



# *Leifsonia* sp. ZF2019 中一种新型耐木糖 $\beta$ -木糖苷酶的表达与特征

何易, 焦镕虎, 王晨曦, 王茜, 许光治\*

浙江农林大学食品与健康学院, 浙江 临安 311300

何易, 焦镕虎, 王晨曦, 王茜, 许光治. *Leifsonia* sp. ZF2019 中一种新型耐木糖  $\beta$ -木糖苷酶的表达与特征. 微生物学报, 2022, 62(4): 1452–1463.

He Yi, Jiao Ronghu, Wang Chenxi, Wang Xi, Xu Guangzhi. Expression and characterization of a novel xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Leifsonia* sp. ZF2019. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1452–1463.

**摘要:** 【目的】从椴木灰蝶幼虫分离的 *Leifsonia* sp. ZF2019 菌株中克隆表达出一种新型  $\beta$ -木糖苷酶 Xyl4900, 并研究其酶学性质, 以期为开发适用于工业生产的  $\beta$ -木糖苷酶提供参考。【方法】采用生物信息学分析技术分析 *Leifsonia* sp. ZF2019 菌株的  $\beta$ -木糖苷酶 Xyl4900 基因并在大肠杆菌中表达了该基因, 纯化并研究了其酶学性质。【结果】Xyl4900 与 GH3 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶同源性高, 但带有  $\beta$ -木糖苷酶结构域, 可特异性水解对硝基苯基  $\beta$ -D-吡喃木糖苷(pNPX), 是一种新型  $\beta$ -木糖苷酶。酶学特性分析显示, Xyl4900 在 45 °C 和 pH 7.0 的条件下酶活性最高, 且在 pH 6.0–9.0 的范围内孵育 14 h, 仍保持 80% 以上的酶活力。除  $\text{Cu}^{2+}$  外, 其他金属离子 (2.5 mmol/L) 对 Xyl4900 酶活力无明显影响, 且对低浓度有机溶剂 (5% V/V) 有较强耐受性。此外, 在 20% (W/V) NaCl 或 100 mmol/L 木糖溶液中 Xyl4900 的酶活性仍高于 50%, 表现出较好的盐和木糖耐受性。动力学参数分析显示, Xyl4900 的  $K_m$  值、 $V_{max}$  值和木糖抑制常数  $K_i$  值分别为 0.80 mmol/L、36.10 U/mg 和 150.12 mmol/L。特别地, Xyl4900 能够很好地降解木二糖、木三糖。【结论】Xyl4900 具有良好的 pH 稳定性、木糖及盐耐受性, 能够较好地应用到半纤维素降解和其他工业生产中。

**关键词:** *Leifsonia* sp. ZF2019; GH3 糖苷水解酶;  $\beta$ -木糖苷酶; 盐耐受性; 木糖耐受性

**基金项目:** 国家大学生创新创业训练计划(202010341004); 浙江省自然科学基金(LY17C200019)

Supported by the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202010341004) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY17C200019)

\*Corresponding author. E-mail: [guangzhi@zafu.edu.cn](mailto:guangzhi@zafu.edu.cn)

Received: 25 July 2021; Revised: 13 October 2021; Published online: 28 October 2021

# Expression and characterization of a novel xylose-tolerant $\beta$ -xylosidase from *Leifsonia* sp. ZF2019

HE Yi, JIAO Ronghu, WANG Chenxi, WANG Xi, XU Guangzhi\*

College of Food and Health, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] We cloned and expressed a novel  $\beta$ -xylosidase Xyl4900 from *Leifsonia* sp. ZF2019 isolated from *Artibeus eryx* larvae and then investigated its enzymatic properties, aiming to provide foundations for developing  $\beta$ -xylosidase suitable for industrial application. [Methods] We used bioinformatics tools to analyze the gene of Xyl4900, expressed it in *Escherichia coli*, and investigated the enzymatic properties of the expressed protein. [Results] Xyl4900 had high homology with the  $\beta$ -glucosidase of GH3 family while had a domain of  $\beta$ -xylosidase. It was a novel  $\beta$ -xylosidase that could specifically hydrolyze 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside. Xyl4900 had the highest activity at 45 °C and pH 7.0, and it still maintained more than 80% of activity after being incubated at pH 6.0–9.0 for 14 h. This enzyme was barely affected by other metal ions (2.5 mmol/L) except  $\text{Cu}^{2+}$  and had strong tolerance to low-concentration organic solvents (5%, *V/V*). In addition, the Xyl4900 in 20% (*W/V*) NaCl or 100 mmol/L xylose solution showed the activity higher than 50%, demonstrating good salt or xylose tolerance. The  $K_m$ ,  $V_{max}$ , and xylose inhibition constant  $K_i$  of Xyl4900 were 0.80 mmol/L, 36.10 U/mg, and 150.12 mmol/L, respectively. In particular, we found that Xyl4900 could well degrade xylobiose and xylotriose. [Conclusion] Xyl4900 showed good pH stability and tolerance to xylose and salt, and thus could be used in hemicellulose degradation and other industrial production practices.

**Keywords:** *Leifsonia* sp. ZF2019; GH3 glycoside hydrolase;  $\beta$ -xylosidase; salt tolerance; xylose tolerance

木聚糖是半纤维素(自然界中含量第二丰富的木质纤维素生物物质)的主要成分,其骨架由木糖通过  $\beta$ -D-(1,4)的木糖苷键连接而成<sup>[1]</sup>。木聚糖完全降解为木糖单位需要木聚糖酶(内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶 EC3.2.1.8)、 $\beta$ -木糖苷酶(外切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶 EC3.2.1.37)、 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(EC3.2.1.55)、 $\alpha$ -L-葡萄糖醛酸酶(EC3.2.1.139)和乙酰木聚糖酯酶(EC3.2.1.72)的协同作用<sup>[2]</sup>。到目前为止,在细菌、古菌、真菌、甲壳类动物和昆虫中都发现了各种  $\beta$ -木糖苷酶。基于其氨基酸序列,可将不同来源的  $\beta$ -木糖苷酶分为不同的糖苷水解酶(GH)家族,而大多数  $\beta$ -木糖苷酶均属于 GH3、GH39、GH43、GH52 和 GH54 家族<sup>[3-4]</sup>。

$\beta$ -木糖苷酶在食品、饲料、造纸、制药以及生物转化工业中均有着极广泛的应用<sup>[5]</sup>。微生物是  $\beta$ -木糖苷酶的主要来源,包括细菌、放线菌及真菌<sup>[6-10]</sup>。然而,由于  $\beta$ -木糖苷酶较低的 pH 稳定性以及在木糖、盐和有机溶剂中的低活性,导致其工业应用中的适用性受到极大限制。因此,寻找新型耐 pH、耐盐和耐木糖的高活性  $\beta$ -木糖苷酶成为当前工业应用的研究重点,在半纤维素降解和其他工业行业中具有重要的研究意义及价值<sup>[11]</sup>。

梔子灰蝶是一种以梔子果为食的害虫,其幼虫易侵入梔子果从而导致梔子果的空壳化。基于此现象,本研究首次从梔子灰蝶幼虫肠道内分离出菌株 *Leifsonia* sp. ZF2019。据文献报

道, *Leifsonia* 属的菌种具有多种功能, 如铀元素污染修复、促进植物生长和产纤维素<sup>[12]</sup>, 但对其糖苷水解酶的研究还未见报道。基于此, 我们从 *Leifsonia* sp. ZF2019 中克隆、表达及鉴定了一种新型耐木糖的 GH3 家族  $\beta$ -木糖苷酶, 将其命名为 Xyl4900。对纯化后的 Xyl4900 的酶学性质进行了一系列研究。我们的结果表明 Xyl4900 具有良好的 pH 稳定性以及耐盐和耐木糖特性, 这使其能够很好地应用于工业生产和加工, 具有较高工业应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

*Leifsonia* sp. ZF2019 由本实验室保藏并经过全基因组测序(GenBank: CP065037-CP065038), 重组质粒 pET-28a-Xyl4900 由本实验构建并保藏。

#### 1.1.2 试 剂

对硝基苯基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、对硝基苯基  $\beta$ -D-吡喃木糖苷(pNPX)、对硝基苯基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷( $\alpha$ -pNPG)、对硝基苯酚(pNP) 购自上海麦克林生化科技有限公司。胶回收试剂盒、基因组 DNA 及质粒 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。DNA marker、蛋白 marker、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4DNA 连接酶、IPTG 购自大连宝生物。木糖、木二糖及木三糖购自上海源叶生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 Xyl4900 序列分析

本实验室已经对细菌 *Leifsonia* sp. ZF2019 全基因组进行测序, 依据全基因组的测序结果找到一个注释为糖基水解酶的基因(IT072\_04900), 对其所编码的蛋白质序列进行蛋白质组件分析并命名为 Xyl4900 (GenBank:

UAI80378.1): 采用 SignalP 5.0 sever (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对其核苷酸序列中的信号肽进行分析<sup>[13]</sup>; 利用 ExPASy (<https://web.expasy.org>)在线分析软件对蛋白质的等电点和分子质量进行预测。将 Xyl4900 与已知木糖苷酶比对, 并用软件 MEGA7.0 按照邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建系统发育树<sup>[14-15]</sup>, 除 Xyl4900 外, 通过 NCBI 的 BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))和 CAZY 数据库([www.cazy.org](http://www.cazy.org))检索其余 23 个  $\beta$ -木糖苷酶氨基酸序列。

### 1.3 质粒构建

依据 *Leifsonia* sp. ZF2019 全基因组数据设计 Xyl4900 上游引物(5'-TTTTTTTCATATGAGCGAAACCACGCTCC-3', 下划线序列为 *Nde* I 识别位点)和下游引物(5'-TTTGAATTCTCAGGAGATCGCGTCGGC-3', 下划线序列为 *Eco*R I 识别位点)。以 *Leifsonia* sp. ZF2019 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增  $\beta$ -木糖苷酶 Xyl4900 基因片段<sup>[16]</sup>。PCR 产物与 pET-28a(+)表达载体经 *Eco*R I 和 *Nde* I 双酶切后连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经过酶切和测序鉴定重组质粒, 将成功构建的质粒命名为 pET-28a-Xyl4900。

### 1.4 蛋白表达及酶的纯化

将 pET-28a-Xyl4900 转化至 BL21(DE3)以获得表达菌株。而后采用 IPTG 于 30 °C 诱导菌株表达(6 h), 10 000 r/min、4 °C 离心 10 min 后, 收集菌体。将菌体重悬于裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH 7.0)并超声破碎细胞。10 000 r/min, 4 °C 离心 20 min 后, 收集上清液, 利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白<sup>[17]</sup>。裂解上清液与 Ni-NTA 亲和层析柱于 4 °C 下孵育 1 h, 用含低浓度咪唑的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.0)去除杂蛋白。最后, 采用洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl,

500 mmol/L NaCl, 400 mmol/L 咪唑, pH 7.0)洗脱目标蛋白。纯化蛋白用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0)透析4次(每12 h换1次透析液), 10% SDS-PAGE测定纯化酶的纯度和分子量<sup>[18]</sup>。Bradford法测定酶浓度<sup>[19]</sup>。纯化蛋白保存于-80 °C备用。

### 1.5 酶活力测定及底物特异性

参考文献报道的方法对 Xyl4900 活性进行测定<sup>[20]</sup>: 130  $\mu$ L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 7.0)和 20  $\mu$ L 20 mmol/L 底物(*p*NPX、 $\alpha$ -*p*NPG 或 *p*NPG)在最适反应条件下预热 5 min, 加入适当稀释倍数的酶液 10  $\mu$ L, 反应 20 min, 然后加入 50  $\mu$ L 2 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止酶反应, 混匀并取 200  $\mu$ L 反应液加入酶标板中, 读取 OD<sub>405</sub> 的读数。酶活力单位(U)定义: 在上述条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚(*p*NP)所需的酶量为 1 个酶活力单位。酶比活力为每毫克蛋白质所具有的酶活力(U/mg)。

底物特异性: 通过是否水解硝基苯基底物 *p*NPX、 $\alpha$ -*p*NPG 和 *p*NPG 来研究 Xyl4900 的底物特异性。

### 1.6 温度和 pH 对 Xyl4900 的影响

在 45 °C 条件下按上述标准酶活力方法测定不同 pH (4.0–9.0)的酶活力, 确定其最适 pH, 将酶活力的最高点定义为 100%, 确定其最适 pH。将酶分别置于柠檬酸缓冲体系 (pH 4.0–8.0)和硼酸盐缓冲体系(pH 8.0–9.0)中 4 °C 条件下保存 14 h, 再按标准酶活力方法测定残余酶活力, 以未经处理酶液的酶活力为 100%, 确定 pH 稳定性。

在最适 pH 条件下, 按标准酶活力方法测定不同温度(15–60 °C)的酶活力, 将酶活力的最高点定义为 100%, 确定其最适反应温度。将酶置于不同温度下(25–60 °C)孵育 60 min, 而后立

即转移至冰上孵育 5 min, 按标准酶活力方法测定残余酶活力, 以未经处理酶液的酶活力为 100%, 确定其温度稳定性。

### 1.7 金属离子、有机溶剂及化学试剂对 Xyl4900 酶活性的影响

为了评价金属离子、有机溶剂和化学试剂对酶活性的影响, 采用金属离子 NaCl、NiCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、KCl、CuSO<sub>4</sub>、AlCl<sub>3</sub> (0.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L), 有机溶剂乙醇、异丙醇、乙二醇、甲醇、乙腈和吡啶(5% V/V、10% V/V、15% V/V、20% V/V), 以及化学试剂 SDS (0.1% W/V)、Tween-80 (1% W/V)、尿素 (1% W/V)和 EDTA (50 mmol/L)分别在最适条件下与 Xyl4900 混合, 按照标准酶活力方法测定酶活力。以未加金属离子、有机溶剂或化学试剂的酶活性作为 100%, 计算加入不同试剂后的残余酶活性。

### 1.8 NaCl 对 Xyl4900 活性的影响

将不同体积的 NaCl 溶液(溶于 pH 7.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液)与酶混合, 使得反应体系 NaCl 终浓度(V/V)依次为: 2.5%、5%、10%、15%、20%、25%。在最适条件下, 按照标准酶活力方法测定酶活力, 以未加 NaCl 的酶活作为 100%, 计算各实验组的相对酶活力。

### 1.9 木糖对 Xyl4900 活性的影响

在最适反应条件下, 按照标准酶反应体系, 以 *p*NPX 为底物测定终浓度为 0–1 000 mmol/L 的木糖对 Xyl4900 酶活力的影响并计算木糖抑制常数  $K_i$  值。将未添加木糖的酶活定义为 100%, 根据其比例计算相对活性。木糖的抑制常数  $K_i$  值定义为抑制 50%的  $\beta$ -木糖苷酶活性所需的木糖量。

### 1.10 Xyl4900 的动力学参数

使用 pH 7.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制终浓度为 0.2–2 mmol/L 的 *p*NPX 作为酶水

解的底物,然后加入适量的 $\beta$ -木糖苷酶在45 °C反应10 min,计算Xyl4900的米氏常数( $K_m$ )和最大速度( $V_{max}$ )。

### 1.11 薄层色谱水解产物分析

将190  $\mu$ L终浓度为5 mg/mL的木二糖、木三糖(溶于pH 7.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液)分别与10  $\mu$ L酶液(9.84 U/mg)于45 °C反应0、10及30 min后,在100 °C金属浴中孵育10 min终止反应。取上清液(12 000 r/min, 5 min)用于薄层层析色谱鉴定。将1  $\mu$ L上清液和2  $\mu$ L各低聚木糖混标(木糖、木二糖和木三糖)点样于GF254硅胶板上并展开( $V_{正丁醇}:V_{乙酸}:V_{水}=2:1:1$ ),晾干后均匀喷洒显色剂( $V_{无水乙醇}:V_{浓硫酸}=95:5$ ),置于100 °C烘箱烘干显色<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Xyl4900 $\beta$ -木糖苷酶的序列分析

实验室前期研究柘子灰蛾幼虫肠道糖苷水解细菌,分离得到菌株 *Leifsonia* sp. ZF2019。通过对该菌的全基因组糖苷水解酶基因分析得到Xyl4900基因,推测其可能为糖苷水解酶家族3 (GH3)基因。该基因编码770个氨基酸,理论等电点和分子量分别为4.76和81.17 kDa。没有预测到信号肽,表明该蛋白为胞内蛋白<sup>[22]</sup>。由于每个糖苷水解酶家族具有多种活性酶,如 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -木糖苷酶及 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶等,因此需对其进行进一步分析。基于BlastP比对发现推导的Xyl4900蛋白序列与 *Microbacterium imperiale* 的GH3  $\beta$ -葡萄糖苷酶(GenBank: MBP2421291.1)同源性最高(76.61%),但BlastP保守结构域序列分析表明,Xyl4900含有GH3家族中的木糖苷酶结构域(PLN03080)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。基于此,推测Xyl4900可能是一种新的 $\beta$ -木糖

苷酶。

为了进一步了解Xyl4900与 $\beta$ -木糖苷酶之间的进化关系,我们分别使用NJ和MP方法构建了24个候选序列的系统发育树,结果显示这两种方法均显示相同的拓扑结构(未显示NJ树)。系统发育树(图1)显示存在4个支撑良好的支系,每个支系由一个独立单系群组成。支链I为细菌、古菌和真菌的GH3  $\beta$ -木糖苷酶,支链II为GH43  $\beta$ -木糖苷酶,支链III为GH39  $\beta$ -木糖苷酶,支链IV为GH52  $\beta$ -木糖苷酶。其中,GH39和GH52的 $\beta$ -木糖苷酶成员都来自细菌,真菌和古菌中几乎没有相关信息,而GH3和GH43家族中的 $\beta$ -木糖苷酶来源广泛<sup>[4,23-24]</sup>。在MP树中,Xyl4900与GH3家族 *Pseudothermotoga thermarum* (GenBank: WP\_013931466.1)和 *Caulobacter vibrioides* (GenBank: WP\_010920890.1)等来源的 $\beta$ -木糖苷酶属于同一分支。其中,Xyl4900与 *Pseudothermotoga thermarum* 来源的 $\beta$ -木糖苷酶亲缘关系最近。故综合分析,Xyl4900可能属于GH3家族一种新的 $\beta$ -木糖苷酶。

### 2.2 Xyl4900 的表达与纯化及底物特异性

研究任何一种酶的理化性质或特性,蛋白纯化是必不可少的一步<sup>[11]</sup>。我们克隆了Xyl4900基因,与表达载体pET-28a连接,构建了重组质粒pET-28a-Xyl4900。并将其转入大肠杆菌BL21(DE3)菌株,以IPTG诱导表达,再经Ni-NTA亲和层析柱分离纯化,得到目的蛋白。SDS-PAGE检测显示,纯化后得到了单一的目的蛋白条带,与Xyl4900的理论分子量大小81.17 kDa基本一致(图2)。

以pNPX、pNPG和 $\alpha$ -pNPG为底物,研究了Xyl4900的底物特异性。结果表明,Xyl4900只能水解pNPX底物,表明Xyl4900为 $\beta$ -木糖苷酶。

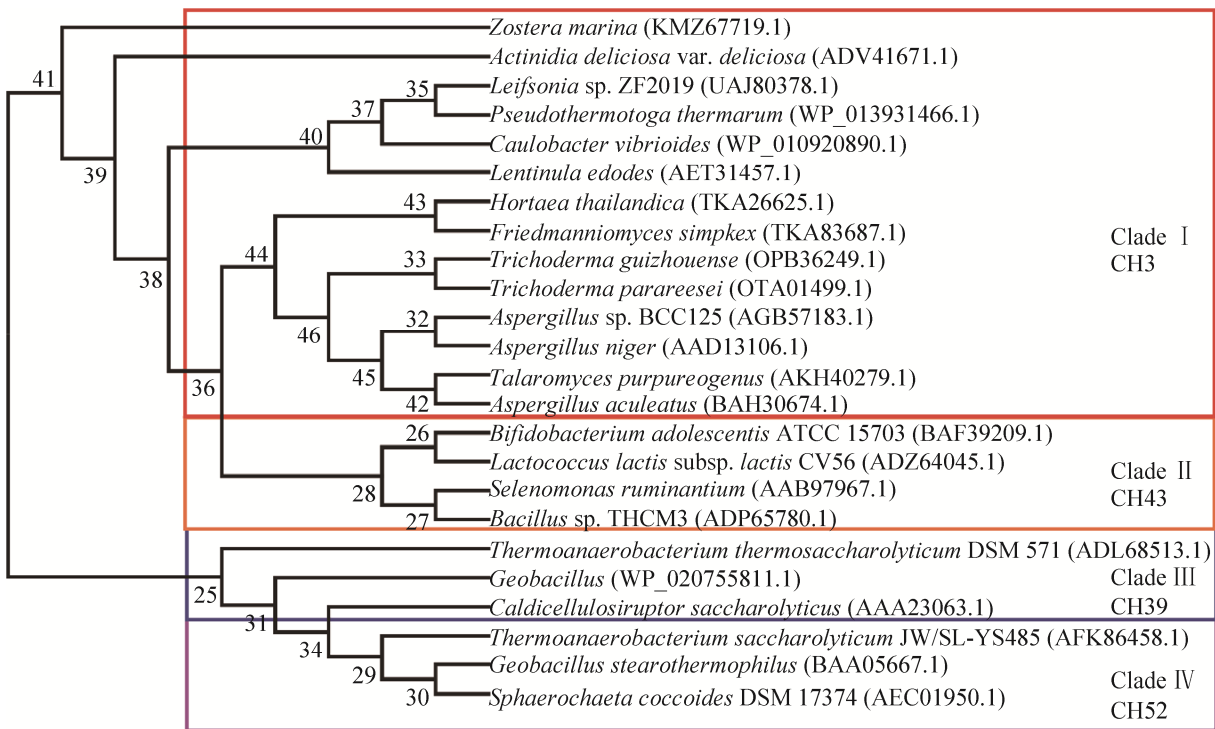


图 1 Xyl4900 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of Xyl4900 and other 23 proteins. Accession number for each enzyme is showed in bracket behind the bacterial name, and numbers on nodes correspond to percentage bootstrap values for 1 000 replicates. Xyl4900 is shown in red color.

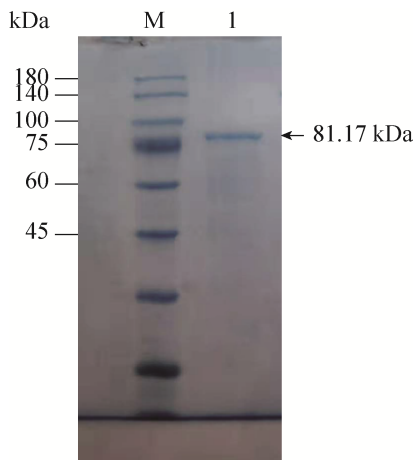


图 2 SDS-PAGE 电泳

Figure 2 Expression and purification for Xyl4900 by SDS-PAGE. M: protein marker (C610013-0250); lane 1: purified target protein.

### 2.3 pH 和温度对 Xyl4900 活性和稳定性的影响

图 3A 显示当 pH 低于 5.5 或高于 7.5 时

Xyl4900 的活性快速下降, 而在 pH 7.0 时其酶活力达到最大值。因此, Xyl4900 的最适 pH 为 7.0。将酶液在不同 pH 的缓冲液中孵育 14 h, 结果显示 Xyl4900 在较广的 pH 值范围内(pH 6.0–9.0)均展现出了较高的稳定性, 其残余酶活力均保持在 80%以上(图 3B)。不同来源的 β-木糖苷酶的最适 pH 及 pH 稳定性差异较大, 但大多数 β-木糖苷酶的最适 pH 为 4.0–7.0<sup>[25]</sup>。例如来自 Yak rumen 宏基因组的 RuXyn1 最适 pH 为 7.0, 在 pH 5.0–6.0 内稳定<sup>[26]</sup>, 来自 *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 的 BXA43 最适 pH 为 5.5, 在 pH 4.0–8.0 范围内稳定<sup>[27]</sup>(表 1)。我们的结果表明 Xyl4900 可在碱性环境下较好地发挥其催化功效。而在碱性条件下稳定存在的 β-木糖苷酶可在许多工业应用中发挥较大作用。

本研究设立了 25–60 °C 的温度范围, 研究

了温度对 Xyl4900 活性和稳定性的影响。在 40–50 °C 的温度范围内, Xyl4900 相对酶活性均高于 80%, 最佳温度为 45 °C (图 3C)。当温度高于 50 °C 时, 酶活性急剧下降。Xyl4900 的最适温度与 *Enterobacter* sp. 和 *B. adolescentis* LMG10502 等来源的  $\beta$ -木糖苷酶接近<sup>[28–29]</sup> (表 1)。

此外, 酶液在 25–60 °C 的条件下分别孵育 1 h 后, 发现在温度低于 40 °C 的条件下, Xyl4900 具有较好的稳定性, 残余酶活力均保持在 80% 以上(图 3D)。然而, 当温度上升至 60 °C 时, Xyl4900 的酶活性几乎完全丧失, 表明 Xyl4900 的耐热性欠佳。

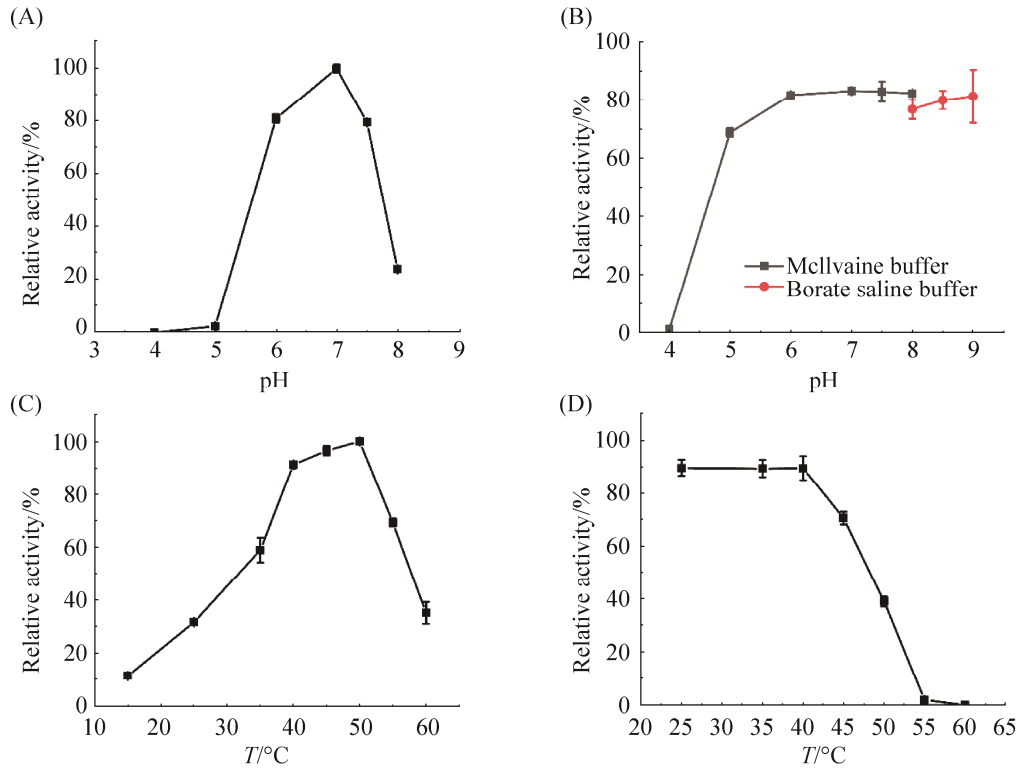


图 3 pH 及温度对 Xyl4900 酶活力的影响

Figure 3 Effects of pH and temperature on the enzyme activity of Xyl4900. A: Optimum pH; B: pH stability; C: Optimum temperature; D: Thermostability.  $\bar{X} \pm SD$  ( $n=3$ ).

表 1 不同来源的  $\beta$ -木糖苷酶的性质比较

Table 1 Comparison of properties of  $\beta$ -xylosidase from different sources

Sources	Protein name	MW/kDa	Optimum $T_m/^\circ\text{C}$	Optimum pH	pH stability	$K_i$ of xylose/ (mmol/L)	References
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	BXA4	62.00	50	5.5	4.0–8.0	–	[27]
<i>Anoxybacillus</i> sp. 3M	AbXyl	140.00	65	5.5	4.5–8.0	21.3	[30]
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	–	87.00	55	6.5	6.0–9.0	40.0	[31]
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08	GbtXyl43A	58.10	–	5.0	–	76.0	[32]
<i>Enterobacter</i> sp.	Xyl43	61.66	40	6.0	–	–	[29]
<i>Thermomyces Lanuginosus</i> CAU44	TlXyl43	51.60	55	6.5	7.0–9.5	63.0	[33]
Yak rumen metagenome	RuXyn1	42.00	40	7.0	5.0–6.0	76.0	[26]
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	HXYLA	37.00	50	7.0	5.0–7.0	603.0	[10]
<i>B. adolescentis</i> LMG10502	XylC	62.00	50	6.0–7.0	–	–	[28]
<i>Paecilomyces thermophila</i>	PtXyl43	52.30	55	7.0	–	–	[20]
<i>Leifsonia</i> sp. ZF2019	Xyl4900	81.17	45	7.0	5.0–9.0	150.0	This study

## 2.4 金属离子、有机溶剂和化学试剂对 Xyl4900 酶活性的影响

11 种金属离子对 Xyl4900 活性的影响如表 2 所示: 仅 0.5 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  对 Xyl4900 有较强的抑制作用, 且浓度为 2.5 mmol/L 时酶活力几乎完全丧失, 其他金属离子对其活性影响较小。这可能是由于铜离子催化半胱氨酸分子形成的自氧化, 从而导致了分子内和分子间二硫键的形成或亚磺酸的形成<sup>[34]</sup>, 进而影响了 Xyl4900 的活力。这与文献报道的大多数  $\beta$ -木糖苷酶的酶活都会被  $\text{Cu}^{2+}$  抑制的说法一致<sup>[34]</sup>。

SDS、Tween-80、尿素和 EDTA 对 Xyl4900 酶活性的影响如表 3 所示。SDS 和尿素是蛋白

表 2 不同金属离子对 Xyl4900 酶活性的影响  
Table 2 Effect of different metal ions on the enzyme activity of Xyl4900

Metal ions	Relative activity/%	
	2.5 mmol/L	0.5 mmol/L
None	100.00±0.13	100.00±0.13
$\text{Ca}^{2+}$	104.97±0.66	105.09±3.18
$\text{K}^{+}$	105.73±0.30	102.97±1.15
$\text{Na}^{+}$	100.41±2.24	99.33±0.79
$\text{Co}^{2+}$	101.82±2.35	101.37±0.74
$\text{Mn}^{2+}$	104.66±1.62	105.13±1.88
$\text{Al}^{3+}$	104.24±4.57	105.95±5.83
$\text{Mg}^{2+}$	101.70±0.31	108.33±2.01
$\text{Cu}^{2+}$	35.17±1.04	41.99±0.63
$\text{Fe}^{3+}$	105.41±0.40	105.59±0.05
$\text{Zn}^{2+}$	96.95±2.35	97.68±2.13
$\text{Ni}^{2+}$	97.14±2.25	105.51±2.39

表 3 不同化学试剂对 Xyl4900 酶活性的影响  
Table 3 Effect of different chemical reagents on the enzyme activity of Xyl4900

Chemicals	Concentration	Relative activity/%
None	0	100.00±2.38
SDS	0.1%	7.06±0.48
Tween-80	1%	98.81±4.035
Urea	1%	61.48±7.54
EDTA	50 mmol/L	93.48±0.82

质变性剂, 对酶活性会产生抑制作用, 尤其是 SDS, 几乎使得酶活力完全丧失。而 Xyl4900 在 1% 尿素条件下仍有 61.48%±7.54% 的酶活力, 表明对尿素有一定抗性。另外, Tween-80 和 EDTA 对酶活性无明显影响。

纤维素的预处理和天然产物的增溶通常均使用乙醇等有机溶剂, 但其残留会影响后续酶解反应<sup>[35]</sup>。因此, 对各种有机溶剂的耐受性是  $\beta$ -木糖苷酶可应用于工业的重要特性。乙醇等有机溶剂对 Xyl4900 活性的影响如图 4A 所示。结果显示, 该酶对 5% (W/V) 的有机溶剂均有较好的耐受性, 酶活性均高于 80%, 随着有机溶剂浓度的增加, 酶活性受到抑制, 表明 Xyl4900 可以耐受低浓度的有机溶剂, 但对高浓度有机溶剂敏感。

## 2.5 NaCl 对 Xyl4900 酶活性的影响

耐盐性酶在与海水相关的工业加工过程中的应用(如淡水储备等)方面, 均体现出极高的价值<sup>[36]</sup>。此外, 高浓度盐还可简化灭菌步骤, 从而进一步降低总成本<sup>[16]</sup>。然而, 由于高浓度盐严重影响蛋白质的活性和稳定性, 大多数表征的木糖苷酶对高浓度的 NaCl 很敏感<sup>[37]</sup>。例如来自 *Caulobacter crescentus* 的木糖苷酶 CcXynB2 在 2 mmol/L NaCl 存在下仅保持 25% 的相对活性。目前, 有关耐盐的木糖苷酶报道有以下几个: Hashimoto 等报道了一种来自 *A. oryzae* 的耐盐  $\beta$ -木糖苷酶, 该酶在 3.0 mol/L (约 17% W/V) NaCl 中保持了约 60% 的初始活力; De Carvalho 等报道了来自 *Colletotrichum Graminicola* 的一种高度耐盐的  $\beta$ -木糖苷酶, 该酶在 2.5 mol/L NaCl (约 14% W/V) 存在下保持了约 63% 的初始活力<sup>[37]</sup>; Xu 等发现了来自 *Massilia* sp. RBM26 的木糖苷酶 XylRBM26 具有极好的耐盐性, 在 1.5–3.5 mol/L 的 NaCl 浓度范围内保持了 134.4% 和 96.6% 的活性, 即使在 4.0 mol/L NaCl 中也



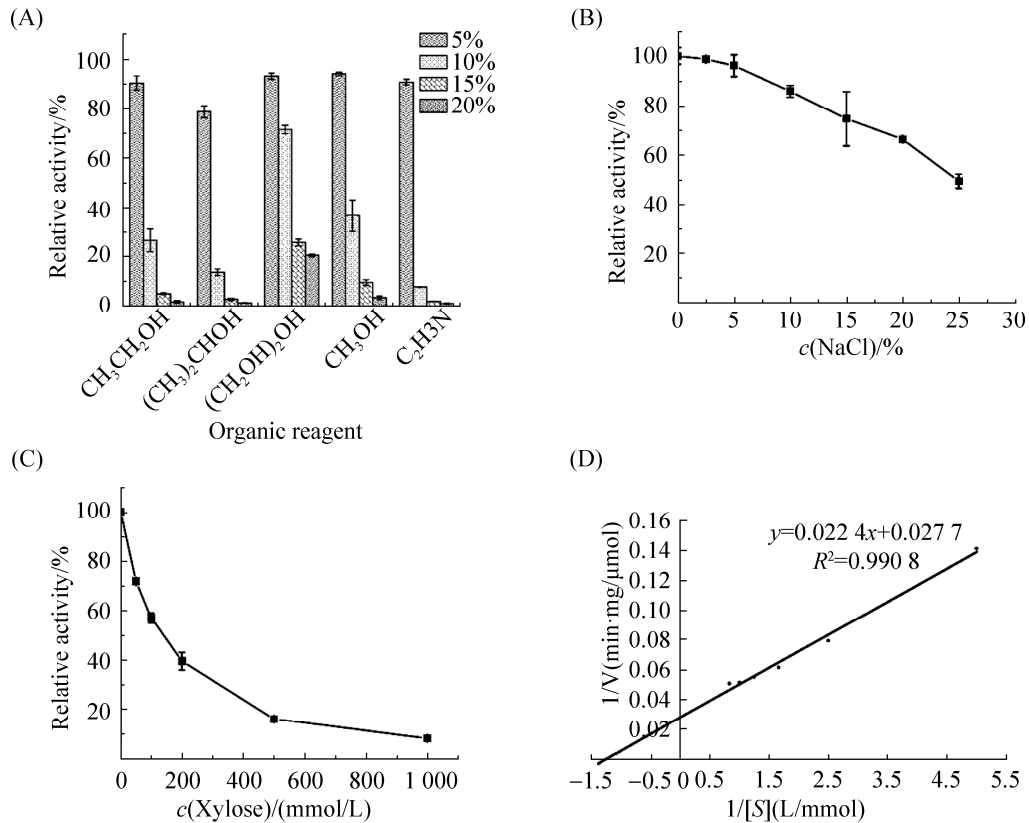


图 4 有机溶剂、NaCl、木糖及 *p*NPX 对 Xyl4900 酶活性的影响

Figure 4 Effects of organic solvents (A), NaCl (B) and xylose (C) on the enzyme activity of Xyl4900. D: Lineweaver-Burk plots of the Xyl4900.  $\bar{X} \pm SD$  ( $n=3$ ).

保持了 77.9% 的初始活性<sup>[16]</sup>。我们的结果显示，Xyl4900 在 2.5% (*W/V*) NaCl (海水中 NaCl 浓度一般为 2.4%) 中保持了 97% 的初始酶活力，甚至在 25% (*W/V*) NaCl 中仍保持了 43% 以上的酶活力(图 4B)，仅次于来自 *Massilia* sp. RBM26 的木糖苷酶 XylRBM26<sup>[16]</sup>，表明 Xyl4900 具有良好的耐盐性。

## 2.6 木糖对 Xyl4900 酶活性的影响

$\beta$ -木糖苷酶与木糖的亲性强，其活性很容易受到木糖抑制。10 mmol/L 木糖对大多数  $\beta$ -木糖苷酶就能产生明显抑制作用，这限制了其在生物质转化中的应用<sup>[25]</sup>。本研究探究了不同木糖浓度(0–1 000 mmol/L)对 Xyl4900 酶活性的影响(图 4C)。结果显示在 50 mmol/L 和 100 mmol/L

木糖存在下，该酶仍保留了 71.63% 和 56.78% 的酶活性，高于 *Thermomyces lanuginosus* CAU44 的  $\beta$ -木糖苷酶(其保留的酶活性分别为 45.2% 和 33.1%)<sup>[33]</sup>。此外，经计算得出 Xyl4900 的木糖抑制常数  $K_i$  值为 150.12 mmol/L，高于大多数来源的  $\beta$ -木糖苷酶(表 1)，表明 Xyl4900 具有较强的木糖耐受性。Xyl4900 是 *Leifsonia* 属首次报道的耐木糖的木糖苷酶，因此该酶具有被挖掘的潜力。到目前为止， $\beta$ -木糖苷酶的木糖耐受机制尚不清楚，仅少量的研究解释了  $\beta$ -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受机制，推测其耐受性可能与葡萄糖不和底物竞争结合位点有关<sup>[38]</sup>。

## 2.7 Xyl4900 的动力学参数

在最适条件下，以 *p*NPX 为底物测得

Xyl4900 的比活力为 9.84 U/mg, 根据 Lineweaver-Burk 图(图 4D)得出酶的  $K_m$  值为 0.80 mmol/L,  $V_{max}$  为 36.10 U/mg。Xyl4900 的  $K_m$  值低于来自 *Paecilomyces therophilila* 的  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[39]</sup>, 高于来自 *Thermotoga thermarum* 的  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[20]</sup>, 这表明 Xyl4900 与它们的性质有所差别, 尤其是在底物的亲和能力方面。

### 2.8 Xyl4900 水解木二糖产物分析

薄层层析色谱(TLC)分析结果(图 5)显示 Xyl4900 能够有效降解木二糖、木三糖。反应 10 min 后已有较多水解产物产生, 反应 30 min 后木二糖和木三糖已完全降解为木糖, 这表明 Xyl4900 具有较强的低聚木糖转化能力, 符合工业上对半纤维素的降解需求。

## 3 讨论与结论

本研究从 *Leifsonia* sp. ZF2019 中首次克隆表达得到一种新型耐盐和耐木糖的 GH3 木糖苷酶 Xyl4900, 该酶是与葡萄糖苷酶同源性较高但具有木糖苷酶结构域和分支关系的 GH3  $\beta$ -木糖苷酶(特异性水解 pNPX)。Xyl4900 在碱性条件下具有较好的活性, 在中等温度下具有稳定性。与大多数的木糖苷酶相比, Xyl4900 可耐受多种金属离子和低浓度的有机溶剂。最重要的是, Xyl4900 对木糖、NaCl 具有极佳的耐受性。此外, Xyl4900 可以水解木三糖和木二糖,

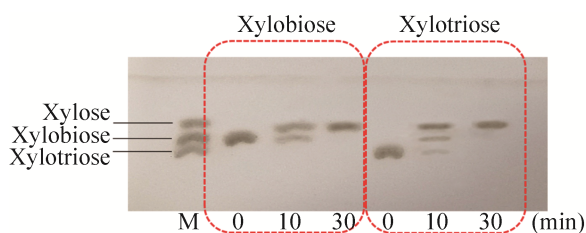


图 5 Xyl4900 降解木二糖和木三糖分析

Figure 5 Analysis of xylobiose and xylotriose hydrolyzed by Xyl4900. M: mixture of xylose, xylobiose and xylotriose (5 mg/mL).

具有较强的低聚木糖转化能力。这些特性使得 Xyl4900 可能成为应用于各种行业的候选产品, 包括食品、饮料和生物能源。

### 参考文献

- [1] Saha BC. Purification and properties of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Bioresource Technology*, 2003, 90(1): 33–38.
- [2] Khandeparker R, Jalal T. Xylanolytic enzyme systems in *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 and *Lactobacillus* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(2): 245–254.
- [3] Benassi VM, De Lucas RC, Jorge JA, Polizeli MD. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming  $\beta$ -xylosidase and arabinanase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(4): 1459–1467.
- [4] Patel H, Kumar AK, Shah A. Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family  $\beta$ -xylosidase/ $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* ADH-11. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 1260–1269.
- [5] Jordan DB, Wagschal K. Properties and applications of microbial beta-D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1647–1658.
- [6] Tsujibo H, Miyamoto K, Kuda T, Minami K, Sakamoto T, Hasegawa T, Inamori Y. Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(1): 371–375.
- [7] Lorenz WW, Wiegel J. Isolation, analysis, and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL YS485: a beta-xylosidase and a novel acetyl xylan esterase with cephalosporin C deacetylase activity. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(17): 5436–5441.
- [8] Lasrado LD, Gudipati M. Purification and characterization of  $\beta$ -D-xylosidase from *Lactobacillus brevis* grown on xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1978–1983.
- [9] Espina G, Eley K, Pompidor G, Schneider TR, Crennell SJ, Danson MJ. A novel  $\beta$ -xylosidase structure from

- Geobacillus thermoglucosidasius*: the first crystal structure of a glycoside hydrolase family GH52 enzyme reveals unpredicted similarity to other glycoside hydrolase folds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2014, 70(5): 1366–1374.
- [10] Cintra LC, Fernandes AG, De Oliveira ICM, Siqueira SJL, Costa IGO, Colussi F, Jesuino RSA, Ulhoa CJ, De Faria FP. Characterization of a recombinant xylose tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105: 262–271.
- [11] Li Q, Jiang YJ, Tong XY, Pei JJ, Xiao W, Wang ZZ, Zhao LG. Cloning and characterization of the  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus turgidum* for high efficient biotransformation of 10-deacetyl-7-xylosyltaxol. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103357.
- [12] Tan WF, Li Y, Guo F, Wang YC, Ding L, Mumford K, Lv JW, Deng QW, Fang Q, Zhang XW. Effect of *Leifsonia* sp. on retardation of uranium in natural soil and its potential mechanisms. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2020, 217: 106202.
- [13] Nielsen H, Tsirigos KD, Brunak S, Heijne G. A brief history of protein sorting prediction. *The Protein Journal*, 2019, 38(3): 200–216.
- [14] Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS Journal*, 2005, 272(20): 5101–5109.
- [15] 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.
- [16] Xu B, Dai LM, Zhang WH, Yang YJ, Wu Q, Li JJ, Tang XH, Zhou JP, Ding JM, Han NY, Huang ZX. Characterization of a novel salt-, xylose- and alkali-tolerant GH43 bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from the gut bacterial genome. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(4): 429–437.
- [17] Xu B, Dai LM, Li JJ, Deng M, Miao HB, Zhou JP, Mu YL, Wu Q, Tang XH, Yang YJ, Ding JM, Han NY, Huang ZX. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from *Massilia* sp. RBM26 isolated from the feces of *Rhinopithecus bieti*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1): 9–19.
- [18] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [20] Shi H, Li X, Gu HX, Zhang Y, Huang YJ, Wang LL, Wang F. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 27.
- [21] Yin YR, Hu QW, Xian WD, Zhang F, Zhou EM, Ming H, Xiao M, Zhi XY, Li WJ. Characterization of a neutral recombinant xylanase from *Thermoactinospira rubra* YIM 77501<sup>T</sup>. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(3): 429–436.
- [22] Yin YR, Xian WD, Han MX, Zhou EM, Liu L, Alkhalifah DHM, Hozzein WN, Xiao M, Li WJ. Expression and characterisation of a pH and salt tolerant, thermostable and xylose tolerant recombinant GH43  $\beta$ -xylosidase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462<sup>T</sup> for promoting hemicellulose degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2019, 112(3): 339–350.
- [23] Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, Barriuso J, Prieto A, Fernández De Toro B, Canales-Mayordomo Á, Martínez MJ. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: an enzyme displaying regioselective transxylosylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(18): 6380–6392.
- [24] Tong XY, Qi ZP, Zheng DY, Pei JJ, Li Q, Zhao LG. High-level expression of a novel multifunctional GH3 family  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase/ $\beta$ -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum* in *Escherichia coli*. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 111: 104906.
- [25] Rohman A, Dijkstra BW, Puspaningsih NNT.  $\beta$ -xylosidases: structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5524.
- [26] Zhou JG, Bao L, Chang L, Zhou YF, Lu H. Biochemical and kinetic characterization of GH43  $\beta$ -D-xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and GH30  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/ $\beta$ -D-xylosidase from rumen metagenome. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(1): 143–152.

- [27] Viborg AH, Sørensen KI, Gilad O, Steen-Jensen DB, Dilokpimol A, Jacobsen S, Svensson B. Biochemical and kinetic characterisation of a novel xylooligosaccharide-upregulated GH43  $\beta$ -D-xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (BXA43) from the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *AMB Express*, 2013, 3(1): 1–8.
- [28] Lagaert S, Pollet A, Delcour JA, Lavigne R, Courtin CM, Volckaert G. Characterization of two  $\beta$ -xylosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their contribution to the hydrolysis of prebiotic xylooligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(6): 1179–1185.
- [29] Campos E, Negro Alvarez MJ, Sabaris Di Lorenzo G, Gonzalez S, Rorig M, Talia PL, Grasso DH, Sáez F, Manzanares Secades P, Ballesteros Perdices M, Cataldi AA. Purification and characterization of a GH43  $\beta$ -xylosidase from *Enterobacter* sp. identified and cloned from forest soil bacteria. *Microbiological Research*, 2014, 169(2/3): 213–220.
- [30] Marcolongo L, La Cara F, del Monaco G, Paixão SM, Alves L, Marques IP, Ionata E. A novel  $\beta$ -xylosidase from *Anoxybacillus* sp. 3M towards an improved agro-industrial residues saccharification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 1224–1234.
- [31] Pinphanichakarn P, Tangsakul T, Thongnumwon T, Talawanich Y, Thamchaipenet A. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(7): 727–733.
- [32] Wagschal K, Heng C, Lee CC, Robertson GH, Orts WJ, Wong DWS. Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 155(1/2/3): 1–10.
- [33] Chen Z, Jia H, Yang Y, Yan Q, Jiang Z, Teng C. Secretory expression of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* and characterization of its recombinant enzyme. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(5): 330–337.
- [34] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1–43.
- [35] Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(3): 270–282.
- [36] Sinha R, Khare SK. Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 165.
- [37] De Carvalho DR, Carli S, Meleiro LP, Rosa JC, De Oliveira AHC, Jorge JA, Furriel RPM. A halotolerant bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 741–750.
- [38] Pang PJ, Cao LC, Liu YH, Xie W, Wang Z. Structures of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase provide insights into its mechanism. *Journal of Structural Biology*, 2017, 198(3): 154–162.
- [39] Yan QJ, Wang L, Jiang ZQ, Yang SQ, Zhu HF, Li LT. A xylose-tolerant beta-xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: characterization and its co-action with the endogenous xylanase. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5402–5410.

(本文责编 张晓丽)