



嗜冷嗜酸 β -1,4-木聚糖酶及其钙离子依赖型碳水化合物结合模块

葛慧华, 刘婷, 杨纯, 张光亚*

华侨大学生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

葛慧华, 刘婷, 杨纯, 张光亚. 嗜冷嗜酸 β -1,4-木聚糖酶及其钙离子依赖型碳水化合物结合模块[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3252-3263.

GE Huihua, LIU Ting, YANG Chun, ZHANG Guangya. Psychrophilic and acidophilic β -1,4-xylanase and its Ca^{2+} -dependent carbohydrate-binding module[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3252-3263.

摘要:【目的】 β -1,4-木聚糖酶是木聚糖降解的关键酶之一,嗜冷嗜酸木聚糖酶在功能性低聚木糖的制备中具有重要作用,但相关报道较少。【方法】从太平洋火色杆菌(*Flammeovirga pacifica*)菌株 WPAGA1 基因组发掘到一条新型的木聚糖酶序列,经基因合成、质粒构建和表达,并对其进行分离纯化及酶学性质研究。【结果】该木聚糖酶(Xyl4513)具有 2 个保守结构域,一个属于糖苷水解酶 11 家族(glycoside hydrolase family 11, GH11)催化模块(Xyl4513-T),另一个属于碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM) 60 家族(CBM4513),这是一种非常罕见的 GH11 家族木聚糖酶含有 CBM 的现象。纯化后的 Xyl4513 最适反应温度和 pH 值分别为 30 °C、3.0,这一特性说明 Xyl4513 为嗜冷嗜酸 β -1,4-木聚糖酶;而截短的木聚糖酶 Xyl4513-T 最适反应温度和 pH 值分别为 20 °C、4.0,且催化效率($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$)较前者下降了 20%,说明 CBM4513 对酶稳定性和催化效率有较大影响。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ni^{2+} 对酶催化活性均有明显促进作用,其中 Ca^{2+} 效果更为明显。仅当含有 Ca^{2+} 时,CBM4513 才对 β -1,4-木聚糖具有特异性结合能力,属于 Ca^{2+} 依赖型 CBM,其最大结合量为 9.13 $\mu\text{mol/g}$ 。【结论】本文获得了一种新型的嗜冷嗜酸木聚糖酶和相应的 Ca^{2+} 依赖型 CBM,进一步丰富了它们的基因和蛋白资源。

关键词: 木聚糖酶; Ca^{2+} 依赖型碳水化合物结合模块(CBM); 嗜冷嗜酸酶; 低聚木糖

资助项目: 福建省自然科学基金(2020J01079)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01079).

*Corresponding author. Tel: +86-592-6162302, E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

Received: 2022-12-08; Accepted: 2023-04-03; Published online: 2023-04-12

Psychrophilic and acidophilic β -1,4-xylanase and its Ca^{2+} -dependent carbohydrate-binding module

GE Huihua, LIU Ting, YANG Chun, ZHANG Guangya*

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: [Objective] β -1,4-xylanase is one of the key enzymes in the biodegradation of xylan. Psychrophilic and acidophilic xylanases play an important role in preparing functional xylooligosaccharides, whereas little is known about these enzymes. [Methods] We discovered a novel xylanase gene by functional annotation of the genome of the deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1. The sequence alignment suggested 60% identity of this sequence with the verified β -1,4-xylanase from *Clostridium saccharobutylicum* (ID: P17137). Then, we constructed the recombinant plasmid and transformed it into the host cells for expression. After purifying the enzyme by nickel column, we examined the enzyme properties. [Results] The full-length β -1,4-xylanase (Xyl4513) had two conserved domains: a catalytic module belonging to the glycoside hydrolase family 11 (Xyl4513-T) and a carbohydrate-binding module (CBM) belonging to family 60 (CBM4513). This was a rare phenomenon that the GH11 xylanase contained CBM. The purified Xyl4513 showed the highest activity at 30 °C and pH 3.0, being a psychrophilic and acidophilic β -1,4-xylanase. The truncated β -1,4-xylanase (Xyl4513-T) demonstrated the highest activity at 20 °C and pH 4.0 and the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) 20% lower than that of Xyl4513, indicating the positive effects of CBM on the stability and catalytic performance of β -1,4-xylanase. In addition, Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Ni^{2+} improved the catalytic activities, and Ca^{2+} showed the best performance. Only in the presence of Ca^{2+} , CBM4513 had the specific binding ability to β -1,4-xylan, demonstrating a Ca^{2+} -dependent CBM, and the maximum binding amount was 9.13 $\mu\text{mol/g}$. [Conclusion] We obtained a novel psychrophilic and acidophilic β -1,4-xylanase with a Ca^{2+} -dependent CBM, which enriched the related gene and protein resources. The findings of this study will provide valuable information for exploring the stability, catalytic mechanism, and engineering of xylanases and CBMs.

Keywords: xylanase; Ca^{2+} -dependent carbohydrate-binding module (CBM); psychrophilic and acidophilic enzyme; xylooligosaccharide

木聚糖是植物细胞壁中主要的结构多糖，在自然界中含量仅次于纤维素，约占地球上可再生碳源的三分之一^[1]。木聚糖降解形成的低聚木糖(xylooligosaccharides, XOS)具有调节血糖、降低血脂、润肠通便和增强人体免疫力的功能，在功能性保健食品等方面具有重要作用。据估计，XOS的全球市场额在2023年可达

73.3 亿美元，而利用木聚糖酶制备 XOS 是其重要方式^[2]，使用低温、嗜酸的木聚糖酶既能减少化学酸水解方法中的盐酸和硫酸用量，又能降低反应温度，减少能量的消耗，同时还能提高水解效率和产物得率^[3]，使得工艺过程更绿色、环保，更符合绿色化学的理念。

然而，目前研究较多的是用于纸浆漂白的

耐热-耐碱木聚糖酶以及在面包制作中使用的耐热-耐酸木聚糖酶^[4]。相比之下,可用于功能性食品生产或饲料添加剂的嗜冷、嗜酸木聚糖酶的研究相对较少^[5-6]。

β -1,4-木聚糖酶大多属于糖水解酶(glycoside hydrolase, GH) 10 和 11 家族^[7]。和许多 GH 类似,木聚糖酶也有碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM),它能增加酶对不溶性底物的结合能力,进而提高酶催化活性,对糖水解酶的研究和应用具有重要价值,是当前酶学研究领域的热点^[8]。截至目前,CAZy 数据库已将 CBM 分成了 94 个家族(<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>),其中,第 36 和 60 家族主要是钙离子依赖的木聚糖结合 CBM^[9]。多数情况下,GH10 家族的木聚糖酶包含催化模块和能识别木聚糖的 CBM(一般属于 CBM 2、4、6、13、15 和 22 家族)^[10]。而 GH11 家族木聚糖酶结构更为简单,仅包含催化模块,含有 CBM 的情况非常罕见(如来源于 *Paenibacillus campinasensis* 的 GH11 家族木聚糖酶 XynNTU 包含催化模块和第 6 家族的 CBM)^[11]。鉴于 CBM 在提高木聚糖酶催化活性方面的重要作用,有研究者通过理性构建木聚糖酶和 CBM 的嵌合体,发现融合 CBM 3 和 GH11 木聚糖酶后,其释放还原糖的能力最高提升了 3 倍^[12];而将源于 *Dictyoglomus thermophilum* 的 GH11 木聚糖酶和 CBM 9 融合后所得的嵌合体在 pH>9.0、温度为 90 °C 时活力较单酶提高了 4 倍^[13]。由此可见,CBM 在酶分子设计及改造方面颇具应用潜力。因此,寻找和发现新型嗜冷嗜酸木聚糖酶及其相应的 CBM 能丰富基因和蛋白资源,为研究 CBM 和酶协同作用机制提供更多范例,为设计和改造木聚糖酶提供新工具。

本课题组在前期研究中,从分离自深海的

太平洋火色杆菌(*Flammeovirga pacifica*)中发现了一种新型钙离子依赖型 CBM 及相应 1,3-木聚糖酶(EC 3.2.1.32)催化模块^[14]。基于此,推测该菌基因组中可能还存在其他功能类似的 CBM。通过对其基因组数据进行注释和发掘,发现了一条蛋白序列与数据库收录经验证的内切- β -1,4-木聚糖酶(Uniprot ID 号: P17137,来源于 *Clostridium saccharobutylicum*)最高相似度约为 60%的木聚糖酶序列(NCBI 数据库 ID 号: WP_052431876;命名为: Xyl4513),发现其中也包含一段注释为疑似钙离子依赖的 CBM 序列。经实验验证表明,该酶是一种新型嗜冷嗜酸 1,4-木聚糖酶,该 CBM(命名为: CBM4513)为钙离子依赖型,这是 GH11 家族木聚糖酶中首次发现的钙离子依赖型 CBM;对完整和截短的木聚糖酶理化性质以及 CBM4513 对酶催化性能的影响也作了较系统研究。

1 材料与amp;方法

1.1 目的基因构建

对来源于深海的太平洋火色杆菌(*F. pacifica*) WPAGA1^[15]基因组进行功能注释,经筛选发掘到完整的 β -1,4-木聚糖酶(命名为: Xyl4513),由催化模块和一个碳水化合物结合模块组成,将其从中间切开,合成截短的 β -1,4-木聚糖酶(命名为: Xyl4513-T)和碳水化合物结合模块(命名为: CBM4513),并根据该蛋白质序列设计并合成其编码基因。

由苏州金唯智生物科技有限公司合成并经测序验证的编码 Xyl4513、Xyl4513-T 和 CBM4513 的基因序列,通过 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点将目的基因 *Xyl4513*、*Xyl4513-T* 和 *CBM4513* 克隆到 pET-22b(+). 最后将该质粒导入宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行表达。

1.2 重组蛋白诱导表达

将适量含有表达载体的大肠杆菌加入含氨苄青霉素钠的 LB 液体培养基中, 摇床 37 °C、200 r/min 培养 9–12 h。后转至含磷酸盐缓冲液和氨苄青霉素钠的超级肉汤(terrific broth, TB)培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 3–4 h; 当菌液 OD_{600} 达 0.5–0.6 时, 加入适量异丙基-1 硫代- β -D-半乳糖苷(isopropyl-1 thio- β -D-galactoside, IPTG)溶液, 在 20 °C、160 r/min 培养 20 h 并诱导表达。

1.3 重组蛋白分离纯化及浓度测定

将表达后的菌液 4 000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 加入 Tris-HCl (pH 7.0)缓冲液混匀, 4 °C、10 000 r/min 离心收集沉淀; 将菌体与 Tris-HCl (pH 7.0)缓冲液按 1:20 体积比混合, 重悬菌体后, 超声破碎。超声条件: 功率 300 W、工作 2 s、停顿 4 s、超声次数 150–200 次。细胞破碎后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清即为粗酶液, 用 0.45 μ m 滤膜过滤后经镍柱纯化。蛋白纯度用 SDS-PAGE 确认, 使用 GIS-2008 凝胶成像系统成像。用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度^[16]。

1.4 木聚糖酶学性质测定

木聚糖酶活性测定: 通过二硝基水杨酸(DNS)显色法测定水解产物含量^[17], 定糖时以木糖为标准。一个酶活力单位(U)定义为在 1 min 内从 β -1,4-木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量, 比活力定义为每毫克蛋白所含酶活力单位(U/mg)。

最适温度测定: 将 β -1,4-木聚糖酶与 1%的底物分别在 10、20、25、30、40、45、50、55、60、70 °C 条件下反应, 测定酶活力, 定义最高酶活为 100%, 计算其他条件下的相对酶活。

最适 pH 测定: 测定酶在不同 pH 的缓冲液(Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液: pH 3.0–8.0, 含有 1%

β -1,4-木聚糖溶液)的活力, 定义最高酶活力为 100%, 计算其他条件下的相对酶活。

温度稳定性测定: 将酶在不同温度下(30、35、40、45、50 °C)分别孵育 5、10、15、20、25 min, 以初始酶活力为 100%, 计算其他条件相对酶活。

pH 稳定性测定: 将酶在不同 pH 条件下(3、4、5、6)分别孵育 0.25、0.75、1.75、3.75 h 和 7.75 h, 以初始酶活力为 100%, 计算其他条件相对酶活。

金属离子及化学试剂对酶活力影响: 以最适条件下酶活力为对照, 测定酶在含有终浓度为 10 mmol/L 金属阳离子(Na^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+})的酶活力, 计算出相对酶活。

米氏常数的测定: 配制浓度 1–10 mg/mL 的 β -1,4-木聚糖(上海迈坤化工有限公司, 源自玉米)溶液, 在最适反应条件下反应 30 min, 测定酶活力, 利用米氏方程计算出 K_m 和 V_{max} 值, 测定酶浓度并计算 k_{cat} 值。

1.5 CBM4513 底物结合特性测定

向 2 mL 离心管中加入 500 μ L 浓度为 10 mg/mL 不溶性 β -1,4-木聚糖(取一定量的木聚糖放入适量的缓冲液室温充分搅拌 10 min, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 沉淀即为不溶性木聚糖)溶液, 再加入 500 μ L CBM4513 溶液, 室温孵育 1 h, 然后 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 除去不溶性多糖, 测定上清液中的蛋白浓度。对照保持其他条件不变, 将 CBM4513 替换成牛血清白蛋白(BSA)。

CBM4513 的底物特异性: 按上述方法将 β -1,4-木聚糖替换成 β -1,3-木聚糖和地衣多糖, 以确定 CBM4513 结合特异性。

金属离子对 CBM4513 结合能力的影响: 上

述体系分别加入金属离子(20 mmol/L Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 和 K^+)，以含有底物但不含金属离子的溶液作为对照。

Ca^{2+} 浓度对 CBM4513 结合能力的影响：向上述体系中分别加入不同浓度(0、5、10、20、30、40、50、100、200 mmol/L) CaCl_2 ，孵育 1 h，计算结合能力。

含 β -1,4-木聚糖的亲凝胶电泳：为了更清晰地了解 CBM4513 和底物的结合，进行了含或不含 1% β -1,4-木聚糖和 20 mmol/L Ca^{2+} 的 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳工作条件为 100 V 和 4 $^{\circ}\text{C}$ ，时间 2 h，以 BSA 为阴性对照。

CBM4513 吸附常数测定：在 20 mmol/L Ca^{2+} 存在下，将梯度浓度的 CBM4513 蛋白(100–500 mg/mL)添加到反应体系中。根据方程式(1)计算吸附常数。

$$[\text{PC}] = [\text{PC}]_{\text{max}} [\text{P}] / (K_d + [\text{P}]) \quad \text{式(1)}$$

其中， K_d (微摩尔)是平衡解离常数， $[\text{P}]$ 是上清液中未结合蛋白的浓度($\mu\text{mol/L}$)， $[\text{PC}]$ 和 $[\text{PC}]_{\text{max}}$ (微摩尔每克 β -1,4-木聚糖)分别是结合蛋白的浓度和最大结合蛋白量。

上述所有实验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白的表达及纯化

完整的 β -1,4-木聚糖酶(命名为：Xyl4513)包含 2 个模块，第一个注释为催化模块，该模块属于 GH11 家族(命名为：Xyl4513-T)，第二个为 C 端疑似 CBM 的结构域(命名为：CBM4513)。为了验证 C 末端结构域是否为 CBM，构建了 2 个截短的突变体(Xyl4513-T 和 CBM4513)。将含有 *Xyl4513*、*Xyl4513-T* 和 *CBM4513* 基因的 pET 22b(+)载体转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达，并分别在含 0.1 mmol/L IPTG 的培养基中培养。经超声破碎、离心及镍柱亲和层析得到纯化的 Xyl4513、Xyl4513-T 和 CBM4513。SDS-PAGE 结果如图 1 所示，由图可知，在分子量分别为 33、24 和 11 kDa 的附近出现了上述 3 个分子的相应条带，其分子量与由 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算出的相应理论值 33.16、24.25 和 10.96 kDa 接近，证明上述 3 个目标蛋白均得到纯化，其纯度均大于 96%，可用于后续实验研究。

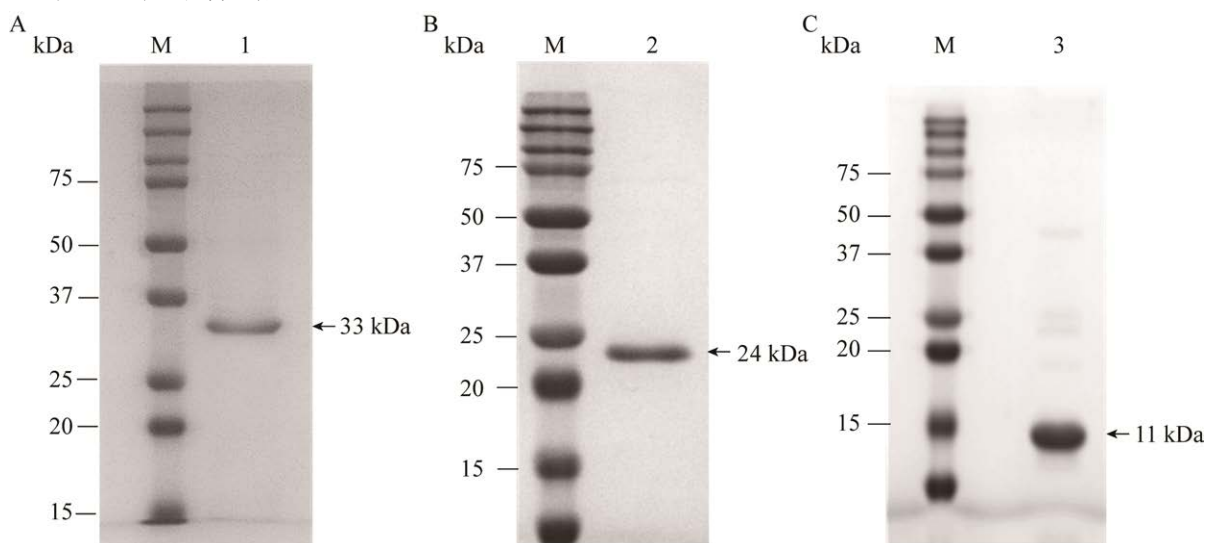


图 1 重组蛋白 SDS-PAGE 验证

Figure 1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins. A: Xyl4513. B: Xyl4513-T. C: CBM4513. M: Molecular mass markers; Lane 1: Xyl4513; Lane 2: Xyl4513-T; Lane 3: CBM4513.

2.2 完整和截短 β -1,4-木聚糖酶的酶学性质研究

测定了木聚糖酶(Xyl4513 和 Xyl4513-T)的最适反应温度, 结果如图 2 所示。由图 2A 可知, Xyl4513 最适温度为 30 °C, 温度高于 45 °C 后, 酶活力下降明显, 说明完整的木聚糖酶 Xyl4513 对热不稳定性。有研究者对嗜热、嗜冷酶进行了分类, 把最适温度在 30 °C 左右, 且具有低温下酶活力较高而在高温不稳定特征的酶称为嗜冷酶^[18], 基于此, 木聚糖酶 Xyl4513 可归属为嗜冷酶。目前, 对于嗜冷木聚糖酶的研究不多, 目前报道的一些嗜冷木聚糖酶大多属于 GH10 家族^[5,19-20]、GH8 家族^[21], 且基本不包含相应的 CBM。因此, 该酶的发现可以进一步丰富木聚糖酶的资源库。由图 2B 可知, Xyl4513-T 的最适温度仅为 20 °C, 且在温度高于 30 °C 之后, 其活力明显下降, 相比完整的 β -1,4-木聚糖酶, 缺少了 CBM 结构域之后的 Xyl4513-T 热稳定性更差。这种现象在包含 CBM 的木聚糖酶也有报道, 如 Ali 等^[22]发现缺

少 CBM22 之后的 GH10 家族木聚糖酶 Xyn10C 最适温度由 80 °C 变为 60 °C, 而 CBM 对提高酶热稳定性有帮助也得到了相关研究的证实^[23]。这从侧面说明完整的 β -1,4-木聚糖酶 C-端包含的可能也是 CBM。

测定了二者的最适反应 pH, 结果如图 3 所示。可以发现 2 种酶的活力变化趋势基本相同, 在酸性条件下酶活力较高, 但均随 pH 升高而逐渐降低, Xyl4513 和 Xyl4513-T 的最适反应 pH 分别为 3.0 和 4.0, 但前者 pH 的适应范围更宽。该木聚糖酶的嗜酸稳定性有望在动物饲料中具有潜在用途, 因为它可以在动物消化道的酸性环境中保持结构和功能, 从而能提高饲料养分利用率^[24]。此外, 在 pH 2.5–3.0 和 pH 4.0–8.0 条件下, 完整的 β -1,4-木聚糖酶(Xyl4513) 酶活力高于截短的 β -1,4-木聚糖酶(Xyl4513-T)。相似的结果也出现在来自 *Clostridium josui* 的木聚糖酶 Xyn10A, 在去掉 CBM22 之后, 其 pH 由 6.0 变为 8.0^[10]。这也从侧面说明完整的 β -1,4-木聚糖酶中 C-端可能也是 CBM。

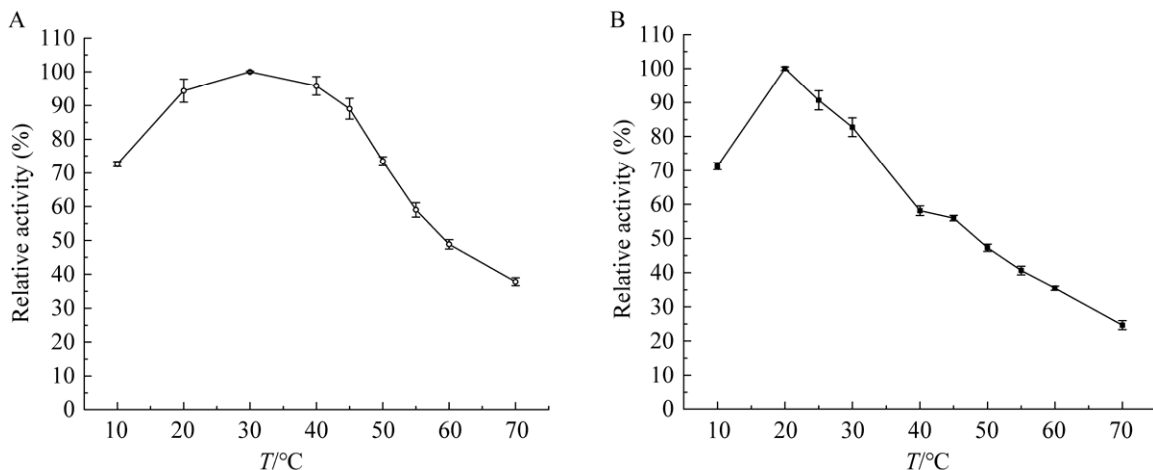


图 2 温度对 β -1,4-木聚糖酶酶活力的影响

Figure 2 Effects of temperature on the activities of β -1,4-xylanase. A: Xyl4513. B: Xyl4513-T. Error bars: The standard deviation of triplicate assays.

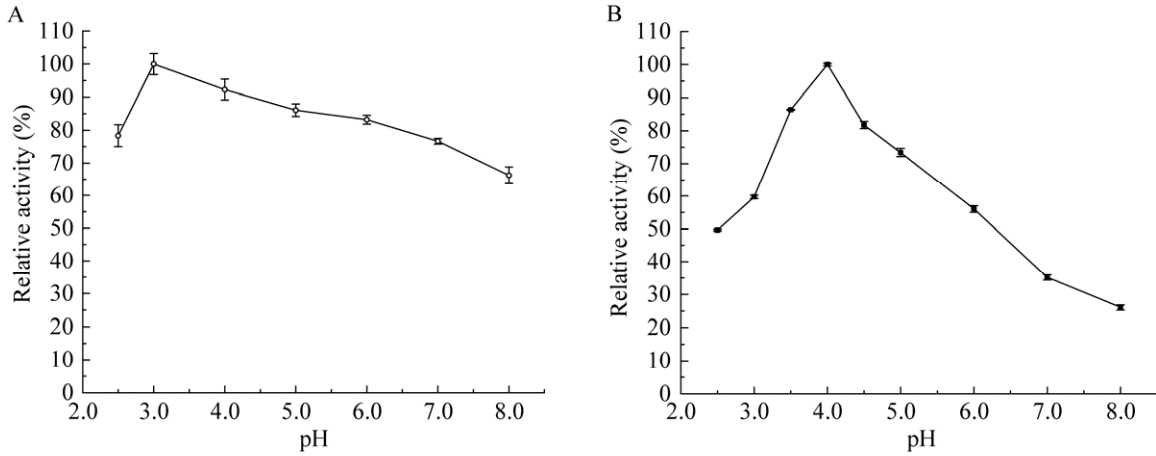


图3 pH对 β -1,4-木聚糖酶活力的影响

Figure 3 Effects of pH on the activities of β -1,4-xylanase. A: Xyl4513. B: Xyl4513-T Error bars. The standard deviation of triplicate assays.

测定了二者的热稳定性,结果如图4所示。可以看出,在不同温度孵育一段时间的过程中, β -1,4-木聚糖酶的酶活力随时间延长逐渐降低,但完整的 β -1,4-木聚糖酶活力的下降速率比截短的更慢。例如:在30 °C下孵育25 min后,Xyl4513和Xyl4513-T分别保留了初始酶活的92%和72%;在40 °C下孵育1 h后,二者分别保留了初始酶活的83%和58%,这表明C端结构域的缺失降低了木聚糖酶的热稳定性。这

也与之前报道的CBM会影响酶热稳定性结果类似^[19-21,25]。同时,测定了二者的pH稳定性,结果如图5所示。可以看出,Xyl4513在pH为3.0和4.0的缓冲液中孵育7.75 h后,仍然保留80%以上的初始酶活,说明该 β -1,4-木聚糖酶在酸性环境中具有较好的稳定性。二者活力均随着时间的延长逐渐降低,但完整的 β -1,4-木聚糖酶活力下降更慢,同样说明C端结构域对 β -1,4-木聚糖酶pH稳定性有帮助。

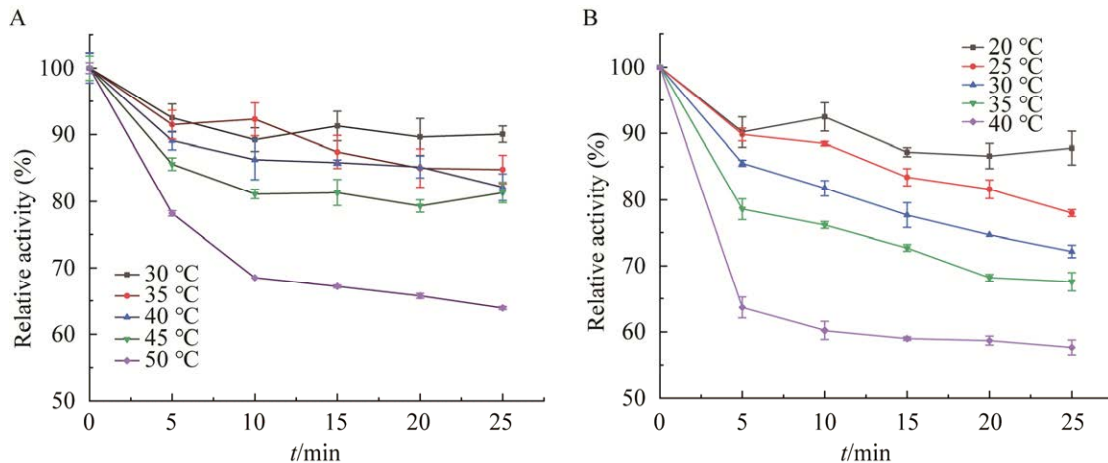


图4 温度对 β -1,4-木聚糖稳定性的影响

Figure 4 The influences of temperature on the stability of β -1,4-xylanase. A: Xyl4513. B: Xyl4513-T. Error bars: The standard deviation of triplicate assays.

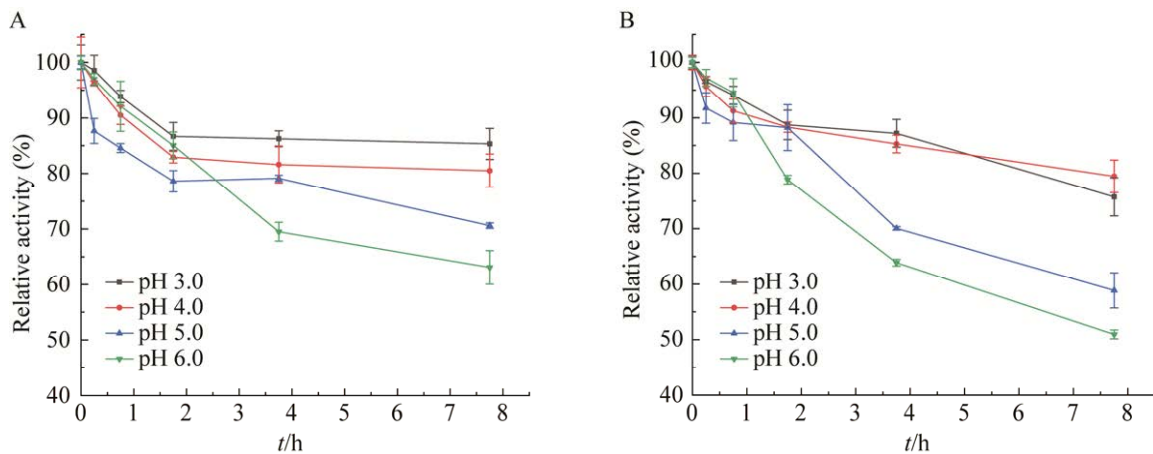


图5 pH对 β -1,4-木聚糖稳定性的影响

Figure 5 The influences of pH on the stability of β -1,4-xylanase. A: Xyl4513. B: Xyl4513-T. Error bars: The standard deviation of triplicate assays.

测定了金属离子对二者活力的影响, 结果如表1所示。除了 Na^+ 和 Ba^{2+} , 其他金属离子对Xyl4513和Xyl4513-T酶活影响的趋势基本一致。 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Fe^{3+} 对Xyl4513和Xyl4513-T酶活力均有较强的抑制作用, 相对酶活都降至65%以下, 其中尤以 Co^{2+} (45.75%、39.28%)抑制作用最强; 而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ni^+ 都对 β -1,4-木聚糖酶的酶活力有较强促进作用, 这与其他木聚糖酶中观察到的现象相似^[26]。

测定了二者的酶反应动力学参数, 其结果列于表2。可以看到, Xyl4513-T的 K_m 值比Xyl4513略大, 表明Xyl4513-T对底物的亲和力有所降低。对于催化效率(k_{cat}/K_m), Xyl4513-T比Xyl4513低20%, 二者之间的差异达到显著水平($P < 0.05$), 表明截短的 β -1,4-木聚糖酶(Xyl4513-T)的催化效率显著降低。这说明C-端结构域能明显提高酶催化效率, 而这正是CBM的重要特征^[27]。上述2种Xyl4513和Xyl4513-T在催化性能方面的差异都提示C-端结构域很有

可能是CBM。因此, 接下来的实验需进一步直接证实该猜测。

表1 不同金属离子对XYL4513和XYL4513-T酶活力的影响

Table 1 The influences of metal ions on the activity of the Xyl4513 and Xyl4513-T

Metal ion	Relative activity (%)	
	Xyl4513	Xyl4513-T
Control	100.00	100.00
K^+	93.17±0.60	81.90±1.93
Zn^{2+}	62.56±1.98	51.70±0.36
Mn^{2+}	61.32±2.51	48.44±0.66
Ba^{2+}	90.02±3.53	110.10±2.10
Mg^{2+}	122.99±5.18	151.25±1.76
Cu^{2+}	53.76±2.77	51.91±0.36
Ca^{2+}	121.02±3.61	159.88±2.10
Co^{2+}	45.75±3.88	39.28±0.96
Ni^{2+}	110.77±3.61	118.57±2.46
Fe^{3+}	52.45±1.81	43.07±2.85
Na^+	88.31±2.34	102.84±2.10

表 2 XYL4513 和 XYL4513-T 的动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of the Xyl4513 and Xyl4513-T

Xylanases	K_m (mg/mL)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m
Xyl4513	2.99±0.79	45.76±4.24	15.31±1.42
Xyl4513-T	3.05±0.14	38.24±0.04*	12.54±0.02*

* means the differences between them are significant ($P < 0.05$).

2.3 完整 β -1,4-木聚糖酶 C-端结构域的功能验证

为了证实完整 β -1,4-木聚糖酶 C-端结构域的功能,使用纯化的 CBM4513 蛋白进行了下列实验。

测定了该蛋白与不同底物结合情况,结果如表 3 所示。可以看出, CBM4513 蛋白对 β -1,4-木聚糖, β -1,3-木聚糖和地衣多糖均未结

合(以牛血清白蛋白为对照)。前期生物信息学分析 CBM4513 序列时推测其属于 CBM 60 家族,可能具有 Ca^{2+} 依赖的底物结合能力。为此,将 20 mmol/L 的 Ca^{2+} 添加到结合系统中,结果发现:在 Ca^{2+} 存在的情况下, CBM4513 蛋白(终浓度为 28 μ mol/L)与 β -1,4-木聚糖具有结合能力, β -1,4-木聚糖可吸附约 27.5% (占初始蛋白质浓度的百分比)的 CBM4513 蛋白,但 β -1,3-木聚糖和地衣多糖仍然不能与之结合。此外,在 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 存在时, CBM4513 蛋白也不能与 β -1,4-木聚糖结合。由此可见, CBM4513 蛋白极有可能是一种可特异性结合 β -1,4-木聚糖的 Ca^{2+} 依赖型 CBM,它不能结合 β -1,3-木聚糖,这是由于 CBM 的结合特异性不仅取决于单糖组成,它们之间糖苷键的连接位置也非常重要^[28]。

表 3 CBM4513 与不溶性底物的结合

Table 3 CBM4513 binding to insoluble substrates

Substrate	CBM binding (% of initial concentration)					
	BSA	CBM	CBM+ Ca^{2+}	CBM+ Na^+	CBM+ Mg^{2+}	CBM+ K^+
β -1,4-xylan	98.95±0.13	97.67±1.19	72.49±0.34	99.81±0.27	99.15±0.67	98.20±0.13
β -1,3-xylan	99.24±0.54	99.71±0.55	99.81±0.41	ND	ND	ND
Lichenin	99.52±0.40	99.24±0.54	99.53±1.21	ND	ND	ND

The results given (means±S.D.) are the residual protein concentrations as percentages of the initial protein concentration. ND: No data available.

通过使用 β -1,4-木聚糖的亲凝胶电泳进一步证实了 CBM4513 的依赖 Ca^{2+} 结合底物的能力。从图 6 可以看出, CBM4513 在同时含有 β -1,4-木聚糖和 Ca^{2+} 的凝胶中被延迟,其迁移率为 0.77,而在仅含有 β -1,4-木聚糖和未添加任何其他物质的凝胶中均未观察到电泳延迟,其迁移率均为 0.87 (图 6A、6B),而在上述条件下,牛血清白蛋白在凝胶中的移动距离都没有改变,但存在钙离子的亲和凝胶电泳迁移率较低,这也证明了 CBM4513 具有钙离子依赖的 β -1,4-木聚糖结合能力。

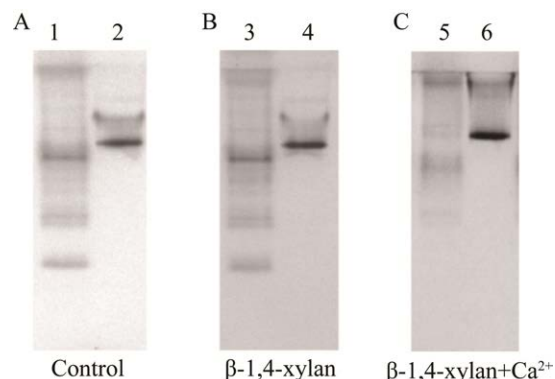


图 6 CBM4513 的非变性亲和凝胶电泳

Figure 6 Affinity gel electrophoresis of CBM4513. A: Control (without β -1,4-xylan and Ca^{2+}). B: With xylan (no Ca^{2+}). C: With xylan and Ca^{2+} . Lane 1, 3, and 5: BSA; Lane 2, 4, and 6: CBM4513.

考虑到 Ca^{2+} 对 CBM4513 的结合能力起关键作用, 研究了 Ca^{2+} 浓度对 CBM4513 (终浓度为 $28 \mu\text{mol/L}$) 与 β -1,4-木聚糖结合的影响, 结果如图 7 所示。当不存在 Ca^{2+} 时, CBM4513 无结合能力, 有 Ca^{2+} 存在的情况下, CBM4513 与不溶性 β -1,4-木聚糖的结合能力在一定范围内与 Ca^{2+} 的浓度相关, 浓度升高结合能力也增强, 当 Ca^{2+} 的浓度达到 20 mmol/L 时, CBM4513 的结合能力基本趋于稳定。

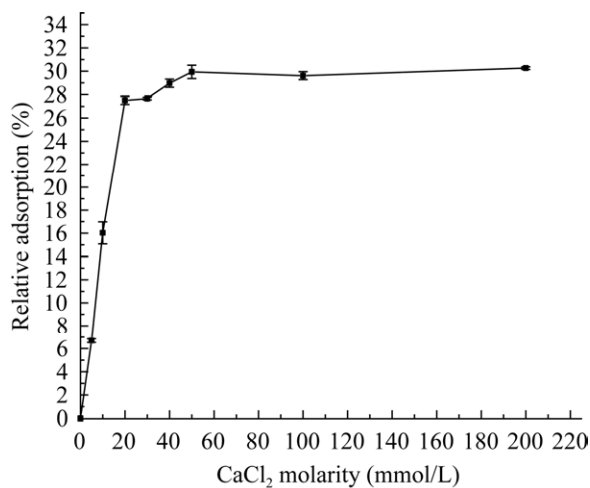


图 7 Ca^{2+} 对吸附的影响

Figure 7 Effects of Ca^{2+} on adsorption. Error bars: The standard deviation of triplicate assays.

考察了 CBM4513 浓度对保留率(被底物吸附的蛋白量占初始蛋白量的百分比)的影响, 结果如图 8 所示。在 20 mmol/L Ca^{2+} 存在下, 保留率随 CBM4513 浓度的增加而降低。当 CBM4513 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 保留率最高, 可达 67.2% (图 8A), 浓度为 $15 \mu\text{mol/L}$ 时, 保留率接近 50% 。同时, 测定了以不溶性 β -1,4-木聚糖为底物的 CBM4513 的吸附常数, 如图 8B 所示, 其结合曲线类似于酶催化反应速度与底物浓度的双倒数图。根据计算, 其 K_d 值为 $2.81 \mu\text{mol/L}$, 最大结合量 $[\text{PC}]_{\text{max}}$ 为每克 β -1,4-木聚糖结合 $9.13 \mu\text{mol}$ CBM4513。与 *Rhodothermus marinus* 中发现的木聚糖 CBM 相比(K_d 值和 $[\text{PC}]_{\text{max}}$ 分别为 0.74 和 $16.00 \mu\text{mol}^{[28]}$), CBM4513 与 β -1,4-木聚糖的吸附常数(K_d)和最大结合量($[\text{PC}]_{\text{max}}$)与之存在一定差距。与同来源的特异性结合 1,3-木聚糖的 CBM3088 相比(K_d 值和 $[\text{PC}]_{\text{max}}$ 分别为 $17.88 \mu\text{mol}$ 和 $9.65 \mu\text{mol}^{[14]}$), 二者最大结合量接近, 但 CBM4513 的吸附常数显著小于前者, 表明 CBM4513 对底物有更好的亲和能力, 具有一定的理论和实际研究价值。

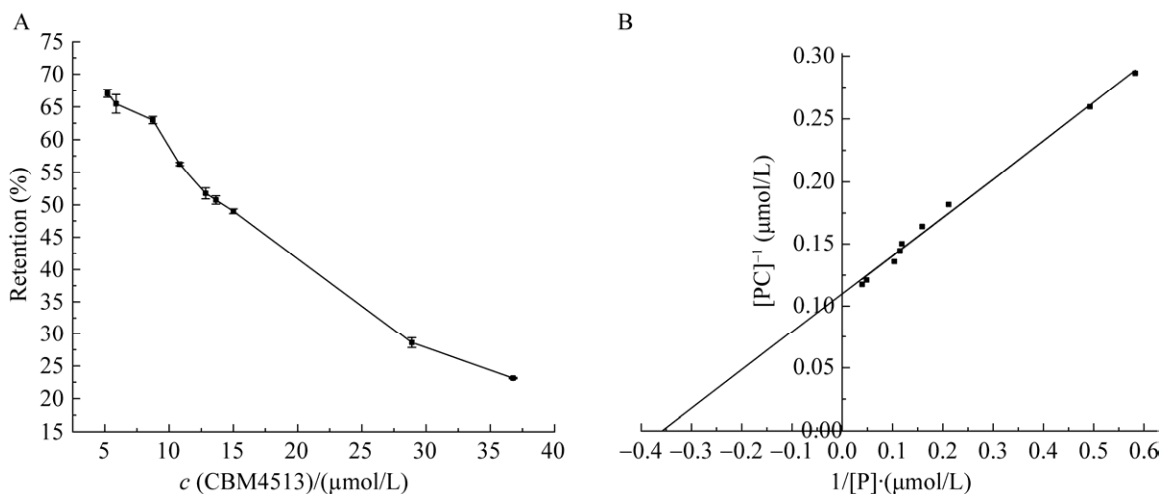


图 8 蛋白质浓度对保留率的影响(A)和 CBM 与 β -1,4-木聚糖结合的双倒数图(B)

Figure 8 Effects of protein concentration on retention rate (A) and double-reciprocal plot of CBM binding to β -1,4-xylan (B). Error bars: The standard deviation of triplicate assays.

3 结论

本研究经实验验证了一个属于 GH11 家族新型嗜冷嗜酸 β -1,4-木聚糖酶(Xyl4513), 其最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 3.0, 更为罕见的是, 其中包含一个催化域和钙离子依赖的特异性结合 1,4-木聚糖的 CBM (属于 CBMs 第 60 家族)。该催化域(Xyl4513-T)最适反应温度仅为 20 °C、最适 pH 为 4.0, 这说明 CBM 对酶学性质具有一定的影响。研究结果表明 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 均对二者催化效率有促进作用, 并且 Ca^{2+} 的作用最为明显。20 mmol/L Ca^{2+} 能够有效促进碳水化合物结合模块(CBM4513)与 β -1,4-木聚糖特异性结合, 最大结合量为 9.13 $\mu\text{mol/g}$ 。本研究结果不仅丰富了 GH11 家族木聚糖酶和 CBM 第 60 家族的基因和蛋白资源, 也为木聚糖酶的合理设计及实际应用提供了参考, 为探索酶分子在低温、酸性条件下的稳定性提供了良好的研究材料, 也为探寻 CBM 依赖钙离子 1,4-木聚糖结合能力的分子机制奠定了基础, 相关的研究正在不断深入进行中。

参考文献

- [1] BIELY P, SINGH S, PUCHART V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(7): 1260-1274.
- [2] YAN F, TIAN SQ, DU K, XUE XA, GAO P, CHEN ZC. Preparation and nutritional properties of xylooligosaccharide from agricultural and forestry byproducts: a comprehensive review[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 977548.
- [3] HAN ZG, SHANG-GUAN F, YANG JK. Characterization of a novel cold-active xylanase from *Luteimonas* species[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(8): 123.
- [4] KUMAR V, MARÍN-NAVARRO J, SHUKLA P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(2): 34.
- [5] 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*[J]. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 441-450.
- [6] SHENG P, LI YS, MARSHALL SDG, ZHANG HY. High genetic diversity of microbial cellulase and hemicellulase genes in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(7): 16545-16559.
- [7] FOROOZANDEH SHAHRAKI M, FARHADYAR K, KAVOUSI K, AZARABAD MH, BOROOMAND A, ARIAEENEJAD S, HOSSEINI SALEKDEH G. A generalized machine-learning aided method for targeted identification of industrial enzymes from metagenome: a xylanase temperature dependence case study[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(2): 759-769.
- [8] ARMENTA S, MORENO-MENDIETA S, SÁNCHEZ-CUAPIO Z, SÁNCHEZ S, RODRÍGUEZ-SANOJA R. Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules[J]. *Proteins*, 2017, 85(9): 1602-1617.
- [9] JAMAL-TALABANI S, BORASTON AB, TURKENBURG JP, TARBOURIECH N, DUCROS VMA, DAVIES GJ. Ab initio structure determination and functional characterization of CBM36: a new family of calcium-dependent carbohydrate binding modules[J]. *Structure (London, England: 1993)*, 2004, 12(7): 1177-1187.
- [10] WU XY, SHI ZL, TIAN WY, LIU MY, HUANG SX, LIU XL, YIN H, WANG LS. A thermostable and CBM2-linked GH10 xylanase from *Thermobifida fusca* for paper bleaching[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 939550.
- [11] WANG L, WANG Y, CHANG S, GAO Z, MA J, WU B, HE B, WEI P. Identification and characterization of a thermostable GH11 xylanase from *Paenibacillus campinasensis* NTU-11 and the distinct roles of its carbohydrate-binding domain and linker sequence[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 209: 112167.
- [12] PINHEIRO MP, REIS RAG, DUPREE P, WARD RJ. Plant cell wall architecture guided design of CBM3-GH11 chimeras with enhanced xylanase activity using a tandem repeat left-handed β -3-prism scaffold[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1108-1118.

- [13] TALENS-PERALES D, SÁNCHEZ-TORRES P, MARÍN-NAVARRO J, POLAINA J. *In silico* screening and experimental analysis of family GH11 xylanases for applications under conditions of alkaline pH and high temperature[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 198.
- [14] LIU T, YI ZW, ZENG RY, JIANG W, ZHANG G. The first characterization of a Ca²⁺-dependent carbohydrate-binding module of β-1,3-xylanase from *Flammeovirga pacifica*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131: 109418.
- [15] XU H, FU YY, YANG N, DING ZX, LAI QL, ZENG RY. *Flammeovirga pacifica* sp. nov., isolated from deep-sea sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt_4): 937-941.
- [16] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [18] PUCCI F, ROOMAN M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 42: 117-128.
- [19] KIM DY, KIM J, LEE YM, LEE JS, SHIN DH, KU BH, SON KH, PARK HY. Identification and characterization of a novel, cold-adapted D-xylobiose- and D-xylose-releasing endo-β-1,4-xylanase from an Antarctic soil bacterium, *Duganella* sp. PAMC 27433[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 680.
- [20] HE JL, LIU L, LIU XY, TANG K. Isolation and characterization of a novel cold-active, halotolerant endoxylanase from *Echinicola rosea* sp. nov. JL3085T[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 245.
- [21] LI X, ZHANG L, JIANG ZT, LIU L, WANG JH, ZHONG LL, YANG T, ZHOU Q, DONG WL, ZHOU J, YE XF, LI ZK, HUANG Y, CUI ZL. A novel cold-active GH8 xylanase from cellulolytic myxobacterium and its application in food industry[J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133463.
- [22] ALI E, ZHAO GS, SAKKA M, KIMURA T, OHMIYA K, SAKKA K. Functions of family-22 carbohydrate-binding module in *Clostridium thermocellum* Xyn10C[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(1): 160-165.
- [23] CHEN XL, ZHAO F, YUE YS, ZHANG XY, ZHANG YZ, LI PY. A new group of modular xylanases in glycoside hydrolase family 8 from marine bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01785-18.
- [24] HONG JS, LEE JW, PETERSSON D, WOYENGO TA. Nutritive value of enzyme-supplemented carinata meal for growing pigs[J]. *Translational Animal Science*, 2019, 3(4): 1359-1368.
- [25] ALI E, ARAKI R, ZHAO GS, SAKKA M, KARITA S, KIMURA T, SAKKA K. Functions of family-22 carbohydrate-binding modules in *Clostridium josui* Xyn10A[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(12): 2389-2394.
- [26] ESCUDER-RODRÍGUEZ JJ, GONZÁLEZ-SUAREZ M, DECASTRO ME, SAAVEDRA-BOUZA A, BECERRA M, GONZÁLEZ-SISO MI. Characterization of a novel thermophilic metagenomic GH5 endoglucanase heterologously expressed in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 76.
- [27] 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[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2284.
- [28] ABOU HACHEM M, NORDBERG KARLSSON E, BARTONEK-ROXÂ E, RAGHOTHAMA S, SIMPSON PJ, GILBERT HJ, WILLIAMSON MP, HOLST O. Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies[J]. *The Biochemical Journal*, 2000, 345(Pt 1): 53-60.