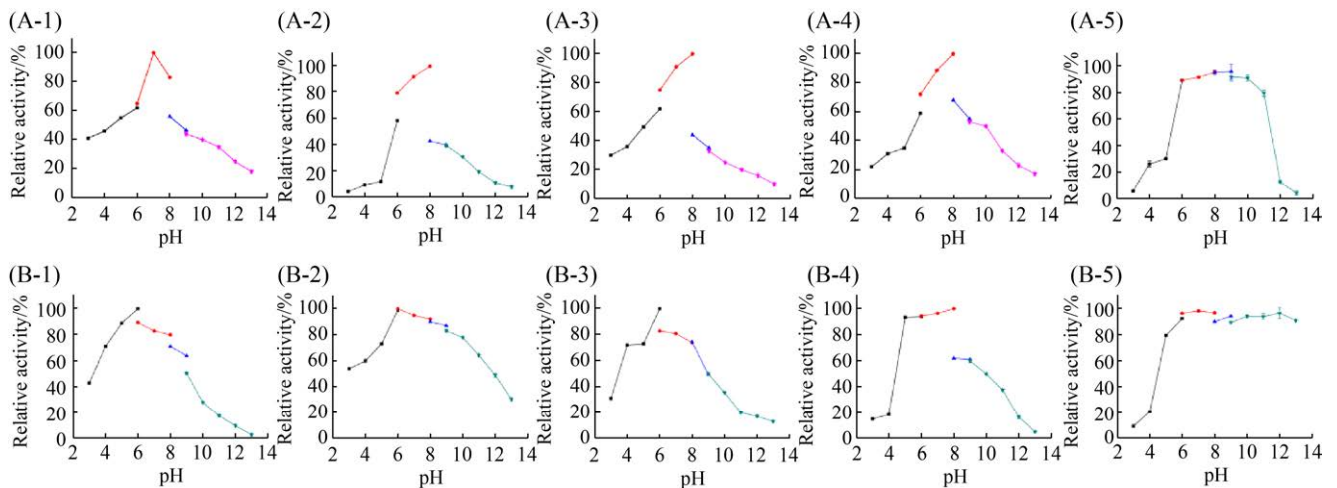


图 6. pH 对重组木聚糖酶活性(A)和稳定性(B)的影响

Figure 6. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of recombinant xylanases. Xyn370 (A-1, B-1), Xyn393 (A-2, B-2), Xyn425 (A-3, B-3), Xyn466 (A-4, B-4), Xyn486 (A-5, B-5). Buffers used in the assays were citric acid buffer for pH 3.0–6.0 (■); potassium phosphate buffer for pH 6.0–8.0 (●); Tris-HCl buffer for pH 8.0–9.0 (▲) and Gly-NaOH buffer for pH 9.0–13.0 (▼).

Bacillus sp. SN5、*Bacillus firmus*、*Bacillus* sp.的 Xyn10A (pH 7.0)^[9]、BfXyn10A (pH 7.5)^[10]和 Xyn10 (pH 7.0)^[11]，其中 Xyn486 的最适 pH 与来源于 *Bacillus halodurans* 的 XylITSEV1 (pH 9.0)^[12]和 XylS7 (pH 9.0–9.5)^[13]持平。

将重组木聚糖酶的纯酶组分在不同 pH 值缓冲液中 4 °C 放置 24 h 后，于最适温度和最优 pH

条件下进行酶促反应，测定重组酶的剩余酶活力。结果显示 Xyn486 在 pH 5.0–13.0 时，其残存酶活保持在初始酶活力的 80% 以上，表明该木聚糖酶的 pH 稳定性范围较广泛；Xyn393 和 Xyn466 在 pH 5.0–10.0 内的残存酶活力为初始酶活的 50% 以上，Xyn370 和 Xyn425 在 pH 4.0–9.0 时，残存酶活力维持在初始酶活的 50% 以上。据报道

来源于菌株 *Pichia pastoris* X-33 的耐碱性 XynA 在 pH 11.0 条件下放置 11 h 后残存酶活性能达到 85% 以上^[14]；来源于菌株 *Alkalibacterium* sp. SL3 的耐碱性 rXynSL3 在 pH 6.0–12.0、37 °C 条件下放置 1 h 残存酶活性 70%^[15]；由以上结果可以看出，虽然不同 pH 范围的缓冲液对酶活性具有一定的影响，但本研究中的 5 种重组木聚糖酶组分均表现出较高的 pH 稳定性。

2.6 部分金属离子及化学试剂对重组酶的影响

表 3 列出了部分金属离子及化学试剂对重组木聚糖酶活性的影响，结果显示不同金属离子和有机试剂对不同酶组分的影响是不同的。Xyn370 和 Xyn425 对所检测的金属离子耐受性较好，残余酶活力均在 70% 以上，Mn²⁺、Zn²⁺及 Mg²⁺能够显著促进两种酶的活性。Cu²⁺对 Xyn370 的酶活具有促进作用，但对 Xyn425 的活性具有明显的抑制作用。Fe³⁺显著抑制 Xyn393 的活性，残余活力仅

为 46.7%，但对 Xyn466 和 Xyn486 具有促进作用，活力可达到 124.4% 和 134.4%，Cu²⁺、Mg²⁺和 Co²⁺强烈抑制 Xyn466 的酶活力，但对 Xyn486 具有促进作用。这些影响的差异表明这 5 种重组酶分子参与活性功能的氨基酸在性质上可能有所差异。

同时检测了部分化学试剂对酶活力的影响，结果显示不同试剂对不同酶的影响作用有所不同。有机溶剂甲醇和乙醇对 Xyn370、Xyn393、Xyn466 和 Xyn486 都具有一定的抑制作用，却显著促进 Xyn425 的酶活力；还原剂 β-巯基乙醇对 5 种酶组分都有明显的抑制作用，说明二硫键对于维持这些酶的活性构象是必需的；阴离子表面活性剂 SDS 显著抑制 5 种酶的活力，说明 SDS 的加入可能会影响酶的活性结构；而非离子表面活性剂 Triton X-100 能够促进酶的活力，说明低剂量非离子表面活性剂的存在所引起的酶分子构象的变化可能使其更易与底物进行识别与结合。

表 3. 金属离子和化学试剂对重组酶活性的影响

Table 3. Effect of metals and chemical reagents on purified recombinant xylanases

Metal ions/Chemical reagents	Residual activity/%				
	Xyn370	Xyn393	Xyn425	Xyn466	Xyn486
Fe ²⁺	101.5±1.8	88.8±2.0	85.7±0.6	124.2±1.0	86.7±1.0
Fe ³⁺	99.5±4.0	46.7±8.0	88.9±0.5	124.4±0.1	134.4±0.7
Cu ²⁺	136.2±2.5	87.4±0.8	72.2±0.6	32.8±2.9	129.9±0.8
Ca ²⁺	85.7±1.3	87.3±4.0	80.3±1.0	99.5±2.2	111.6±0.4
Na ⁺	110.4±0.7	108.3±1.0	102.3±1.6	141.1±2.0	99.5±2.7
K ⁺	80.8±0.9	115.9±3.0	71.0±1.0	76.7±3.8	112.9±0.3
Mn ²⁺	116.5±0.6	105.6±3.0	131.7±1.5	45.6±0.6	149.6±5.4
Zn ²⁺	121.0±2.8	137.4±4.6	141.2±0.7	76.6±3.8	38.4±5.1
Mg ²⁺	116.0±2.2	110.2±6.0	122.1±1.4	48.9±3.0	105.5±1.2
Co ²⁺	113.0±1.8	85.9±4.4	78.6±0.7	11.0±0.3	133.0±5.3
Methanol	64.2±3.1	78.0±3.2	126.0±2.1	21.9±0.6	77.5±0.6
Ethanol	94.7±1.8	70.0±4.3	189.1±0.4	87.4±1.3	75.1±0.7
β-mercaptoethanol	64.4±1.9	46.6±2.0	49.7±0.4	24.6±0.6	80.6±0.6
SDS	46.5±1.7	83.3±5.4	21.0±1.0	46.5±1.8	36.2±3.1
Tween-80	112.6±1.3	100.3±2.9	177.6±0.6	122.0±0.5	69.6±0.36
Triton X-100	99.1±0.5	118.9±2.2	140.9±0.4	127.4±1.1	127.4±1.1

2.7 重组酶的耐盐性

许多耐碱性酶往往同时具有耐盐特性,因此本文检测了重组酶对盐的耐受性,结果(图 7-A)显示 1 mol/L 以内的 NaCl 和 KCl 对 5 种重组酶的酶活性均具有促进作用,其中对 Xyn486 的促进作用最显著,1 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L KCl 使得 Xyn486 酶活达到原酶活的 125% 和 130%。更高浓度的盐离子则对木聚糖酶的活性具有一定的抑制作用,但 5 种重组酶在 4 mol/L KCl 或 5 mol/L NaCl 条件下,剩余酶活性仍能保持在原酶活的 50% 以上。与已报道的耐盐木聚糖酶进行比较,可发现 5 种重组酶对高浓度 NaCl (3–5 mol/L) 的耐受性要优于来源于 *Streptomyces viridochromogenes*、*Alkalibacterium* sp. SL3、*Glaciicola mesophila* 和 *Planococcus* sp. SL4 的木聚糖酶 M11^[16]、rXynSL3^[15]、XynA^[17] 和 rXynSL4^[18],但其耐盐性弱于来源于 *Zunongwangia profunda* 和 *Gracilibacillus* sp. TSCPVG 的耐盐木聚糖酶^[19–20]。

将纯化的重组酶置于不同浓度的 NaCl 缓冲液中 4 °C 放置 3–24 h 后测定酶的残余活力,进一步检测了重组酶的盐稳定性,结果如图 7-B 所示。结果显示 5 种重组酶的盐稳定性较好,在 5 mol/L NaCl 中保温 24 h, Xyn370、Xyn393 和 Xyn466 的残余活性仍然保持在 60% 以上; Xyn425 和 Xyn486 在 1–3 mol/L 的 NaCl 中稳定性较好,保温 24 h 后活性残余 80% 以上;在 5 mol/L NaCl 环境中,随着保温时间的延长,剩余酶活性逐渐降低,24 h 后酶活性分别下降至原活性的 37% 和 54%。

文中 5 种重组酶的来源是 *C. bogoriensis* 69B4^T 菌株,该菌株分离自盐碱湖沉积物,这些木聚糖酶对盐碱条件具有良好的耐受性和稳定性,这可能是菌株对环境适应的进化结果,对菌株的生存具有重要意义,而这些特性也使得这些酶在依赖高盐碱条件的生物过程中具有重大的应用潜力。

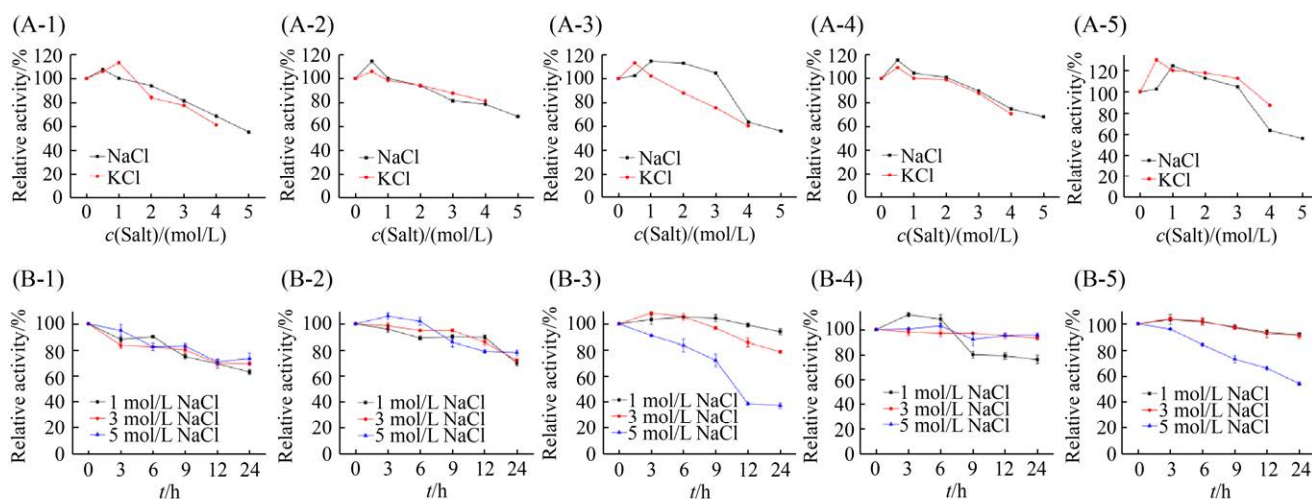


图 7. 盐对重组酶活性的影响

Figure 7. Effect of salts on the activity of recombinant xylanases. A: salt dependence of recombinant xylanase; B: halo-stability of recombinant xylanases in NaCl. Xyn370 (A-1, B-1), Xyn393 (A-2, B-2), Xyn425 (A-3, B-3), Xyn466 (A-4, B-4), Xyn486 (A-5, B-5).

2.8 重组酶的底物特异性

以榉木木聚糖、CMC、pNPX 以及不溶性底物微晶纤维素和滤纸为底物, 检测了 5 种木聚糖酶组分对底物的水解能力。如表 4 所示, 5 种重组酶组分对榉木木聚糖底物的活性最高, 对 CMC 底物具有较弱的水解活性; 对 pNPX 及不溶性底物微晶纤维素、滤纸具有极微弱的活性, 表明这 5 种重组酶主要呈现木聚糖内切酶活性。其榉木木聚糖降解活性显著高于已报道的来源于活性污泥和 *Paenibacillus barcinonensis* 的木聚糖酶 Xyn-b39^[21]、XynA^[22] 以及来源于 *Neosartorya spinosa* UZ-2-11 的纯化木聚糖酶^[23], 但低于来源于 *Roseithermus sacchariphilus* 和 *Humicola insolens* Y1 的耐碱性木聚糖酶 XynRA2^[24] 和 Xyn11^[25]。

2.9 酶解产物的 TLC 分析

采用 TLC 薄层层析法对 5 种重组酶降解木寡糖的产物进行了分析, 结果如图 8 所示。由图可知, Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 不能水解木二糖和木三糖, 均能够将木四糖水解释为木二糖, 将木五糖水解释为木二糖和木三糖, 说明 5 种木聚糖酶均以内切形式水解木聚糖, 木四糖是酶能够水解的最小寡糖单位。

表 4. 五种重组木聚糖酶的底物特异性

Table 4. Substrate specificity of five recombinant xylanases

Substrate	Activity/(U/mg)				
	Xyn370	Xyn393	Xyn425	Xyn466	Xyn486
Beech xylan	86.4±1.8	88.2±2.0	79.3±1.0	80.3±1.1	89.3±1.8
CMC	10.6±1.1	19.9±1.3	18.6±1.5	11.2±1.5	15.8±1.0
pNPX	1.9±0.1	2.6±0.3	3.2±0.2	0.1±0.01	2.1±0.2
Avicel	2.4±0.2	1.2±0.1	0.9±0.08	4.6±0.2	2.2±0.2
Filter paper	2.6±0.3	1.2±0.2	2.5±0.2	2.6±0.3	1.6±0.1

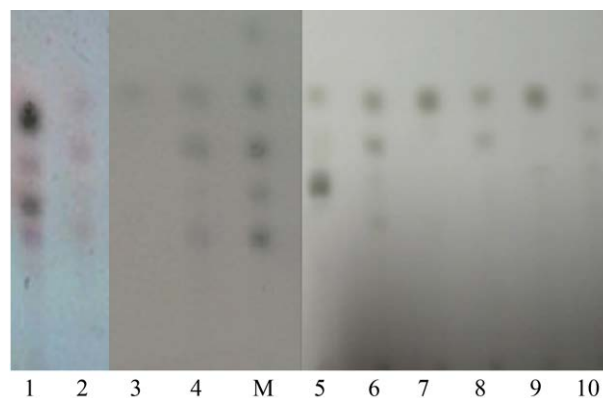


图 8. 酶解产物的薄层色谱图

Figure 8. Thin-layer chromatography of the enzymatic hydrolysis products by five xylanases. M: standard sugars, the spots from top to bottom are followed by xylose, xylobiose, xylotriose, xylotetraose and xylopentaose. Lane 1–10: xylotriose and xylopentaose sugars treated with the recombinant Xyn370 (1, 2), Xyn393 (3, 4), Xyn425 (5, 6), Xyn466 (7, 8), Xyn486 (9, 10).

3 讨论

序列分析显示 5 种木聚糖酶与 NCBI 数据库中的其他序列具有较低的一致性(均小于 74%), 表明嗜碱细菌 *C. bogoriensis* 69B4^T 所产的木聚糖酶均为未经研究的新酶组分, 这些木聚糖酶具有耐碱耐盐等优良特性, 具有潜在的研究及应用价值。将这 5 种木聚糖酶与 GH10 家族其他来源的碱性木聚糖酶进行了比对, 发现尽管序列一致性较低, 但是这些木聚糖酶组分序列中许多关键氨基酸残基是保守的, 预测 Glu172、Glu198、Glu178、Glu166 和 Glu166 分别是 Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 的酸碱功能残基, 而亲核试剂残基则分别为 Glu280、Glu306、Glu283、Glu274 和 Glu271。

Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 的最适 pH 分别为 7.0、8.0、8.0、8.0 和 9.0，而且这些酶还表现出较宽的 pH 活性范围，在 pH 11.0 仍具有 20% 以上的酶活力，其中 Xyn486 的酶活性可达到最高酶活性的 80%，同时这些酶还具有较强的 pH 稳定性，特别是 Xyn486 在 pH 5.0–13.0 条件下放置 24 h 后残余酶活力仍在原活力的 80% 以上。以上这些结果表明这 5 种木聚糖酶均为耐碱性酶。另外，这些重组酶还表现出其他良好的特性，例如耐热和耐盐，显示了它们在造纸、纺织等领域工业生产中的应用潜力。

通过同源序列比对分析可以显示出与蛋白质适应极端环境相关的一些重要氨基酸。有研究报道氨基酸序列中酸性氨基酸较多时，更有利于酶分子适应碱性环境^[26]，而不同极性氨基酸的含量也与酶的 pH 适应性存在一定关系，Arg 和 His 高含量的存在可能促使木聚糖酶更趋于碱性^[27]。本研究中的木聚糖酶 Xyn466 含有的酸性氨基酸 Asp 和 Glu 与碱性氨基酸 Arg 和 Lys 的量基本持平，除此之外的 4 种木聚糖酶均体现了较高的酸性氨基酸含量，酸性氨基酸与碱性氨基酸的比值分别为 1.67、3.10、1.60 和 1.47。这一特点在 *Thermobifida halotolerans* 的 Thcel6A (1.8) 以及同样来源于 *C. bogoriensis* 69B4^T 的 Cel5A (1.55) 和 Cel9A (2.08) 中也有体现^[7,28]，推测这一特征可能有利于耐碱性酶更好地适应碱性环境。同时，与已经报道的来源于 *Bacillus halodurans* S7 和 *Bacillus* sp. NG-27 的碱性木聚糖酶 2UWF 和 BSX 相比^[3,29]，Xyn370、Xyn393、Xyn425、Xyn466 和 Xyn486 中 His 含量相差不多，但它们具有更

高比例的 Arg。

极端环境压力会使得微生物的氨基酸组成发生变化以改变其化学特性来适应生存需求^[30–31]。2008 年 Paul 等基于嗜盐原核生物的基因组和蛋白质组分析研究了某些微生物具有高盐适应性的分子特征，提出了嗜盐菌种的蛋白质特征是疏水性低、酸性残基(尤其是 Asp)过量存在、较低的螺旋形成倾向和较高的卷曲形成倾向^[31]。在我们的研究中，5 种木聚糖酶的平均疏水值分别为 -0.470、-0.496、-0.353、-0.521 和 -0.311，处于 Paul 等报道的嗜盐微生物的疏水范围内；而且前文中也提到这些酶组分都具有较高的酸性残基含量。这些结果表明，嗜盐微生物的蛋白质分子特征也适用于来源于这些极端微生物的细胞外糖苷水解酶^[31–32]，可以利用这些特征对嗜盐酶进行开发和蛋白质工程改造。

C. bogoriensis 69B4^T 是一株筛选自肯尼亚博格利亚湖沿岸沉积物的嗜盐碱细菌，在碱性条件下具有较好的降解生物大分子物质的能力，本实验室前期研究了该菌株对蛋白质、纤维素及半纤维素等物质的降解，获得了一个碱性蛋白酶和两个碱性纤维素酶，本文报道了 5 个 GH10 家族的内切木聚糖酶。为什么在同一微生物中含有多个同家族木聚糖酶，其存在的意义还需要进一步探讨，但无疑该菌株赋予了其胞外大分子水解酶普遍的耐碱特性，而这些酶分子结构-功能的进一步研究将有利于酶分子耐碱机制的阐明，并为环境保护和某些特殊生物产业提供了可用于蛋白质工程改造的新的酶源。

参考文献

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Reviews*, 2005, 29(1): 3–23.
- [2] Yadav P, Maharjan J, Korpole S, Prasad GS, Sahni G, Bhattarai T, Sreerama L. Production, purification, and characterization of thermostable alkaline xylanase from *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, 6: 65.
- [3] Mamo G, Thunnissen M, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie*, 2009, 91(9): 1187–1196.
- [4] Dey D, Hinge J, Shendye A, Rao M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(5): 436–442.
- [5] Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Schumann P, Weiss N, Stackebrandt E. *Cellulomonas bogoriensis* sp. nov., an alkaliphilic cellulomonad. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(4): 1711–1714.
- [6] Li F, Yang LY, Lv X, Liu DB, Xia HM, Chen S. Purification and characterization of a novel extracellular alkaline protease from *Cellulomonas bogoriensis*. *Protein Expression and Purification*, 2016, 121: 125–132.
- [7] Li F, Dong J, Lv X, Wen Y, Chen S. Recombinant expression and characterization of two glycoside hydrolases from extreme alkaliphilic bacterium *Cellulomonas bogoriensis* 69B4^T. *AMB Express*, 2020, 10(4): 2111–2115.
- [8] Umemoto H, Ihsanawati Inami M, Yatsunami R, Fukui T, Kumasaka T, Tanaka N, Nakamura S. Improvement of alkaliphily of *Bacillus* alkaline xylanase by introducing amino acid substitutions both on catalytic cleft and protein surface. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(4): 965–967.
- [9] Bai WQ, Xue YF, Zhou C, Ma YH. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN₅. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(11): 2093–2099.
- [10] Chang P, Tsai WS, Tsai CL, Tseng MJ. Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 319(3): 1017–1025.
- [11] Zhang GM, Mao LW, Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(12): 1915–1920.
- [12] Kumar V, Satyanarayana T. Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. *Extremophiles*, 2013, 17(5): 797–808.
- [13] Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. A thermostable alkaline active endo-beta-1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1492–1498.
- [14] Shang TT, Si DY, Zhang DY, Liu XH, Zhao LM, Hu C, Fu Y, Zhang RJ. Enhancement of thermoalkaliphilic xylanase production by *Pichia pastoris* through novel fed-batch strategy in high cell-density fermentation. *BMC Biotechnology*, 2017, 17(1): 55.
- [15] Wang GZ, Wu JJ, Yan RX, Lin J, Ye XY. A novel multi-domain high molecular, salt-stable alkaline xylanase from *Alkalibacterium* sp. SL3. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2120.
- [16] Liu Z, Zhao XQ, Bai FW. Production of xylanase by an alkaline-tolerant marine-derived *Streptomyces viridochromogenes* strain and improvement by ribosome engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(10): 4361–4368.
- [17] Guo B, Chen XL, Sun CY, Zhou BC, Zhang YZ. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo-β-1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1107–1115.
- [18] Huang X, Lin J, Ye X, Wang G. Molecular characterization of a thermophilic and salt-and alkaline-tolerant xylanase from *Planococcus* sp. SL4, a strain isolated from the sediment of a soda lake. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2015, 25(5): 662–671.

- [19] Liu XS, Huang ZQ, Zhang XN, Shao ZZ, Liu ZD. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and halophilic xylanase from *Zunongwangia profunda*. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 441–450.
- [20] Poosarla VG, Chandra T. Purification and characterization of novel halo-acid-alkali-thermo-stable xylanase from *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, 173(6): 1375–1390.
- [21] Zhao YY, Meng K, Luo HY, Huang HQ, Yuan TZ, Yang PL, Yao B. Molecular and biochemical characterization of a new alkaline active multidomain xylanase from alkaline wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(2): 327–334.
- [22] Valenzuela SV, Díaz P, Javier Pastor FI. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, 58(8): 4814–4818.
- [23] Somboon C, Boonrung S, Katekaew S, Ekprasert J, Aimi T, Boonlue S. Purification and characterization of low molecular weight alkali stable xylanase from *Neosartorya spinosa* UZ-2-11. *Mycoscience*, 2020, 61(3): 128–135.
- [24] Teo SC, Liew KJ, Shamsir MS, Chong CS, Bruce NC, Chan KG, Goh KM. Characterizing a halo-tolerant GH10 xylanase from *Roseithermus sacchariphilus* strain RA and its CBM-truncated variant. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(9): 2284.
- [25] Shi PJ, Du YL, Yang H, Huang HQ, Zhang X, Wang YR, Yao B. Molecular characterization of a new alkaline-tolerant xylanase from *Humicola insolens* Y1. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 149504.
- [26] Dubnovitsky AP, Kapetanidou EG, Papageorgiou AC. Enzyme adaptation to alkaline pH: atomic resolution (1.08 Å) structure of phosphoserine amino transferase from *Bacillus alcalophilus*. *Protein Science*, 2005, 14(1): 97–110.
- [27] Shirai T, Ishida H, Noda J, Yamane T, Ozaki K, Hakamada Y, Ito S. Crystal structure of alkaline cellulase K: insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 310(5): 1079–1087.
- [28] Yin YR, Zhang F, Hu QW, Xian WD, Hozzein WN, Zhou EM, Ming H, Nie GX, Li WJ. Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(4): 857–862.
- [29] Manikandan K, Bhardwaj A, Gupta N, Lokanath NK, Ghosh A, Reddy VS, Ramakumar S. Crystal structures of native and xylosaccharide-bound alkali thermostable xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27: structural insights into alkalophilicity and implications for adaptation to polyextreme conditions. *Protein Science*, 2006, 15(8): 1951–1960.
- [30] Goodarzi H, Torabi N, Najafabadi HS, Archetti M. Amino acid and Codon usage profiles: adaptive changes in the frequency of amino acids and codons. *Gene*, 2008, 407(1/2): 30–41.
- [31] Paul S, Bag SK, Das S, Harvill ET, Dutta C. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology*, 2008, 9(4): R70.
- [32] Rhodes ME, Fitz-Gibbon ST, Oren A, House CH. Amino acid signatures of salinity on an environmental scale with a focus on the dead sea. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(9): 2613–2623.

Expression, purification and characterization of xylanase from alkalinophilic bacterium *Cellulomonas bogoriensis* 69B4^T

Mingyi Yuan, Jiaying Dong, Ailing Chen, Sicheng Ju, Fan Li*

School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the production of alkaline xylanase from alkaliphilic bacterium *Cellulomonas bogoriensis* 69B4^T; clone the xylanase genes derived from this strain; and perform heterologous expression, purification, and characterization of the enzymatic properties. [Methods] We used the single-factor culture method to study the alkaline xylanase production of the strain and cloned five endo-xylanase genes through the homologous amplification. We expressed recombinant xylanases in *Escherichia coli* and purified them using the affinity chromatography. The enzymatic properties of purified enzymes were characterized using xylan as substrate. [Results] Five xylanases, i.e., Xyn370, Xyn393, Xyn425, Xyn466, and Xyn486, derived from *C. bogoriensis*69B4^T achieved heterologous expression in *E. coli* and obtained pure enzyme components. Their optimal temperature was 60 °C, 50 °C, 40 °C, 40 °C, and 60 °C, and the remaining enzyme activity was more than 90% when kept at 50 °C for 2 h. The optimum pH for Xyn370, Xyn393, Xyn425, Xyn466, and Xyn486 were 7.0, 8.0, 8.0, 8.0, and 9.0, respectively. The five recombinant xylanases had good stability at a pH range of 5.0–9.0 and showed good tolerance to some metal ions and high salt concentrations, and the enzyme activity on beech xylan was the highest. All xylanases were endo-xylanases. [Conclusion] The five recombinant xylanases expressed and purified in this paper have excellent salt and alkali resistance and are resistant to temperature, certain metal ions, and chemical reagents, providing novel enzymes for studying the alkali resistance mechanism and the industrial applications of the xylanase source.

Keywords: alkaliphilic bacterium, xylanase, heterologous expression, characterization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province (20180101346JC)

*Corresponding author. Tel: +86-431-85098130; E-mail: lif885@nenu.edu.cn

Received: 8 December 2020; Revised: 23 January 2021; Published online: 8 March 2021