

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201705006

引文格式: 陈芳芳, 曹曦跃, 刘颖, 等. *Bacillus pumilus* 阿拉伯呋喃糖苷酶的重组表达及水解木聚糖的研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):444-450CHEN FF, CAO XY, LIU Y, et al. Recombinant expression of  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus pumilus* and hydrolysis of xylan [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):444-450

## *Bacillus pumilus* 阿拉伯呋喃糖苷酶的重组表达及水解木聚糖的研究

陈芳芳<sup>1</sup>, 曹曦跃<sup>2</sup>, 刘颖<sup>1</sup>, 刘梦佳<sup>1</sup>, 颜佳超<sup>1</sup>, 杨富强<sup>1</sup>, 曹毅<sup>1</sup>, 乔代蓉<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学 生命科学学院 微生物与代谢工程四川省重点实验室, 成都 610065; 2. 东北农业大学 食品学院, 哈尔滨 150036)

**摘要:** 从短小芽孢杆菌中克隆阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *xyn43* 并重组表达, 有利于将该酶分离纯化后应用于其他半纤维素多糖的水解。该研究利用 *E. coli* BL21 表达系统对实验室克隆到的短小芽孢杆菌的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *xyn43* 进行重组表达并分析其酶学性质, 将重组  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 Xyn43 和来源于棒曲霉突变菌株的商业木聚糖酶联合作用于燕麦木聚糖。结果表明: 以燕麦木聚糖为底物, 重组  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 Xyn43 的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 6.0。该酶在 pH 5.0~10.0 和 45~55 °C 下较稳定。与木聚糖酶单独作用相比, 重组 Xyn43 酶与商业木聚糖酶同时加入以及先用木聚糖酶水解后加入 Xyn43 酶, 水解产物中的还原糖含量分别增加了 16% 和 20%, 木糖含量增加了 35% 和 48%。该结果研究结果表明重组 Xyn43 酶能够和商业木聚糖酶协同降解燕麦木聚糖, 提高水解效率, 产生更多的木寡糖, 阿拉伯糖和木糖。

**关键词:**  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶, 木聚糖酶, 燕麦木聚糖, 重组表达, 协同作用

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0444-07

## Recombinant expression of $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus pumilus* and hydrolysis of xylan

CHEN Fangfang<sup>1</sup>, CAO Xiyue<sup>2</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, LIU Mengjia<sup>1</sup>, YAN Jiachao<sup>1</sup>,  
YANG Fuqiang<sup>1</sup>, CAO Yi<sup>1</sup>, QIAO Dairong<sup>1\*</sup>(1. *Microbiology and Metabolic Engineering of Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China*; 2. *College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150036, China*)

**Abstract:** Hemicellulose is a rich renewable resource, which is one of the most promising raw materials for the production of biofuels.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) is an auxiliary enzyme in hemicellulose hydrolase system which catalyzes the  $\alpha$ -L-1,2,  $\alpha$ -L-1,3 and  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranoside residues in non-reducing terminal of various oligosaccharides and polysaccharides. *Bacillus pumilus* is a widely used, bio-friendly feed microbial strain that can degrade man-

收稿日期: 2017-07-09

基金项目: 国家资源平台项目 (NIMR 2017-8-1); 四川省科技厅项目 (18ZDYF1802, 2014GZX0005, 18PTDJ0034) [Supported by the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (NIMR 2017-8-1); Sichuan Science and Technology Bureau (18ZDYF1802, 2014GZX0005, 18PTDJ0034)].

作者简介: 陈芳芳 (1991-), 女, 四川绵阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物生物技术, (E-mail) 874272707@qq.com。

\*通信作者: 乔代蓉, 教授, 主要从事微生物资源保护、植物耐寒分子机制、饲料酶制剂研究与开发, (E-mail) qiaodairong@scu.edu.cn。

nan, xylan, cellulose and so on. Therefore, cloning the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase gene *xyn43* from *B. pumilus* and recombinant expression is beneficial to the separation and purification of the enzyme and it can be applied to the hydrolysis of other hemicellulose polysaccharide. In this study, we used the *E. coli* BL21 expression system to express the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase gene *xyn43* isolated from the *B. pumilus* and then analyzed the enzymatic properties of recombinant enzyme Xyn43. And we used Xyn43 and commercial Xylanase derived from the mutant strain of *Aspergillus clavatus* to degrade the oat spelt xylan. The results showed that the optimal temperature of Xyn43 was 50 °C and the optimum pH was 6.0. It was stable over a pH range of 5.0–10.0 and temperatures of 45–55 °C. Compared with Xylanase alone, the reducing sugar content in the hydrolyzate of Xyn43 and Xylanase added simultaneously and Xyn43 added after Xylanase increased 16% and 20% respectively, and the xylose content increased of 35% and 48%. The studies indicate that Xyn43 is able to synergistically with commercial Xylanase for oat spelt xylan degradation and can improve the hydrolysis efficiency, produced more xylosaccharides, arabinose and xylose.

**Key words:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, xylanase, oat spelt xylan, recombinant expression, synergistic effect

半纤维素是植物细胞壁结构中含量仅低于纤维素的第二大碳水化合物高聚物,不同于均多糖纤维素,它是由戊糖(D-木糖, L-阿拉伯糖),己糖(D-葡萄糖, D-半乳糖, D-甘露糖)和一些酸性多糖(半乳糖醛酸和葡糖醛酸)等不同类型单糖组成的杂多糖(余紫苹等, 2011)。通过生物技术方法能够将这些低成本的生物质转变成有价值的产品,如乙醇和工业化学品等,因此半纤维素有着巨大的潜在利用价值,被认为是生产生物燃料的最有前景的原料之一(朱晨杰等, 2015)。由于半纤维素的结构复杂,其完全水解需要多种酶的共同参与,主链水解酶内切 $\beta$ -1,4-木聚糖酶(EC 3.2.1.8)水解 $\beta$ -1,4-木糖苷键释放木二糖, $\beta$ -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)从木二糖和短链低聚木糖中释放出木糖。半纤维素中大量取代基的存在阻碍了主链水解酶的降解,一些木聚糖酶不切割被取代的木糖单元之间的糖苷键,因此在主链完全水解之前侧链必须裂解。木聚糖上的L-阿拉伯呋喃糖基侧链严重抑制了木聚糖水解酶的活性,因此阻碍了多聚物完全水解为其基本木糖单元(Shallom et al, 2002)。 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶是外切型酶,其水解来自含有阿拉伯糖的多糖的末端非还原残基,特异地催化各类低聚糖和多糖的非还原末端的 $\alpha$ -L-1,2-, $\alpha$ -L-1,3-和 $\alpha$ -L-1,5-阿拉伯呋喃糖苷残基的水解,同其他半纤维素水解酶协同作用能够促进这些酶的水解活力。 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶是木聚糖水解酶系统中不可缺少的一部分,代表了

木聚糖水解进程中潜在的限速酶(Saha & Bothast, 1999)。基于氨基酸序列,基本结构相似性和疏水性将 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶分类为5个水解酶家族(GHs),即GH3、GH43、GH51、GH54和GH62(Henrissat & Davies, 2000)。

$\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶可同其他半纤维素酶协同作用,使半纤维素得到充分水解(de Vries et al, 2000)。将青霉菌 ATCC 62998 编码的内切木聚糖酶基因 *XynC* 和黑曲霉 ATCC 1015 编码的阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *AbfB* 在构巢曲霉 A773 中重组表达后协同水解甘蔗渣浆,与 *XynC* 单独作用相比,加入 *AbfB* 后水解产物中还原糖含量提高了 54%~85% (Goncalves et al, 2012)。从嗜热特异腐质霉 Y1 (Yang et al, 2015) 分离到的一种  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和木聚糖酶协同作用,两种酶同时加入和先加  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶后加木聚糖酶,从桦木木聚糖中产生的还原糖含量分别为木聚糖酶单独作用的 1.01 和 1.20 倍。来源于链霉菌属 PC22 (Raweesri et al, 2008) 的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和两种主链水解酶(木聚糖酶和  $\beta$ -木糖苷酶)协同水解燕麦木聚糖,与两种主链水解酶单独作用相比,加入  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶后还原糖含量增加了 17%。 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶在增加这些半纤维素的还原糖释放量中起重要作用,其协同作用增加了小分子量木寡糖的产量。将  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和木聚糖酶联合降解木聚糖,能使木聚糖更加充分水解,产生更多木寡糖和单糖。

本研究将从短小芽孢杆菌克隆到的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *xyn43* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 原核表达系统中重组表达,得到分子量为 71 kDa 的重组蛋白,分析了重组  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 Xyn43 的酶学性质。将重组 Xyn43 酶和商业木聚糖酶联合水解燕麦木聚糖,将两种酶单独,按先后顺序及同时加入。不仅比较了水解产物中还原糖的含量,同时分析了阿拉伯糖和木糖的含量变化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株与质粒:大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 和质粒 pET-32a(+) 为本实验室保存。主要试剂:D-木糖,L-阿拉伯糖,和燕麦木聚糖购自 BIOMED 公司;棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)的突变菌株商业木聚糖酶,购自上海康达食品;其他生化试剂为国产分析纯,购自成都科龙化工试剂厂。

### 1.2 方 法

1.2.1 *xyn43* 的克隆和重组表达 本实验室已克隆到 *xyn43* 基因,但未能在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功表达。氨基酸序列分析结果表明该蛋白可跨细胞膜运输至胞外,属于胞外蛋白。故在未去除信号肽的情况下,重组蛋白被分泌至胞外,故未见目的条带表达。因此本研究根据实验室已构建的工程菌质粒为模板分别设计带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 的设计去除信号肽的 PCR 扩增引物:*xyn43*-PF (CGGATCCGCAAGCACAACAATTGC) 和 *xyn43*-PR (CCGCTCGAGTTACCTTTGAGTAAACTGCC)。以克隆到的未去信号肽的 *xyn43* 质粒 DNA 为模板,利用引物 *xyn43*-PF 和 *xyn43*-PR 扩增 *xyn43* 的基因序列。PCR 扩增产物胶回收后,使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别对 *xyn43* 基因和 pET32a 质粒 DNA 进行双酶切。将双酶切过后的 *xyn43* 目的基因片段和 pET32a 载体片段用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 *xyn43*-pET-32a。然后将重组表达质粒 *xyn43*-pET-32a 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行 *xyn43* 的重组表达。

1.2.2 重组蛋白 Xyn43 的纯化 将重组菌体接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中活化菌株,然后

转接到新的含氨苄的 LB 液体培养基中,待菌体生长至  $OD_{600}$  为 0.6~0.8 之间时,加入终浓度为  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IPTG 于  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  下诱导 16 h 表达重组蛋白,离心收集菌体,用 PBS 缓冲液重悬后超声破碎, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 20 min。将上清即粗酶液进行蛋白纯化,通过镍柱进行亲和层析。采用连续洗脱的方式将不同咪唑浓度的缓冲液混合洗柱,收集洗脱蛋白,SDS-PAGE 检测洗脱蛋白的纯度。

1.2.3 Xyn43 酶活力的测定 以燕麦木聚糖为底物,反应体系为 1 mL,其中含  $500 \text{ } \mu\text{L}$  1% (w/v) 燕麦木聚糖和用 pH 6.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液适当稀释的酶液, $50 \text{ }^\circ\text{C}$  反应 10 min 后,加入 1 mL DNS 终止反应,测定 540 nm 下的吸光值。以每分钟水解木聚糖产生的相当于  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  D-木糖的还原糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位 (IU)。

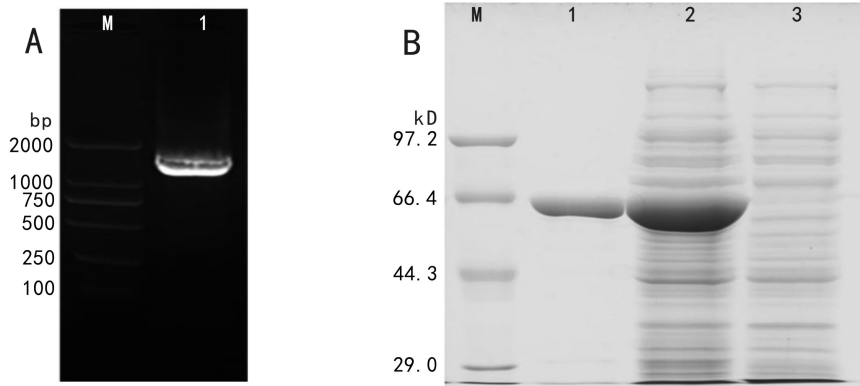
1.2.4 Xyn43 酶学性质研究 pH 对酶活力的影响:分别配制含 1% 燕麦木聚糖的 pH 3.0~10.0 的缓冲液: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 (pH 3.0~7.0),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 (pH 8.0),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘氨酸- $\text{NaOH}$  缓冲液 (pH 9.0~10.0)。在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下水浴反应 10 min 测定酶活力,其中酶活力最高的设为 100%。

温度对酶活力的影响:用最适 pH 缓冲液将酶液适当稀释,分别在 30、40、50、60、70、80  $^\circ\text{C}$  的温度下测定酶活力,反应 10 min,其中酶活力最高的设为 100%。

pH 稳定性分析:取适量酶液分别放置于 pH 3.0~10.0 的缓冲液中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴放置 1 h,于最佳反应条件下水浴 10 min 测定剩余酶活力,其中最高酶活力设为 100%。

热稳定性分析:将适量的酶液分别放置在 45、50 和 55  $^\circ\text{C}$  恒温水浴下 1 h,每间隔 10 min 取样一次,然后于最适温度和最佳 pH 条件下反应 10 min 测定剩余酶活力,将保温 0 min 时的初始酶活力设为 100%。

1.2.5 Xyn43 与商业木聚糖酶的协同作用 以 1% (w/v) 燕麦木聚糖为底物,首先分别用重组 Xyn43 酶 ( $3.6 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 单独水解 6 h;木聚糖酶 ( $0.7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 单独水解 6 h;重组 Xyn43 酶和木聚糖酶共同水解 6 h。然后,先加木聚糖酶水解 6 h 后



注: (A) M. DNA maker 2 000 bp; 1. *xyn43* 基因扩增产物。(B) M. 低分子量蛋白 Marker; 1. 纯化后的酶液; 2. *xyn43*-pET-32a 诱导上清; 3. 阴性对照,空载菌株诱导上清。

Note: (A) M. Standard DNA molecular weight of 2 000 bp; 1. PCR product of *xyn43* gene. (B) M. Standard protein marker; 1. Purified recombinant protein; 2. Recombinant *xyn43*-pET-32a without purification; 3. Blank control of *E. coli* BL21 (DE3).

图 1 *xyn43* 的 PCR 扩增和在大肠杆菌 BL21 中的重组表达

Fig. 1 PCR amplification and recombinant expression of *xyn43* gene in *E. coli* BL21 (DE3)

煮沸冷却后,再加重组 Xyn43 酶继续反应 6 h;先加重组 Xyn43 酶水解 6 h 后煮沸冷却后,再加木聚糖酶继续反应 6 h,反应温度为 37 ℃。最后,将反应液煮沸离心收集上清,用 DNS 法测定还原糖含量,并用高效液相色谱法分析水解产物中阿拉伯糖和木糖的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *xyn43* 的克隆和表达纯化

根据设计的引物进行基因序列扩增得到 PCR 扩增产物(图 1:A),该基因全长 1 458 bp,编码 485 个氨基酸,预测的蛋白分子量为 71 kDa。将构建好的重组质粒 *xyn43*-pET-32a 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达,通过镍柱进行亲和层析分离纯化蛋白,SDS-PAGE 电泳结果表明,重组 Xyn43 蛋白分子量与预测的蛋白大小基本一致(图 1:B)。

### 2.2 Xyn43 的酶学性质

2.2.1 Xyn43 的最适 pH 和温度 在 pH3.0~10.0 的缓冲液中测定 Xyn43 的酶活力,图 2 结果表明,Xyn43 的最适 pH 为 6.0,在 pH6.0~8.0 之间能保持在 80% 以上的相对酶活力,当缓冲液 pH 小于

5.0 或大于 9.0 时该酶的相对酶活低于 50%。在 30~80 ℃ 温度范围内测定 Xyn43 的酶活力,图 3 结果表明,该酶的最适反应温度为 50 ℃,温度在 30~40 ℃ 时相对酶活保持在 75% 以上,当反应温度为 60 ℃ 时该酶的相对酶活约为 55%,温度高于 70 ℃ 时,相对酶活降低到 30% 以下。

2.2.2 Xyn43 的 pH 稳定性和热稳定性 取适量酶液分别放置于 pH3.0~10.0 的缓冲液中,37 ℃ 水浴放置 1 h,于最适反应条件下测定剩余酶活力,其中酶活力最高的设为 100%。图 4 结果表明,重组 Xyn43 酶在 pH8.0 的缓冲液中稳定性最好,在 pH5.0~10.0 之间较稳定且相对酶活保持在 70% 以上,在 pH3.0~4.0 酸性条件下放置 1 h 后相对酶活力残留 30% 以下。

将适量酶液分别在 45、50、55 ℃ 温度下恒温水浴 1 h,每间隔 10 min 取酶液于最适反应条件下测定剩余酶活力,将保温 0 min 时的酶活力设为 100%。图 5 结果表明,该酶在 45、50、55 ℃ 条件下比较稳定,其中 45 ℃ 时最稳定,1 h 后酶活力仍能保留为 75% 左右,50 ℃ 和 55 ℃ 为其次,1 h 后分别能残留 65% 和 68% 左右的酶活力。

### 2.3 Xyn43 与商业木聚糖酶协同水解燕麦木聚糖

将重组 Xyn43 酶与来源于棒曲霉突变菌株的



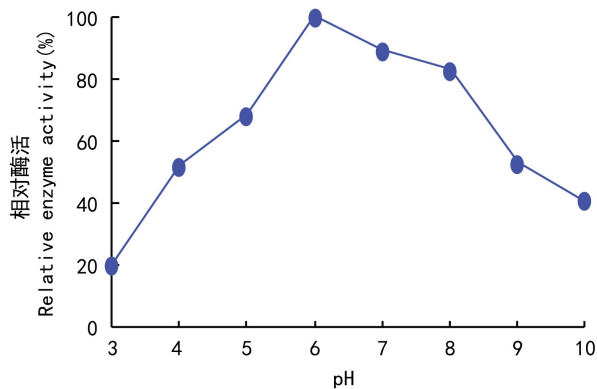


图 2 Xyn43 的最适 pH  
Fig. 2 Optimum pH of Xyn43

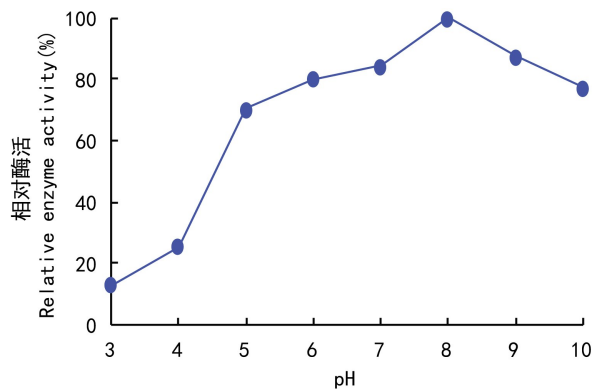


图 4 Xyn43 的 pH 稳定性  
Fig. 4 pH stability of Xyn43

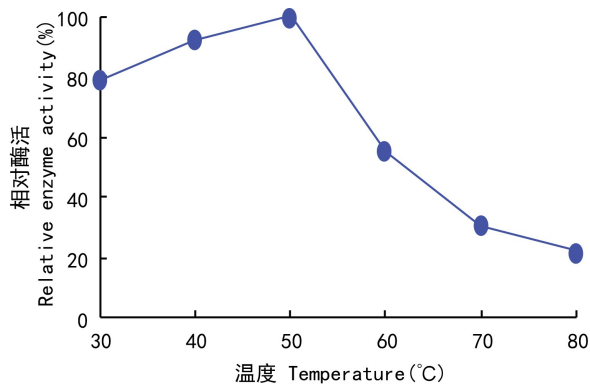


图 3 Xyn43 的最适温度  
Fig. 3 Optimum temperature of Xyn43

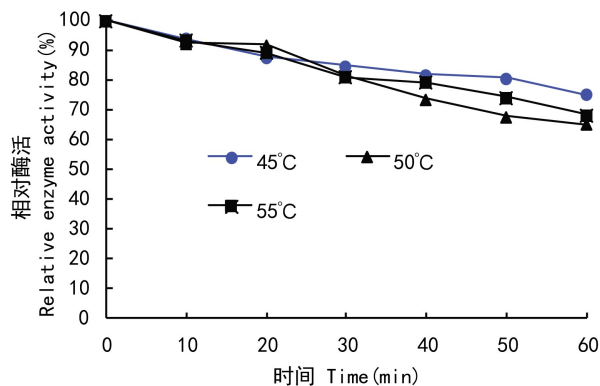


图 5 Xyn43 的温度稳定性  
Fig. 5 Temperature stability of Xyn43

商业木聚糖酶协同水解燕麦木聚糖,以 1% (w/v) 燕麦木聚糖为底物,将重组 Xyn43 酶和木聚糖酶同时、先后或单独加入反应体系中,通过 DNS 法测定水解产物中还原糖的含量,并用高效液相色谱法对水解产物中阿拉伯糖和木糖含量进行分析。由表 1 可知,当重组 Xyn43 酶和木聚糖酶同时加入,先加木聚糖酶后加重组 Xyn43 酶,先加重组 Xyn43 酶后加木聚糖酶产生的还原糖含量分别为木聚糖酶单独作用的 1.16, 1.20 和 0.92 倍。由表 2 可知,相较于木聚糖酶单独作用,两种酶同时作用或先加木聚糖酶后加 Xyn43 酶,木糖含量分别增加了 35% 和 48%,而先加重组 Xyn43 酶后加木聚糖酶产生的木糖含量为木聚糖酶单独作用的

88%。与先加重组 Xyn43 酶后加木聚糖酶相比,两种酶同时加入和先加木聚糖酶后加重组 Xyn43 酶产生的阿拉伯糖含量分别提高了 72% 和 94%。

### 3 讨论与结论

半纤维素作为一种丰富的可再生资源,其产物可作为饲料和生物能源,国内外对木质纤维素的开发利用越来越重视和广泛关注。通过生物技术法将这些低成本的生物质转变成有价值的产品,如乙醇和工业化学品,对于生态环保来说是必不可少的。半纤维素是一种结构复杂的多取代的高度分枝的异质多糖,其生物降解需要一个酶系统

表 1 重组 Xyn43 酶和木聚糖酶协同作用产生的还原糖含量及协同效率比较

Table 1 Comparison of reducing sugar content and synergistic efficiency of recombinant Xyn43 enzyme and Xylanase

第一步反应 The first reaction	第二步反应 The second reaction	还原糖含量 Reducing sugar content (mg · mL <sup>-1</sup> )	协同效率 Synergistic efficiency
ABF	—	0	—
Xyl	—	3.43	—
ABF+Xyl	—	3.97	1.16
ABF	Xyl	3.17	0.92
Xyl	ABF	4.11	1.20

注: ABF. 重组 Xyn43 酶; Xyl. 木聚糖酶。下同。协同效率为与木聚糖酶单独作用产生的还原糖含量的比值。

Note: ABF. Recombinant Xyn43 enzyme; Xyl. Xylanase. The same below. Synergistic efficiency is the ratio of the reducing sugar content to the reducing sugar content produced by the Xylanase alone.

参与完成,  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶是参与酶水解 L-阿拉伯糖链的酶, 能有效水解果胶、半纤维素残留的多糖(阿拉伯聚糖, 脱支阿拉伯聚糖)、阿拉伯糖半乳糖和阿拉伯木聚糖等, 在降解半纤维素的过程中, 能促进其他半纤维素酶的水解, 提高水解效率。 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶作为主要的木聚糖侧链水解酶, 在工业生产上被广泛应用(Saha, 2000; Numan & Bhosle, 2006), 包括酿酒、面包工艺、果汁处理、生物乙醇、保健药品的生产等。

本研究将从短小芽孢杆菌中克隆到的编码  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *xyn43* 在 *E. coli* BL21 中成功表达, 构建了工程菌 *xyn43*-pET32a 高产菌株。该酶是一种单一的阿拉伯呋喃糖苷酶, 具有较好的温度稳定性和广泛的 pH 耐受性。将 Xyn43 酶与来源于棒曲霉突变菌株的商业木聚糖酶协同水解燕麦木聚糖, 结果表明两种酶同时作用和先加木聚糖酶后加 Xyn43 酶, 水解产物的还原糖含量, 木糖和阿拉伯糖含量都有明显提高, 水解效率高于木聚糖酶单独作用, 但先加入 Xyn43 酶后加入木聚糖酶产生的还原糖, 阿拉伯糖和木糖含量反而低于木聚糖酶单独作用。这一现象在之前的研

表 2 高效液相色谱分析重组 Xyn43 酶和木聚糖酶协同作用的水解产物中木糖和阿拉伯糖含量变化

Table 2 Analysis of the contents of xylose and arabinose in the hydrolyzate of recombinant Xyn43 and Xylanase by high performance liquid chromatography

参与反应的酶 Enzyme	木糖含量 Xylose content (mg · mL <sup>-1</sup> )	协同效率 <sup>1</sup> Synergistic efficiency <sup>1</sup>	阿拉伯糖含量 Arabinose content (mg · mL <sup>-1</sup> )	协同效率 <sup>2</sup> Synergistic efficiency <sup>2</sup>
ABF	0	—	0	—
Xyl	0.65	1.0	0	—
ABF+Xyl	0.88	1.35	0.31	1.72
ABF→Xyl	0.57	0.88	0.18	1.0
Xyl→ABF	0.96	1.48	0.35	1.94

注: ABF+Xyl. 两种酶同时反应 6 h; ABF→Xyl. 先加入 ABF 酶反应 6 h, 煮沸冷却后再加入 Xyl 继续反应 6 h; Xyl→ABF. 先加入 Xyl 酶反应 6 h, 煮沸冷却后再加入 ABF 继续反应 6 h; 协同效率<sup>1</sup>为两种酶组合产生的木糖含量与 Xyl 单独作用产生的木糖含量的比值; 协同效率<sup>2</sup>为两种酶同时加入和 Xyl→ABF 组合产生的阿拉伯糖含量与 ABF→Xyl 组合产生的阿拉伯糖含量的比值。

Note: ABF + Xyl. Two enzymes simultaneously reacted for 6 h; ABF→Xyl. The first join the ABF enzyme reaction 6 h and boiling, cooling down then adding Xyl to join the reaction for 6 h; Xyl→ABF. The first join the Xyl enzyme reaction 6 h and boiling, cooling down then adding ABF to continue reaction 6 h; Synergistic efficiency<sup>1</sup> is the ratio of xylose content produced by the combination of the two enzymes and the xylose content produced by the Xyl alone; Synergistic efficiency<sup>2</sup> is the ratio of arabinose content of the combination of the two enzymes simultaneously and the Xyl→ABF with the arabinose produced by the combination of ABF→Xyl.

究中也被报道过, 如从嗜热特异腐质霉 Y1 (Yang et al, 2015) 分离到的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和木聚糖酶协同作用, 按先木聚糖酶后  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的顺序水解桦木木聚糖, 产生的还原糖含量为木聚糖酶单独作用的 98%。这可能是因为先加入 Xyn43 酶, 产生了少量的阿拉伯糖, 从而抑制了木聚糖酶的酶活力, 也可能是因为 Xyn43 酶结合在了木聚糖酶的底物结合位点, 导致木聚糖酶与底物的结合能力降低, 这与底物的结构和酶的作用机制等相关, 具体原因还需后续对酶的作用机制进一步研究来探讨。本研究的水解产物中含有木寡糖, 阿拉伯糖和木糖, 木聚糖酶单独作用时只能产生木寡糖和少量的木糖, 不能生成阿拉

伯糖,在木聚糖酶中加入 Xyn43 酶后,不仅生成了阿拉伯糖,木糖的产量也有提高。其中先加木聚糖酶后加 Xyn43 酶产生的木糖和阿拉伯糖含量最高,同时发现当先加木聚糖酶后加 Xyn43 酶或者两种酶同时作用时木寡糖峰与其他酶组合相比会有明显的下降,而阿拉伯糖峰则会相应的升高,产生的阿拉伯糖含量更多。这可能是当木聚糖酶先作用时,产生了大量的木寡糖,Xyn43 酶能从这些木寡糖的侧链中水解产生阿拉伯糖。这表明 Xyn43 酶不仅能从燕麦木聚糖这样的多聚糖的侧链水解释放阿拉伯糖,也能水解木寡糖侧链的一些阿拉伯糖残基,产生阿拉伯糖。

目前,商业半纤维素酶制剂需要富集几种辅助酶,包括阿拉伯呋喃糖苷酶以有效地将半纤维素转化为单糖,但稀酸预处理后会抑制随后的微生物发酵副产品的生产。在碱性条件下处理不仅避免了酸处理带来的环境污染,也能够减少对微生物发酵的抑制。本研究中的重组阿拉伯呋喃糖苷酶 Xyn43 是一种强耐碱性酶,且能显著促进木聚糖的酶活力,提高水解效率,因此可作为商业半纤维素酶的辅助酶,用于生物质资源的生物转化。

此外,L-阿拉伯糖苷残基广泛分布于半纤维素的侧链中。L-阿拉伯糖是一种带有甜味的不易被人体吸收的摄取量低的单糖,可作为可能的食品添加剂(Matsuo et al, 2000)。同时 L-阿拉伯糖能选择性地竞争性抑制肠蔗糖酶,在动物摄取蔗糖后能够降低血糖反应(Seri et al, 1996)。这些研究表明 L-阿拉伯糖可作为一种生理功能的糖用于抑制蔗糖消化,用来防止糖尿病人餐后高血糖。本研究中的 Xyn43 能够从燕麦木聚糖和木寡糖的侧链水解释放阿拉伯糖,不参与水解燕麦木聚糖主链,没有木聚糖酶活力。因此 Xyn43 可以参与含有阿拉伯糖苷的多聚糖和木寡糖的水解,生成阿拉伯糖,同时提高木寡糖和木糖的产量。其中木寡糖可作为益生元,木糖能够用于乙醇发酵。由此可见 Xyn43 在阿拉伯糖的生产和半纤维素等多聚糖的生物降解过程中发挥着重要的作用,对半纤维素等生物质的有效利用及生物转化具有重要的参考价值,具有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- DE VRIES RP, KESTER HCM, POULSEN CH, et al, 2000. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides [J]. Carbohydr Res, 327: 401-410.
- GONCALVES TA, DAMASIO ARL, SEGATO F, et al, 2012. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides [J]. Biores Technol, 119: 293-299.
- HENRISSAT B, DAVIES GJ, 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases families, modules and implications for genomics [J]. J Plant Physiol, 124: 1515-1519.
- MATSUO N, KANEKO S, KUNO A, et al, 2000. Purification, characterization and gene cloning of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901 [J]. Biochem J, 346: 9-15.
- NUMAN MTh, BHOSLE NB, 2006.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 33: 247-260.
- RAWESRI P, RIANGRUNGROJANA P, PINPHANICHAKARN P, 2008.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues [J]. Biores Technol, 99: 8981-8986.
- SAHA BC, BOTHAST RJ, 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber [J]. Appl Biochem Biotechnol, 76: 65-77.
- SAHA BC, 2000.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology [J]. Biotechnol Adv, 18: 403-423.
- SERI K, SANAI K, MATSUO N, et al, 1996. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in uncompetitive manner and reduces glycemic response after sucrose ingestion in animals [J]. Metabolism, 45: 1368-1374.
- SHALLOM D, BELAKHOV V, SOLOMON D, et al, 2002. The identification of the acid-base catalyst of  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase [J]. Febs Lett, 514: 163-167.
- YANG XZ, SHI PJ, MA R, et al, 2015. A new GH43  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Hemicolainisols* Y1: Biochemical characterization and synergistic action with a xylanase on xylan degradation [J]. Appl Biochem Biotechnol, 175: 1960-1970.
- YU ZP, PENG HL, DA R, et al, 2011. The structure characteristic of hemicellulose: A review [J]. Chin Polym Bull, 6: 48-54. [余紫苹, 彭红林, 姐阮, 等, 2011. 植物半纤维素结构研究进展 [J]. 高分子通报, 6: 48-54.]
- ZHU CJ, ZHANG HY, XIAO R, et al, 2015. Research progress in catalytic valorization of lignocellulose [J]. Sci Sin (Chimica), 5(45): 454-478. [朱晨杰, 张会岩, 肖睿, 等, 2015. 木质纤维素高值化利用的研究进展 [J]. 中国科学(化学), 5(45): 454-478.]