



一种瘤胃木聚糖酶的酶学特性分析及其对农作物秸秆的水解作用

汤龙章¹, 邱清华¹, 刘婵娟¹, 付戴波², 欧阳克蕙¹, 赵向辉^{1*}

1 江西农业大学, 动物营养与饲料江西省重点实验室, 江西 南昌 330045

2 九江市农业科学院, 江西 九江 332013

汤龙章, 邱清华, 刘婵娟, 付戴波, 欧阳克蕙, 赵向辉. 一种瘤胃木聚糖酶的酶学特性分析及其对农作物秸秆的水解作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3840-3852.

TANG Longzhang, QIU Qinghua, LIU Chanjuan, FU Daibo, OUYANG Kehui, ZHAO Xianghui. Enzymatic properties and straw-degrading effect of a xylanase derived from rumen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3840-3852.

摘要: 【目的】研究重组木聚糖酶 rRuXyn024 的酶学特性及其对农作物秸秆的水解作用。【方法】从肉牛瘤胃中克隆 *RuXyn024* 基因, 运用生物信息学工具对该基因序列进行详细分析; 构建表达载体 pET-RuXyn024, 并将其转化入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中, 实现 RuXyn024 的异源表达; 对 rRuXyn024 的酶学特性进行深入分析, 并研究其对农作物秸秆的降解能力。【结果】RuXyn024 编码 358 个氨基酸, 大小约为 40 kDa, 属于 GH 10 家族。rRuXyn024 的最适 pH 和温度分别为 7.0 和 40 °C, 在 pH 6.0–9.0 和 30–70 °C 下能分别保持最大活性的 60% 和 70% 以上。以麦秸木聚糖为底物时, rRuXyn024 的 K_m 值和 V_{max} 值分别为 18.8 g/L 和 82.6 $\mu\text{g}/\text{min}$ 。1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、EDTA 和 SDS, 5 mmol/L 的 Ca^{2+} 和 β -巯基乙醇对 rRuXyn024 具有明显的抑制作用, 其中 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 β -巯基乙醇使 rRuXyn024 接近失活。 Mn^{2+} 对 rRuXyn024 具有明显促进作用, 1 mmol/L、5 mmol/L 的 Mn^{2+} 使 rRuXyn024 的活性分别提高了 46.9% 和 35.8%。rRuXyn024 水解麦秸木聚糖产生了以木三糖和木二糖为主的寡糖产物。rRuXyn024 能够有效水解玉米秸、稻秸、豆秸和油菜秸, 其中对玉米秸的水解作用最强。【结论】rRuXyn024 具有宽泛的 pH 和温度适应性, 在改善农作物秸秆的反刍动物利用方面具有较大的应用潜力。

资助项目: 江西省自然科学基金重点项目(20224ACB205007); 江西省重点研发计划(20232BBF60009); 中央引导地方科技发展专项资金(20221ZDF03017); 江西农业大学年轻科研创新团队项目(JXAUCXTD008)

This work was supported by the Natural Science Foundation Key Project of Jiangxi Province (20224ACB205007), the Key Research and Development Plan of Jiangxi Province (20232BBF60009), the Central Government Guidance for Local Science and Technology Development Special Fund (20221ZDF03017), and the Young Scientific Research and Innovation Team Project of Jiangxi Agricultural University (JXAUCXTD008).

*Corresponding author. E-mail: zhaoxh001@163.com

Received: 2024-04-09; Accepted: 2024-07-16; Published online: 2024-07-19

关键词: 木聚糖酶; 酶学特性; 农作物秸秆; 水解作用

Enzymatic properties and straw-degrading effect of a xylanase derived from rumen

TANG Longzhang¹, QIU Qinghua¹, LIU Chanjuan¹, FU Daibo², OUYANG Kehui¹, ZHAO Xianghui^{1*}

¹ Jiangxi Province Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

² Jiujiang Academy of Agricultural Sciences, Jiujiang 332013, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To investigate the enzymatic properties and straw-degrading effect of a recombinant xylanase rRuXyn024. **[Methods]** We cloned *RuXyn024* from the rumen of beef cattle and used bioinformatics tools for detailed sequence analysis. The expression vector pET-RuXyn024 was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for heterologous expression of RuXyn024. Furthermore, the enzymatic properties and straw-degrading effect of rRuXyn024 were examined. **[Results]** RuXyn024 was composed of 358 amino acid residues and had a molecular weight of approximately 40 kDa, belonging to the GH 10 family. The optimal pH and temperature of rRuXyn024 were pH 7.0 and 40 °C, respectively. The relative activity of RuXyn024 at pH 6.0–9.0 and 30–70 °C remained above 60% and 70%, respectively. With xylan from wheat straw as the substrate, rRuXyn024 showcased the K_m and V_{max} of 18.8 g/L and 82.6 $\mu\text{g}/\text{min}$, respectively. The activity of rRuXyn024 was inhibited by Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , EDTA, and SDS at 1 mmol/L and 5 mmol/L, as well as 5 mmol/L Ca^{2+} and β -mercaptoethanol. Cu^{2+} and β -mercaptoethanol at 5 mmol/L nearly inactivated the enzyme. Mn^{2+} at 1 mmol/L and 5 mmol/L increased the activity of rRuXyn024 by 46.9% and 35.8%, respectively. The degradation of xylan from wheat straw by rRuXyn024 produced oligosaccharides, including xylotriose and xylobiose. rRuXyn024 could degrade maize straw, rice straw, soybean straw, and rapeseed straw, with the strongest degrading effect on maize straw. **[Conclusion]** rRuXyn024 exhibits tolerance to broad scopes of pH and temperature and significant potential for improving the utilization of straw by ruminants.

Keywords: xylanase; enzymatic properties; straw; degrading effect

我国作为农业大国, 拥有丰富的秸秆资源, 2021年主要农作物秸秆资源产量约7.33亿t^[1]。目前, 秸秆资源的利用途径主要包括肥料化、饲

料化和能源化, 其中饲料化利用约占秸秆资源总量的25%^[2], 主要应用于反刍动物养殖业。农作物秸秆中含有丰富的纤维素和半纤维素等结构

性碳水化合物,是反刍动物有效纤维和能量的主要来源。然而,大多数农作物秸秆质地坚硬,纤维物质间结构交联复杂,严重限制了瘤胃微生物及其水解酶的黏附和渗透,致使秸秆的瘤胃消化率通常不超过 50%^[3-5]。一些物理和化学加工方法,如蒸汽爆破、酸和碱处理,可以通过破坏秸秆中的木质素-碳水化合物复合体和纤维素结晶度来提高秸秆的瘤胃消化率^[6-8],同时将秸秆表皮以内的营养物质暴露出来供动物利用。然而,昂贵的设备要求、高能耗,以及对动物和环境的高风险是这些技术面临的主要问题^[9]。相比之下,生物酶在农业秸秆加工利用中表现出的高效性、专一性和温和的反应条件,引起了研究人员的极大兴趣^[10]。探索一种能够高效降解秸秆的生物酶,对于提升秸秆资源的利用效率和促进农业可持续发展具有重要意义。

木聚糖是植物细胞壁中半纤维素的主要组成骨架,与木质素共同包裹纤维素,阻碍了反刍动物瘤胃对秸秆纤维物质的利用^[11]。去除木聚糖可以破坏植物细胞壁,增加秸秆的孔隙率和比表面积,进而提高纤维素的可消化性^[12]。木聚糖酶是木聚糖水解过程中的关键酶^[13]。在木质纤维底物中添加木聚糖酶,不仅可以降解半纤维素中的木聚糖,还可以通过增加纤维素酶对纤维素的可及性提高纤维素的水解效率^[14]。然而,我们课题组先前的研究发现,尽管木聚糖酶在以木聚糖为底物时均显示出较高的活性,但并非所有的木聚糖酶都能有效降解秸秆^[15-16]。这一发现指出,秸秆的有效降解需要特定高效木聚糖酶的参与。本研究从肉牛瘤胃中克隆了一种木聚糖酶基因(*RuXyn024*),分析了该重组酶(*rRuXyn024*)的酶学特性和对农作物秸秆的水解能力,发现 *rRuXyn024* 能够有效地水解玉米、稻草等农作物秸秆,这为通过 *rRuXyn024*

改善农作物秸秆在反刍动物生产中的利用提供了数据支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、*E. coli* BL21(DE3)购自北京全式金生物技术股份有限公司;质粒 pET-28a(+)、瘤胃液相微生物 DNA 为实验室前期保存;限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶、同源重组试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;磁珠法土壤和粪便基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 木聚糖酶基因的克隆、序列分析及表达载体的构建

根据本实验室测序得到的瘤胃微生物宏基因组数据(NCBI Bioproject: PRJNA806344)设计木聚糖酶 *RuXyn024* 引物 *RuXyn024-F* (5'-CTTTAAGAAGGAGATATACCATATGGCCATTGCCGACTGACAAC-3') 和 *RuXyn024-R* (5'-CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGAGTTGAATAGTTTGTGATAATGTC-3'),分别引入含 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点的同源臂(下划线部分)。

使用磁珠法土壤和粪便基因组 DNA 提取试剂盒,参照说明书提取瘤胃液 DNA。以瘤胃液相微生物 DNA 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:2×PCR buffer (含 Mg²⁺, dNTPs) 25.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 2.0 μL,模板 DNA 0.6 μL, Hieff Canace® Plus-High Fidelity DNA Polymerase (1 U/μL) 1.0 μL, ddH₂O 补至 50.0 μL。PCR 反应条件:98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。对扩增出的 *RuXyn024* 基因片段进行割胶回收。利用 *Nde* I 和 *Xho* I 对载体 pET-28a(+)进行双酶切,通过核

酸电泳对大的载体片段进行割胶回收。通过同源重组试剂盒将 2 个片段连接, 命名为 pET-RuXyn024, 通过热激转入 *E. coli* Top10 感受态, 提取重组质粒进行酶切鉴定和测序分析。利用 MEGA 11、Phyre2、Discovery Studio 等软件进行 RuXyn024 系统发育树的构建、同源建模和分子对接^[17]。分子对接过程中采用木四糖代替木聚糖作为对接底物。将验证正确的 pET-RuXyn024 转入 *E. coli* BL21(DE3), 挑取阳性转化子, 获得表达菌株。

1.3 rRuXyn024 的诱导表达

将表达菌株接种于 2 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养过夜, 再以 1% 的接种量转接至 50 mL 相同培养基的 500 mL 三角瓶中, 同等条件培养至菌体的 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG), 20 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 诱导培养 20 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液重悬菌体, 于冰浴中利用超声波破碎细胞, 离心获得上清(粗酶液), 将上清进行 SDS-PAGE 检测, 并通过 Western blotting 进行验证。

1.4 rRuXyn024 的酶学特性

以麦秸木聚糖为底物, 探究 rRuXyn024 的最适 pH、最适温度、温度耐受性、底物特异性、酶促动力学参数, 以及离子、抑制剂对 rRuXyn024 活性的影响等酶学特性。使用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 比色法测定还原糖生成量。最适 pH 的测定选用如下缓冲体系: 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 3.0–7.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–9.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.0)。将含 1% 麦秸木聚糖、粗酶液和不同缓冲液组成的反应混合液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 孵育 10 min, 加入 DNS 溶液

终止反应, 沸水浴 10 min, 冷却后于 540 nm 处比色, 测定 OD 值。根据木聚糖标准曲线计算 rRuXyn024 的酶活性。在最适 pH 下, 将反应混合液分别在 30、40、50、60 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 下, 100 r/min 振荡孵育 10 min, 测定 rRuXyn024 活性, 确定 rRuXyn024 的最适温度。将粗酶液分别在 30、35、40、45、50、55 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 下预处理 10 min, 随后于最适条件测定 rRuXyn024 的残留活性, 以未处理酶样活性为 100%, 分析 rRuXyn024 的温度耐受性。以 1% 的木聚糖、微晶纤维素、壳聚糖、羧甲基纤维素钠为底物, 在最适条件下测定 rRuXyn024 的活性, 分析 rRuXyn024 的底物特异性。在反应体系中分别添加 1 mmol/L、5 mmol/L 的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、EDTA、SDS、 β -巯基乙醇、DTT, 以及 0.10%、0.50% 的 Tween-20 和 Triton X-100, 研究金属离子和抑制剂对 rRuXyn024 活性的影响。无添加物的反应体系为对照组, 活性为 100%。以 0.1%–2.0% 的麦秸木聚糖为底物, 最适条件下分析 rRuXyn024 的活性, 利用 GraphPad Prism 8.0 软件计算 rRuXyn024 的酶促动力学参数 K_m 和 V_{\max} 。

1.5 rRuXyn024 的产物分析

以 1.0% 的麦秸木聚糖为底物, 与 rRuXyn024 在最适条件下, 100 r/min 振荡孵育 10 min, 之后根据本实验室之前报道的方法, 利用高效液相色谱分析反应液中的木糖、木二糖、木三糖、木四糖和木五糖等水解产物^[15]。

1.6 rRuXyn024 对农作物秸秆的水解

选取未经处理的稻秸、麦秸、玉米秸、豆秸和油菜秸原样, 将其粉碎至 40 目的粒度。分别以 5% 的上述农作物秸秆作为底物, 加入 0.16 U 的 rRuXyn024 在最适条件下, 100 r/min 振荡孵育 6 h, 测定产生的还原糖, 分析 rRuXyn024 对各农作物秸秆的水解能力。

2 结果与分析

2.1 pET-RuXyn024 表达载体的构建和 RuXyn024 的序列分析

以瘤胃液相微生物 DNA 为模板, 扩增出 *RuXyn024* 基因, 将其与线性化的表达载体 pET-28a(+)连接, 转化至 *E. coli* Top10 中。挑取转化子过夜培养, 对其菌液进行 PCR 鉴定, 结果可见一条大小约 1 100 bp 的明显条带(图 1A)。提取质粒并进行测序分析, 得出 *RuXyn024* 的基因长度为 1 077 bp, 编码 358 个氨基酸, 理论分子量大小为 40 kDa。利用 EMBL-EBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对 *RuXyn024* 的氨基酸序列, 选择相似性较高的 50 个蛋白, 利用 MEGA 11 软件构建 *RuXyn024* 的系统发育树(图 1B)。利用 NCBI 的 CDD (conserved domain database) 工具对 *RuXyn024* 的结构域进行分析, 显示 *RuXyn024* 含有糖苷水解酶家族 10 结构域, 属于糖苷水解酶家族 10。利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线同源建模, 结果如图 2A 所示。利用木四糖代替木聚糖与 *RuXyn024* 结构进行对接, 显示木四糖与 23 个氨基酸残基通过氢键、范德华力等产生了交互作用(图 2B)。对距离木四糖 3 Å 范围内的氨基酸进行丙氨酸扫描, 结果显示 ASN55、TRP95、TYR188、TRP316、HIS221、TRP324、LYS58、TRP328、GLY263 等氨基酸突变成丙氨酸后, 获得的突变能均大于 0.5 kcal/mol。

利用木四糖代替木聚糖与 *RuXyn024* 结构进行对接, 显示木四糖与 23 个氨基酸残基通过氢键、范德华力等产生了交互作用(图 2B)。对距离木四糖 3 Å 范围内的氨基酸进行丙氨酸扫描, 结果显示 ASN55、TRP95、TYR188、TRP316、HIS221、TRP324、LYS58、TRP328、GLY263 等氨基酸突变成丙氨酸后, 获得的突变能均大于 0.5 kcal/mol。

2.2 rRuXyn024 的表达和酶学特性分析

在低温下利用 IPTG 对重组 r*RuXyn024* 大肠杆菌 BL21(DE3)菌株进行诱导, 细胞通过超声破碎, 离心获取上清, 通过 SDS-PAGE 检测上清粗酶液中 r*RuXyn024* 的表达情况, 并经 Western blotting 对 r*RuXyn024* 的表达做进一步确认(图 3A)。结果显示, 与未重组大肠杆菌(泳道 1)相比, r*RuXyn024* 在重组菌株中得到了大量表达(泳道 3), 该结果得到了 Western blotting 结果的证实。然而, 大部分的 r*RuXyn024* 以包涵体的形式存在于破碎后的沉淀中, 其可溶性表达量较低(泳道 2)。

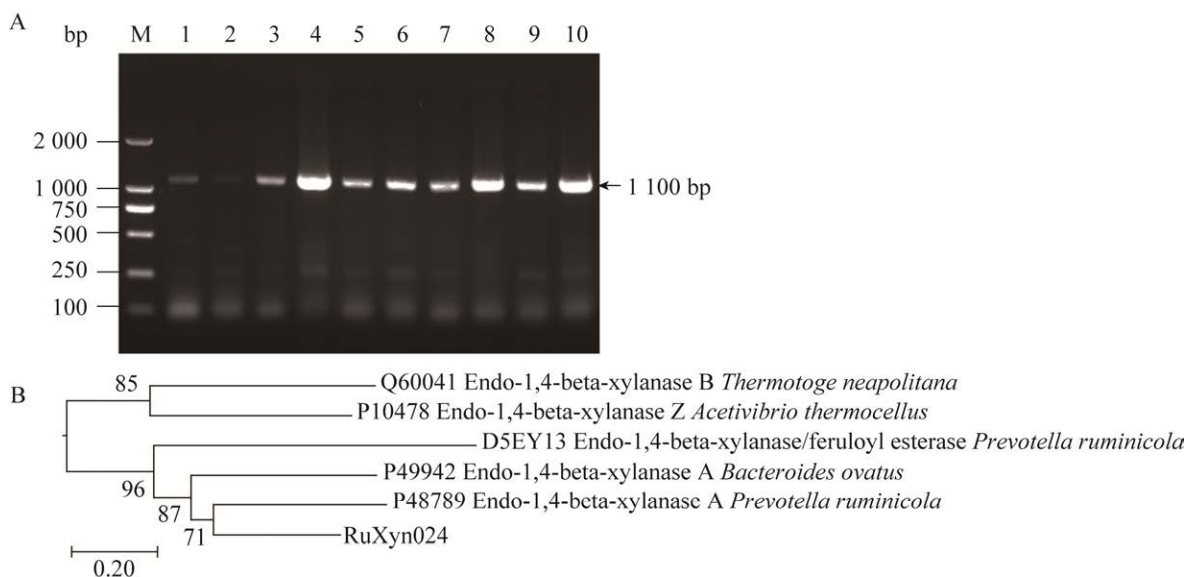


图 1 *RuXyn024* 的转化子鉴定(A)及其系统发育树(B) 泳道 M: 核酸 Marker; 泳道 1–10: 转化子的 PCR 产物图

Figure 1 Identification of the transformants of *RuXyn024* (A) and its phylogenetic tree (B). Lane M is the nucleic acid marker; Lanes 1–10 are the PCR products of the transformants.

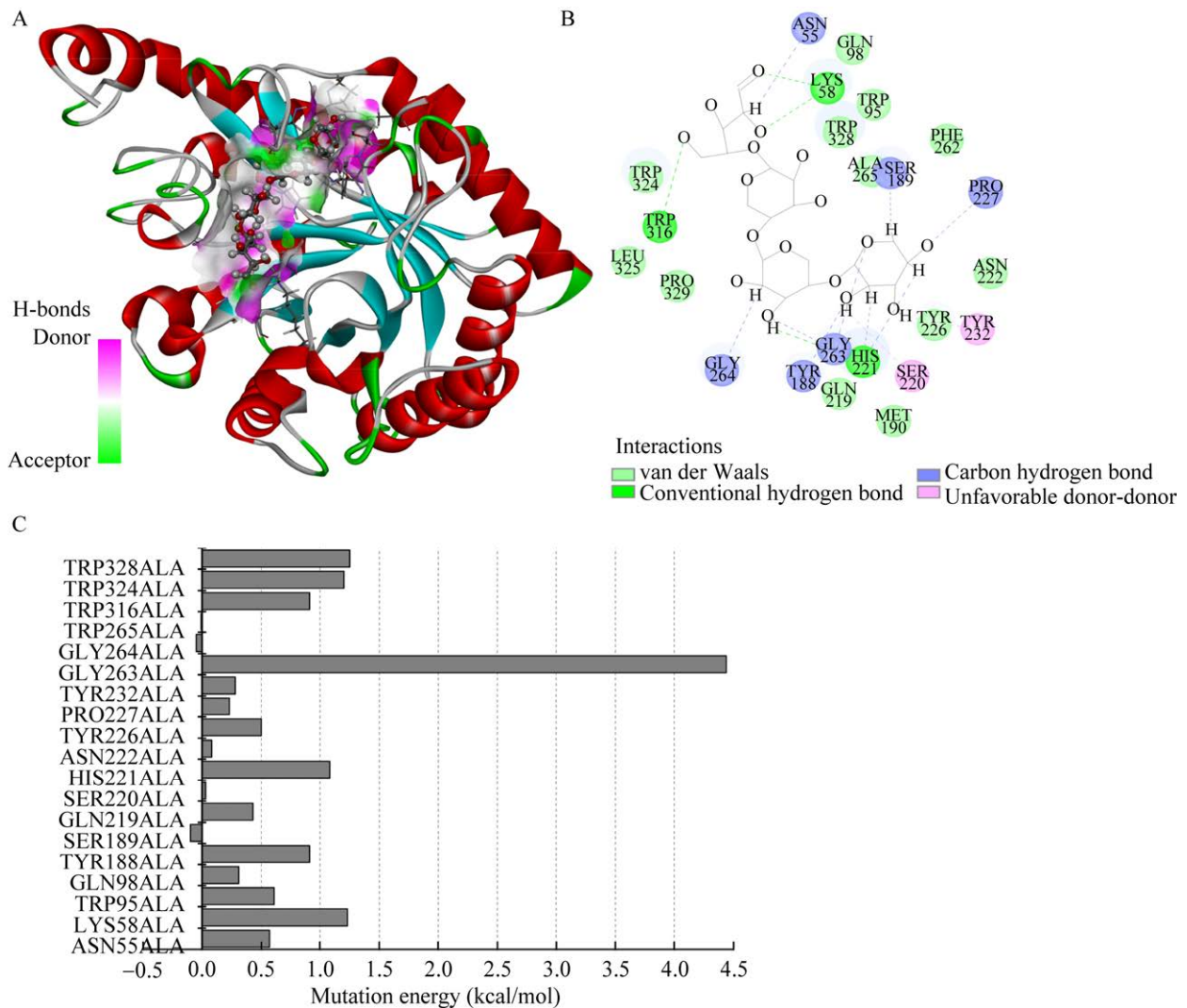


图 2 RuXyn024 的同源建模、分子对接和丙氨酸扫描

Figure 2 Homology modeling, molecular docking, and alanine scanning of RuXyn024. A: Homology modeling and molecular docking of RuXyn024. B: The interaction between ligand molecule and the amino acids of RuXyn024. C: Alanine scanning of RuXyn024.

首先探讨了 rRuXyn024 的最适 pH、温度以及对高温的耐受性。结果显示, rRuXyn024 的最适 pH 受缓冲液组成影响, 在 pH 7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中表现出最大活性, 在 pH 6.0–7.0 (磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)、pH 7.0–8.0 (Tris-HCl 缓冲液) 和 pH 9.0 (甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 下保持最大活性的 60% 以上, 但在 pH 5.0 以下和 pH 10.0 以上则活性明显降低(图 3B)。随

着温度的升高, rRuXyn024 活性呈现出先增加后降低的趋势, 在 40 °C 时达到最大。除了 40 °C 外, rRuXyn024 在 30–70 °C 间能保持最大活性的 70% 以上, 表明 rRuXyn024 具有宽泛的反应温度(图 3C)。温度耐受性方面, rRuXyn024 经 30–55 °C 预处理 10 min 后, 其残余活性仍有 80% 以上, 但当预处理温度超过 55 °C, 其残余活性呈断崖式下降, 直至 60 °C 时完全失去活性。

底物特异性结果显示, rRuXyn024 对木聚糖表现出最大的降解活性, 对羧甲基纤维素钠和壳聚糖存在微弱的活性, 对微晶纤维素无活性, 表明木聚糖是 rRuXyn024 的最佳作用底物(图 3D)。酶促动力学结果显示, rRuXyn024 的 K_m 和 V_{max}

值为 18.8 g/L 和 82.6 $\mu\text{g}/\text{min}$ (数据未列出)。

金属离子、抑制剂以及洗涤剂对 rRuXyn024 活性的影响如表 1 所示: 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 K^+ 、 Na^+ 以及 1 mmol/L Ca^{2+} 对 rRuXyn024 活性无明显影响, 但 5 mmol/L Ca^{2+} 则使 rRuXyn024

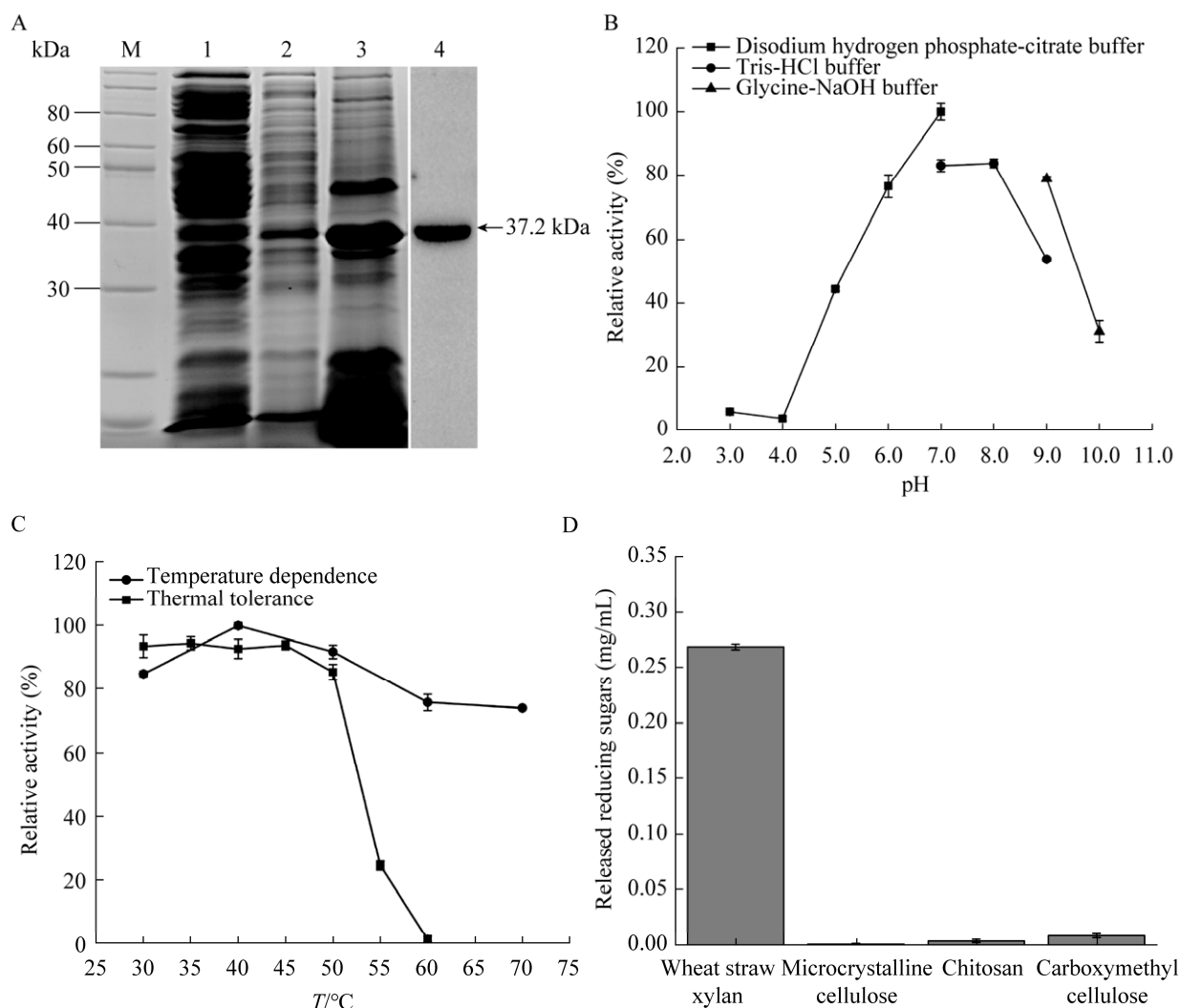


图 3 rRuXyn024 的表达和酶学特性分析

Figure 3 Expression and enzymatic characterization of rRuXyn024. A: SDS-PAGE and Western blotting analysis of rRuXyn024. M: Protein marker; Lane 1: Untransformed *E. coli* cell lysate; Lane 2: Disrupted supernatant of *E. coli* expressing recombinant rRuXyn024; Lane 3: Cell lysate of *E. coli* with recombinant rRuXyn024; Lane 4: Western blotting analysis of rRuXyn024. B: pH dependence of rRuXyn024. C: The optimal reaction temperature and temperature stability of rRuXyn024. D: Substrate specificity of rRuXyn024.

表 1 金属离子、抑制剂以及洗涤剂对 rRuXyn024 活性的影响

Table 1 The effects of metal ions, inhibitors, and detergents on the activity of rRuXyn024

Item	Concentration	Relative activity (%)	Item	Concentration	Relative activity (%)
K ⁺	1 mmol/L	97.20±2.15	EDTA	1 mmol/L	42.10±0.56
	5 mmol/L	98.50±0.85		5 mmol/L	29.10±1.67
Ca ²⁺	1 mmol/L	97.10±2.36	SDS	1 mmol/L	50.40±1.52
	5 mmol/L	47.90±2.50		5 mmol/L	3.40±2.70
Na ⁺	1 mmol/L	99.80±3.29	β-mercaptoethanol	1 mmol/L	81.40±2.19
	5 mmol/L	106.80±1.60		5 mmol/L	7.90±1.05
Mg ²⁺	1 mmol/L	74.90±4.08	Tween-20	0.10% (V/V)	91.50±1.45
	5 mmol/L	50.80±1.49		0.50% (V/V)	86.50±1.55
Zn ²⁺	1 mmol/L	74.50±5.42	Triton X-100	0.10% (V/V)	90.40±1.49
	5 mmol/L	41.30±0.32		0.50% (V/V)	96.30±2.39
Cu ²⁺	1 mmol/L	53.00±2.40	DTT	1 mmol/L	85.60±3.08
	5 mmol/L	2.20±0.22		5 mmol/L	88.30±1.28
Mn ²⁺	1 mmol/L	146.90±6.58			
	5 mmol/L	135.80±2.61			
Ni ²⁺	1 mmol/L	53.10±5.23			
	5 mmol/L	28.60±2.63			

活性降低了 52.1%；Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺和 Ni²⁺对 rRuXyn024 活性表现出明显的抑制作用，尤其 5 mmol/L 的 Cu²⁺几乎使 rRuXyn024 完全失活。然而，Mn²⁺明显增强了 rRuXyn024 的活性，其中 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 Mn²⁺分别使 rRuXyn024 活性提高了 46.9%和 35.8%，表明 Mn²⁺是 rRuXyn024 的强促进剂。

Tween-20、Triton X-100、二硫苏糖醇以及 1 mmol/L 的 β-巯基乙醇对 rRuXyn024 的抑制作用相对较小，但 EDTA、SDS 和 5 mmol/L 的 β-巯基乙醇则严重降低了 rRuXyn024 的活性。DTT 对 rRuXyn024 的影响较小，然而 5 mmol/L 的 β-巯基乙醇却几乎使 rRuXyn024 完全失活。

2.3 rRuXyn024 的酶解产物分析

rRuXyn024 酶解麦秸木聚糖的产物如图 4 所示，木三糖和木二糖的产量较高，分别占 5 种产

物总和的 44.9%和 30.5%；木四糖和木五糖次之，分别占到 12.5%和 9.5%；木糖产量最低，仅占到 5 种产物总和的 2.6%。

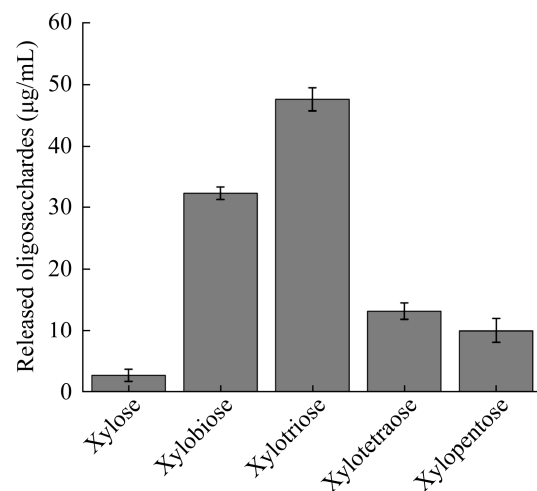


图 4 rRuXyn024 的酶解产物分析

Figure 4 Analysis of enzymatic hydrolysis products of rRuXyn024.

2.4 rRuXyn024 对秸秆的水解

rRuXyn024 对 5 种农作物秸秆的水解作用如图 5 所示, rRuXyn024 对玉米秸的水解作用最强, 稻秸次之, 豆秸和油菜秸稍弱, 麦秸最弱。

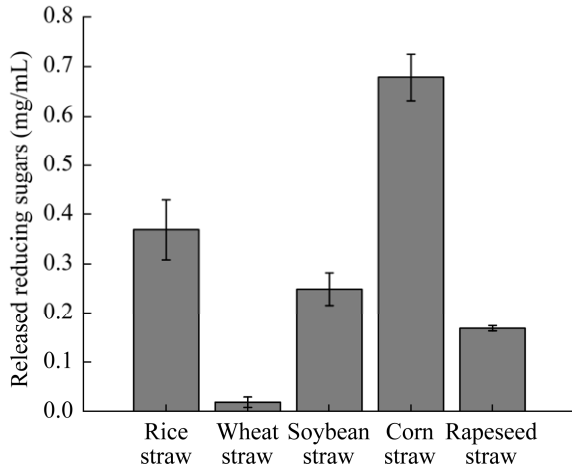


图 5 rRuXyn024 对农作物秸秆的水解作用
Figure 5 The hydrolytic effect of rRuXyn024 on crop straws.

3 讨论

3.1 pET-RuXyn024 表达载体的构建和 RuXyn024 的序列分析

系统发育树分析揭示了 RuXyn024 与栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)(登录号: P48789)的 β -1,4-内切木聚糖酶亲缘关系最近。

同源建模进一步证实了 RuXyn024 具有糖苷水解酶家族 10 的典型结构特点, 即 β 折叠被 α 螺旋包裹形成的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构^[16]。丙氨酸扫描结果表明, 突变使木四糖与 RuXyn024 的结合力下降, 进而说明以上氨基酸可能是影响 RuXyn024 活性的关键氨基酸。其中 GLY263 突变成丙氨酸后突变能达到 4.4 kcal/mol, 表明 GLY263 可能在 RuXyn024 的酶解过程中发挥着尤为重要的作用。

3.2 rRuXyn024 的表达和酶学特性分析

通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 确认了 rRuXyn024 的成功表达, 并且该酶主要以包涵体形式存在。进一步对上清中 rRuXyn024 的酶学特性进行了分析, 并与部分木聚糖酶进行了对比(表 2)。

rRuXyn024 表现出广泛的 pH 依赖性, 在 pH 5.0–9.0 时, 其残余酶活力能够保持在 60% 以上, 这与 Joshi 等^[18]报道的一种源于温泉的木聚糖酶相似。然而超出该 pH 范围时, 其酶活力急剧下降, 这可能是因为过高或过低 pH 易压缩蛋白质的三维结构, 使其稳定性下降, 进而导致酶活性降低^[24]。通过分析温度对 rRuXyn024 的影响, 发现其在 30–70 °C 均能保持较高活性, 这比已报道的其他木聚糖酶^[17,19]具有更宽泛的反应温度。rRuXyn024 的耐热性分析结果表明,

表 2 rRuXyn024 与部分木聚糖酶的对比
Table 2 Comparison of rRuXyn024 with some xylanases

Source	Molecular weight (kDa)	Optimum pH and temperature	Substrate	Main xylo-oligosaccharide products	References
Rumen metagenome	67.0	6.0, 50 °C	Wheat straw xylan	X4, X3, X5	[17]
Hot spring metagenome	40.0	7.0, 80 °C	Beechwood xylan	X2, X3	[18]
<i>Luteimonas abyssi</i> , XH031T	45.0	6.5, 30 °C	Beechwood xylan	X2, X4	[19]
Rumen metagenome	41.5	6.5, 40 °C	Birchwood xylan	X2, X3, X5	[20]
<i>Anaeromyces robustus</i>	44.0	5.5, 40 °C	Beechwood xylan	X2, X3	[21]
<i>Jonesia denitrificans</i>	52.4	7.0, 55 °C	Beechwood xylan	X2, X3	[22]
Rumen metagenome	41.0	5.0, 50 °C	Birchwood xylan	X2, X3, X5	[23]
Rumen metagenome	40.4	7.0, 40 °C	Wheat straw xylan	X2, X3	rRuXyn024

rRuXyn024 不具备优秀的耐高温特性。Cheng 等^[20]的研究进一步证实了, 从瘤胃微生物基因组中克隆的木聚糖酶也表现出较差的热稳定性。rRuXyn024 的最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 7.0, 则与其来源瘤胃的环境相一致^[25-26]。

在探讨金属离子对 rRuXyn024 活性的影响时发现, 大多数金属离子会抑制其活性。这可能是因为金属离子与酶的活性中心结合, 致使蛋白结构受损或是与酶-底物复合体结合, 干扰了其水解作用^[27-28]。与此类似, 本实验室之前也发现一种来自骆驼瘤胃的 GH 11 家族木聚糖酶在 1 mmol/L 和 5 mmol/L Mn^{2+} 存在下活性提高了 33% 和 49%。这可能是由于 Mn^{2+} 与酶活性中心的关键氨基酸残基产生交互作用或作为辅因子增强了酶的活性^[29]。

与本研究结果类似, 已报道的部分瘤胃 GH 10 木聚糖酶也不受 Tween-20 和 Triton X-100 的影响^[20,30]。EDTA 和 SDS 对瘤胃 GH 10 木聚糖酶的抑制作用在较多研究中得到了证实^[16,31], 这主要是因为 SDS 是一种强变性剂, 能够使蛋白质结构发生不可逆的改变, 导致酶失活变性, 而 EDTA 是一种金属螯合剂, 能够与酶促反应所需的金属离子结合, 影响酶解作用^[16]。这也从侧面说明 rRuXyn024 可能是一种金属依赖性酶, Mn^{2+} 对 rRuXyn024 的促进作用也证实这一点。DTT 对 rRuXyn024 的影响较小, 表明该酶似乎不需要蛋白质分子内或分子间的二硫键来实现水解反应^[32], 事实上在 rRuXyn024 结构中也并未预测出二硫键的存在。然而, 对于 5 mmol/L 的 β -巯基乙醇的影响, 尚不能给出合理的解释。

3.3 rRuXyn024 的酶解产物分析

rRuXyn024 的酶解产物以木三糖和木二糖为主, 这与之前的报道相似^[18,21-22], 表明该酶是一种易产生木寡糖的木聚糖酶。木寡糖不但能促进肠道有益菌(如双歧杆菌和乳酸杆菌)的生长,

还具有多种与肠道调节相关的生物活性, 如抗氧化、抗菌、抗炎和抗过敏等, 这使得木寡糖作为功能性食品和饲料添加剂已广泛应用于人类营养和动物营养中^[17]。研究显示聚合度为 2-4 的低聚木寡糖比高聚合度的寡糖和多糖更易被肠道有益微生物发酵为短链脂肪酸^[33]。因此, rRuXyn024 具有生产高价值木寡糖的潜力。

3.4 rRuXyn024 对秸秆的水解

不同来源的植物基质, 细胞壁表面的气孔数量、孔径, 以及内部的木质纤维素含量、结构等不同, 可能会导致木聚糖酶与木聚糖的接触程度不同而影响其水解作用^[34]。此外, 植物基质中木聚糖的侧链结构, 如阿拉伯糖、乙酰基、葡萄糖醛酸、阿魏酸和对香豆酸等, 也是影响木聚糖酶作用的重要因素^[35], 如小麦秸中的阿拉伯糖通常高于玉米秸^[36]。这些因素可能最终导致了 rRuXyn024 对 5 种秸秆的不同水解作用, 但 rRuXyn024 对玉米秸秆的有效降解, 预示着 rRuXyn024 在提高玉米秸秆在瘤胃中的消化率具有较大的应用潜力。木聚糖酶作为一种典型的纤维分解酶, 在过去几十年中已经进行了较多研究, 主要探讨其对动物机体健康、生产性能或养分消化的影响^[37-38]。然而, 旨在高效降解农作物秸秆而筛选特异性木聚糖酶的研究相对匮乏。本课题组先前报道了一种源自瘤胃的 GH30 家族木聚糖酶, 该酶能有效水解麦秸并优化其瘤胃发酵过程^[39]。当前研究结果为进一步丰富秸秆降解用木聚糖酶酶库奠定了基础。

4 结论

本研究利用大肠杆菌成功表达了瘤胃重组木聚糖酶 rRuXyn024。rRuXyn024 编码 358 个氨基酸, 属于 GH 10 家族, 最适反应温度和 pH 分别为 40 °C 和 7.0, 具有宽泛的反应温度。纯纤维基质中木聚糖是 rRuXyn024 的最佳水解底物。

Mn²⁺能够显著促进 rRuXyn024 的活性。rRuXyn024 能够有效地催化麦秸木聚糖水解, 主要产生木三糖和木二糖作为水解产物。rRuXyn024 能够显著降解多种农作物秸秆, 包括玉米秸、稻秸、豆秸和油菜秸, 其中对玉米秸的水解效率最高。综上可知, rRuXyn024 具备改善农作物秸秆瘤胃利用效率的潜力。

作者贡献声明

汤龙章: 负责开展试验、分析数据以及撰写论文; 邱清华: 提供技术支持; 刘婵娟: 负责试验仪器平台的提供与使用指导; 付戴波、欧阳克蕙: 提供试验材料和经费; 赵向辉: 负责试验设计指导、论文审阅与修订, 并提供试验经费。

参考文献

- [1] 张湘云, 刘利珍. 农作物秸秆饲料化利用补贴政策的实施现状及优化建议[J]. 中国饲料, 2022(12): 126-129.
ZHANG XY, LIU LZ. Implementation status and optimization suggestions of subsidy policy for feed utilization of crop straw[J]. *China Feed*, 2022(12): 126-129 (in Chinese).
- [2] 牟林林. 乳酸菌及酶制剂对稻草青贮发酵品质及微生物多样性的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019.
MOU LL. Effects of lactic acid bacteria and enzyme preparation on fermentation quality and microbial diversity of rice straw silage[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [3] VALLEJO LH, SALEM AZM, CAMACHO LM, KHOLIF AM, MARIEZCURRENA MD, CIPRIANO M, ALONSO MU, OLIVARES J, LOPEZ S. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2016, 154(6): 1110-1117.
- [4] ZHANG WJ, PAN K, LIU CJ, QU MR, OUYANG KH, SONG XZ, ZHAO XH. Recombinant *Lentinula edodes* xylanase improved the hydrolysis and *in vitro* ruminal fermentation of soybean straw by changing its fiber structure[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 286-292.
- [5] 郭威, 郭晓军, 周贤, 李术娜, 朱宝成. 复合菌剂发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃液细菌多样性的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(4): 736-745.
GUO W, GUO XJ, ZHOU X, LI SN, ZHU BC. Effect of corn stalk fermented by complex bacterial on rumen bacteria diversity in sheep[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018, 49(4): 736-745 (in Chinese).
- [6] ASLANIYAN A, GHANBARI F, KOUHSAR JB, SHAHRAKI BK. Comparing the effects of gamma ray and alkaline treatments of sodium hydroxide and calcium oxide on chemical composition, ruminal degradation kinetics and crystallinity degree of soybean straw[J]. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine*, 2023, 191: 110524.
- [7] ZHAO SG, LI GD, ZHENG N, WANG JQ, YU ZT. Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating ruminal microbial colonization[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 244-251.
- [8] 李胜利, 史海涛, 曹志军, 王雅晶. 粗饲料科学利用及评价技术[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 3149-3158.
LI SL, SHI HT, CAO ZJ, WANG YJ. Scientific utilization and evaluation technology of forage[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(10): 3149-3158 (in Chinese).
- [9] SARNKLONG C, CONE JW, PELLIKAAN W, HENDRIKS WH. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: a review[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, 23(5): 680-692.
- [10] MAO H, WU CH, WANG JK, LIU JX. Synergistic effect of cellulase and xylanase on *in vitro* rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate[J]. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 2013, 13: 477-487.
- [11] 葛雨杭, 陈美汐, 孙博, 吴松娜, 万群. 木聚糖酶 TgXyn2 的酶学特性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 138-144.
GE YH, CHEN MX, SUN B, WU SN, WAN Q. Enzymatic characterization of xylanase TgXyn2[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(4): 138-144 (in Chinese).

- [12] CHEN HM, ZHAO XB, LIU DH. Relative significance of the negative impacts of hemicelluloses on enzymatic cellulose hydrolysis is dependent on lignin content: evidence from substrate structural features and protein adsorption[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(12): 6668-6679.
- [13] SANTOS JPD, ZAVAREZE EDR, DIAS ARG, VANIER NL. Immobilization of xylanase and xylanase- β -cyclodextrin complex in polyvinyl alcohol via electrospinning improves enzyme activity at a wide pH and temperature range[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(Part B): 1676-1684.
- [14] HU JG, ARANTES V, SADDLER JN. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 36.
- [15] ZH U LL, LIU CJ, LI YJ, PAN K, OUYANG KH, SONG XZ, XIONG XW, QU MR, ZHAO XH. Characteristics of recombinant xylanase from camel rumen metagenome and its effects on wheat bran hydrolysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 1309-1317.
- [16] HU D, ZHAO XH. Characterization of a new xylanase found in the rumen metagenome and its effects on the hydrolysis of wheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(21): 6493-6502.
- [17] LI T, LEI XW, WANG L, LIU CJ, QIU QH, LI YJ, SONG XZ, XIONG XW, ZANG YT, QU MR, OUYANG KH, ZHAO XH. Production of xylo-oligosaccharides with degree of polymerization 3–5 from wheat straw xylan by a xylanase derived from rumen metagenome and utilization by probiotics[J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103360.
- [18] JOSHI N, SHARMA M, SINGH SP. Characterization of a novel xylanase from an extreme temperature hot spring metagenome for xylooligosaccharide production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4889-4901.
- [19] 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.
- [20] CHENG FS, SHENG JP, DONG RB, MEN YJ, GAN L, SHEN L. Novel xylanase from a holstein cattle rumen metagenomic library and its application in xylooligosaccharide and ferulic acid production from wheat straw[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(51): 12516-12524.
- [21] VACILOTTO MM, SEPULCHRO AGV, PELLEGRINI VOA, POLIKARPOV I. Production of prebiotic xylooligosaccharides from arabino- and glucuronoxylan using a two-domain *Jonesia denitrificans* xylanase from GH10 family[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 144: 109743.
- [22] WEN ST, WU GG, WU HW. Biochemical characterization of a GH10 xylanase from the anaerobic rumen fungus *Anaeromyces robustus* and application in bread making[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(9): 406.
- [23] KIM HB, LEE KT, KIM MJ, LEE JS, KIM KS. Identification and characterization of a novel KG42 xylanase (GH10 family) isolated from the black goat rumen-derived metagenomic library[J]. *Carbohydrate Research*, 2018, 469: 1-9.
- [24] BHUNIA B, BASAK B, MANDAL T, BHATTACHARYA P, DEY A. Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54: 1-8.
- [25] CASTRO-COSTA A, SALAMA AAK, MOLL X, AGUILÓ J, CAJA G. Using wireless rumen sensors for evaluating the effects of diet and ambient temperature in nonlactating dairy goats[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(7): 4646-4658.
- [26] KAUR R, GARCIA SC, HORADAGODA A, FULKERSON WJ. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure[J]. *Animal Production Science*, 2010, 50(2): 98.
- [27] HEMIDA SK, OMAR SA, ABDEL-MALLEK AY. Microbial populations and enzyme activity in soil treated with heavy metals[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1997, 95(1): 13-22.
- [28] GU SF, LIU CJ, ZHANG WJ, QU MR, LI YJ, ZANG YT, XIONG XW, PAN K, ZHAO XH. Characteristics of a recombinant *Fusarium verticillioides* cutinase and its effects on enzymatic hydrolysis of rice straw[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 171: 382-388.
- [29] CHEN SC, KAUFMAN MG, MIAZGOWICZ KL, BAGDASARIAN M, WALKER ED. Molecular characterization of a cold-active recombinant xylanase

- from *Flavobacterium johnsoniae* and its applicability in xylan hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 145-155.
- [30] PAVARINA GC, de MACEDO LEMOS EG, LIMA NSM, PIZAURO JR JM. Characterization of a new bifunctional endo-1,4- β -xylanase/esterase found in the rumen metagenome[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 10440.
- [31] WANG Q, LUO Y, HE B, JIANG LS, LIU JX, WANG JK. Characterization of a novel xylanase gene from rumen content of Hu sheep[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(7): 1424-1436.
- [32] AL-DARKAZALI H, MEEVOOTISOM V, ISARANGKUL D, WIYAKRUTTA S. Gene expression and molecular characterization of a xylanase from chicken cecum metagenome[J]. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2017: 4018398.
- [33] SINGH RD, MUIR J, ARORA A. Concentration of xylooligosaccharides with a low degree of polymerization using membranes and their effect on bacterial fermentation[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2021, 15(1): 61-73.
- [34] VIKARI L, KANTELINEN A, BUCHERT J, PULS J. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41(1): 124-129.
- [35] HU JG, SADDLER JN. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass?[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2018, 110: 13-16.
- [36] Cătălin AP, SUDITU GD, DANU M, AILIESEI GL, NECHITA MT. An experimental study on the hot alkali extraction of xylan-based hemicelluloses from wheat straw and corn stalks and optimization methods[J]. *Polymers*, 2022, 14(9): 1662.
- [37] MIORIN RL, BATISTA LHC, NASCIMENTO FA, COSTA E, SILVA LF, KOONTZ A, PETTIGREW JE, RESENDE FD, SIQUEIRA GR. Effect of supplementation strategies and the use of exogenous xylanase enzyme on ruminal fermentation, digestibility, animal performance, and carcass characteristics of Nellore bulls grazing during dry season[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2022, 290: 115373.
- [38] SINGH AK, MISHRA B, BEDFORD MR, JHA R. Effects of supplemental xylanase and xylooligosaccharides on production performance and gut health variables of broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 98.
- [39] TANG LZ, LEI XW, OUYANG KH, WANG L, QIU QH, LI YJ, ZANG YT, LIU CJ, ZHAO XH. A glycosyl hydrolase 30 family xylanase from the rumen metagenome and its effects on *in vitro* ruminal fermentation of wheat straw[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2023, 14(1): 118.