

## 综述

# 嗜热和嗜碱木聚糖酶研究进展

柏文琴<sup>1,2</sup>, 王钦宏<sup>2</sup>, 马延和<sup>2</sup>

1 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041000

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

柏文琴, 王钦宏, 马延和. 嗜热和嗜碱木聚糖酶研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(6): 828-837.

Bai WQ, Wang QH, Ma YH. Progress in the thermophilic and alkalophilic xylanases. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 828-837.

**摘要:** 木聚糖酶是降解半纤维素主要成分木聚糖的关键酶, 广泛应用于食品、饲料、制浆造纸、生物脱胶等行业。特别是在造纸工业中, 木聚糖酶显示出巨大的应用潜力, 已成为国内外研究的热点。纸浆漂白工艺中需要酶在高温碱性条件下发挥作用。目前, 主要通过筛选野生型木聚糖酶资源和对现有中性中温木聚糖酶分子改造的方法获得嗜热嗜碱木聚糖酶。文中就嗜热嗜碱木聚糖酶的筛选、嗜热嗜碱机制研究及分子改造进展进行了综述, 并对其前景进行了展望。

**关键词:** 木聚糖酶, 嗜热, 嗜碱, 筛选, 分子改造

## Progress in the thermophilic and alkalophilic xylanases

Wenqin Bai<sup>1,2</sup>, Qinong Wang<sup>2</sup>, and Yanhe Ma<sup>2</sup>

1 College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041000, Shanxi, China

2 CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Xylanase is the key enzyme to degrade xylan that is a major component of hemicellulose. The enzyme has potential industrial applications in the food, feed, paper and flax degumming industries. The use of xylanases becomes more and more important in the paper industry for bleaching purposes. Xylanases used in the pulp bleaching process should be stable and active at high temperature and alkaline pH. Thermophilic and alkalophilic xylanases could be obtained by screening the wild type xylanases or engineering the mesophilic and neutral enzymes. In this paper, we reviewed recent progress of screening of the thermophilic and alkalophilic xylanases, molecular mechanism of thermal and alkaline

**Received:** March 21, 2014; **Accepted:** April 11, 2014

**Supported by:** Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-015).

**Corresponding author:** Wenqin Bai. Tel/Fax: +86-22-24828746; E-mail: bwqp450@163.com

中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-015) 资助。

网络出版时间: 2014-04-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140172.html>

adaptation and molecular engineering. Future research prospective was also discussed.

**Keywords:** xylanase, thermophilic, alkalophilic, screening, molecular engineering

木聚糖是植物细胞壁半纤维素的主要成分,是自然界中第二大含量丰富的可再生生物资源<sup>[1]</sup>。内切  $\beta$ -1,4-木聚糖酶 ( $\beta$ -1,4-endoxylanase, EC3.2.1.8), 简称木聚糖酶,能水解木聚糖主链的  $\beta$ -1,4 糖苷键,产生寡聚木糖和少量木糖,是降解木聚糖的关键酶<sup>[2]</sup>。由于其具有降解植物木聚糖的作用,可广泛应用于食品、饲料、造纸、麻类脱胶和燃料生产等工业领域<sup>[3]</sup>。特别是在造纸工业中,木聚糖酶显示出巨大的应用潜力,已成为国内外研究的热点。木聚糖酶在造纸工业中主要用于纸浆的助漂白,可以降低含氯漂白剂的用量,大幅度降低漂白废液中有机污染物的量,还可以提高纸张的质量,具有显著的生态和经济效益<sup>[4]</sup>。

造纸工艺过程中纸浆多处于高温碱性条件下,为减少能耗和简化工艺流程,需要木聚糖酶具备在碱性和高温条件下的高稳定性和高活性<sup>[5]</sup>。目前,国内外一般通过两种途径获得嗜热嗜碱木聚糖酶:一是从极端环境中发掘木聚糖酶资源(包括产木聚糖酶菌株和宏基因组文库的筛选);二是对现有的中性中温的木聚糖酶通过蛋白质工程改造,提高其耐热和耐碱性,以符合工业化生产的需要。

## 1 嗜热嗜碱木聚糖酶的筛选

嗜碱木聚糖酶通常从高碱样品(盐碱地、盐碱沙漠、碱湖和造纸工业的废水)中分离的嗜碱菌中筛选。目前,已经从很多嗜碱菌中分离到木聚糖酶。但由于大多数为胞内酶,不需要适应宿

主菌所处的碱性环境,因此其最适 pH 仍在中性范围,但在碱性条件下可保持高的催化活性<sup>[3]</sup>。从嗜碱菌中也分离到一些碱性木聚糖酶,如来源于芽胞杆菌 *Bacillus* sp. 41M-1 的木聚糖酶 XynJ 的最适 pH 为 9.0<sup>[6]</sup>,来源于 *Bacillus* sp. AR-009 木聚糖酶 XylB 的最适 pH 为 9.0–10.0<sup>[7]</sup>,以及来源于链霉菌 *Streptomyces* sp. CS802 的极端嗜碱木聚糖酶 Xyn802,其最适 pH 高达 12.0<sup>[8]</sup>。本课题组从 *Bacillus* sp. SN5 中获得耐碱的木聚糖酶 Xyn11A-LC,其最适 pH 为 7.5–8.0,在 pH 8.5–11.0 条件下保温 24 h 后可保留 80%以上活性(有关内容待发表)。这些碱性木聚糖酶资源的发掘,有望用于造纸或麻类脱胶等工业领域。

嗜热木聚糖酶可从各种高温环境样品中分离,如温泉、火山口附近及高温堆肥中。目前已经分离筛选到了大量的嗜热木聚糖酶,但是大多数酶的最适 pH 在中性或酸性范围内。到目前为止,筛选到的极端嗜热的木聚糖酶是来源于热袍菌 *Thermotoga* sp. FjSS3-B.1 的木聚糖酶,最适反应温度高达 105 °C,将酶固定在微孔玻璃珠后,酶的最适温度提高到 110 °C,105 °C 时的半衰期从不到 2 min 提高到 10 min<sup>[9]</sup>。近几年,人们陆续发现了一些嗜热的木聚糖酶。Sriyapai 等从嗜热放线菌马杜拉放线菌 *Actinomadura* sp. S14 中分离了木聚糖酶 XynS14,其最适温度为 80 °C,最适 pH 为 6.0,在 pH 5.0–10.0 和 80 °C 保持稳定<sup>[10]</sup>。Fawzi 等从米黑根毛霉 *Rhizomucor miehei* NRL 3169 中分离了嗜热木聚糖酶,其最适温度为 75 °C,最适 pH 为 5.0–6.5,90 °C 的半

衰期为 30 min<sup>[11]</sup>。Du 从特异腐质霉 *Humicola insolens* Y1 分离了 3 个 10 家族木聚糖酶 xynA、xynB 和 xynC，它们的最适 pH 为 6.0–7.0，最适温度为 70–80 °C<sup>[12]</sup>。来源于 *Thermotoga* sp. 的 10 家族木聚糖酶在 95 °C 和 pH 7.0 时具有最高催化活性，比活力达 145.8 U/mg<sup>[13]</sup>。

木聚糖酶应用在纸浆漂白中需要同时具备嗜热和嗜碱的特性，到目前为止，从嗜碱或嗜热菌中分离到一些嗜热碱的木聚糖酶 (表 1)。与已经分离到的数百个木聚糖酶资源相比，嗜热碱木聚糖酶的数量非常有限。除了从菌株中分离到嗜热碱的木聚糖酶外，从宏基因组文库中也可获得嗜热碱木聚糖酶基因资源。Weerachavangkul 等

从嗜热木质纤维素降解微生物菌群的宏基因组中，以 10 家族木聚糖酶基因保守序列为引物，用基因组步行 PCR (Genome walking PCR) 方法克隆到全长序列，重组木聚糖酶 Xyn3F 的最适反应温度为 65–70 °C，最适 pH 为 9.0–10.0。在 pH 9.0 时，60 °C 保温 1 h 后残余酶活性达 80% 以上<sup>[14]</sup>。Verma 等从堆肥土壤样品的宏基因组文库中，克隆了木聚糖酶 *Mxyl* 基因。尽管堆肥土壤样品的 pH 在酸性范围，但是重组酶 rMxyl 显示出高的嗜热嗜碱性、高的热稳定性及碱稳定性，其最适 pH 为 9.0，最适温度为 80 °C，在 80 °C 和 90 °C 时的  $T_{1/2}$  分别为 2 h 和 15 min<sup>[15]</sup>。这些嗜热碱木聚糖酶资源具有应用于纸浆助漂的潜力。

表 1 嗜热碱木聚糖酶的酶学性质

Table 1 Characterization of thermophilic and alkalophilic xylanases

Enzyme abbreviation	Source	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Stabilities at		$V_{max}$ (U/mg)	Reference
				pH	Temperature (°C)		
XylB	<i>Bacillus</i> sp. AR-009	75	9.0–10.0	8.0–9.0	60–65	367.9	[7]
Xylanase	<i>Bacillus halodurans</i>	80	9.0	8.0–11.0	60 (2 h)	441	[16]
XylC	<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	65	8.5–9.0	–	65 (125 min <sup>1/2</sup> )	–	[17]
X-II	<i>Bacillus licheniformis</i> 77-2	75	8.0–10.0	11.0	60 (1 h)	9.1	[18]
Xyn10A	<i>Bacillus halodurans</i> S7	75	9.0	5.5–10.5 (12 h)	50 (12 h)	230	[19]
Xylanase	<i>Bacillus halodurans</i> TSPV1	90	10.0	10 (4 h)	90 (60 h <sup>1/2</sup> )	–	[20]
Xylanase	<i>Bacillus halodurans</i> TSEV1	80	9.0	4.0–11.0	70 (40 min <sup>1/2</sup> ); 80 (15 min <sup>1/2</sup> )	–	[21]
rXyl-gtd	<i>Geobacillus</i> sp. TSAA1	70	9.0	8.0–10.0 (3 h)	80 (10 min <sup>1/2</sup> )	555.5	[22]
Thxyn11A	<i>Thermobifida halotolerans</i> YIM 90462 <sup>T</sup>	70	9.0	8.0 (120 min); 9.0 (30 min)	70 (30 min)	470.7	[23]
Xylanase	<i>Actinomadura</i> sp. Cpt20	80	10.0	5.0–10.0 (24 h)	90 (2 h <sup>1/2</sup> ); 100 (1 h <sup>1/2</sup> )	–	[24]

Numbers preceding <sup>1/2</sup> represents the half-life time.

## 2 木聚糖酶的嗜热机制及分子改造

用于纸浆助漂白的木聚糖酶需要在高温和碱性条件下保持高活性和高稳定性,但很多野生型木聚糖酶不能同时具备这些特点。酶的催化活性、热稳定性及酶促反应的最适 pH 值等性质都由酶的结构决定。因此,可以通过蛋白质工程对酶分子改造,改变酶学性质,使其适合纸浆漂白的工业化应用。

目前,通过序列比较、晶体结构分析及突变研究,发现耐热木聚糖酶和非耐热木聚糖酶的结构非常相似,热稳定性可能仅由大量的微小修饰累计造成,这些修饰包括以下几个方面:

1) N 端序列影响木聚糖酶的热稳定性。一般认为,酶的变性先从 N 末端开始,因此,N 端的稳定直接影响酶分子的稳定性。Zhang 等用来自褐色高温单胞菌 *Thermomonospora fusca* 的嗜热木聚糖酶 TfxA 的 N 端 33 个氨基酸替换了来自橄榄绿链霉菌 *Streptomyces olivaceovirdis* 的中温木聚糖酶 SoxB。改造后的木聚糖酶 SoxB 的热稳定性大大提高。其中,集中在 N 端的 5 个氨基酸替代对 SoxB 的热稳定性提高起重要作用<sup>[25]</sup>。

2) 芳香族氨基酸的疏水作用。芳香族氨基酸的疏水作用可使木聚糖酶分子之间形成二聚体或多聚体,有利于提高酶的热稳定性。此外,芳香族氨基酸的疏水作用,也可提高分子内部的稳定性,从而提高酶的热稳定性。Georis 等将 *Streptomyces* sp. S38 的中温木聚糖酶 Xyll 的 11 位的 Thr 突变为 Tyr (T11Y),与第 16 位的 Tyr (Y11-Y16) 形成芳香族氨基酸相互作用,突变体的最适反应温度提高了 10 °C,在 57 °C 时的热稳定性是野生型的 6 倍。分析突变体的结构发现,Y11 和 Y16 分别位于 N-末端的  $\beta$  链 B1 和 B2 上,

二者之间的疏水作用增强了酶的氨基末端的稳定性,从而提高了酶的热稳定性<sup>[26]</sup>。杨浩萌等将来源于 *S. olivaceovirdis* A1 的木聚糖酶 XYNB 进行定点突变,在  $\beta$  链 B1 和 B2 之间也引入疏水作用,突变体的热稳定性获得提高,但是最适温度未发生改变<sup>[27]</sup>。以上突变结果表明,在酶分子的氨基末端引入芳香族氨基酸,增加 N 端的疏水作用,可以提高酶分子的热稳定性。

3) 离子键 (Ionic bond) 的影响。蛋白的酸性或碱性氨基酸侧链在生理环境下带负电荷或正电荷,当正负基团相互接近时,通过静电作用力形成离子键。离子键对木聚糖酶的热稳定性有一定的作用。将瘤胃真菌新美鞭菌目 *Neocallimastigales* 的 11 家族木聚糖酶 XynR8 进行定点突变 (I38V、D137N 和 G151E)。突变体的  $T_m$  提高了 8 °C,65 °C 保温 30 min 后的酶活性由无提高到 65%。对结构分析发现,I38V 和 D137N 的突变增强了疏水作用,而 G151E 则与 184 位的 Arg 形成了离子键,从而增强了  $\alpha$ -螺旋的稳定性,提高酶的热稳定性<sup>[28]</sup>。本课题组通过理性设计的方法,在来源于 *Bacillus* sp. SN5 的碱性木聚糖酶 Xyn11A-LC 中引入 3 个精氨酸,以期引入 3 个离子键,结果表明突变体的最适温度提高了 5 °C,  $T_m$  值提高了 11.6 °C,在 65 °C (pH 8.0) 时的半衰期从 22 min 提高到 68 min<sup>[29]</sup>。

4) 二硫键的作用。通过在酶分子中引入半胱氨酸增加二硫键的数量,可以增加某些酶的稳定性,且不影响酶的活性。Turunen 等将里氏木霉 *Trichoderma reesei* 的 11 家族木聚糖酶 II 进行定点突变 (S110C 和 D154C),以使  $\alpha$ -螺旋的 110 位和 154 位之间建立一个二硫键,突变体在 65 °C 时的半衰期从不到 1 min 增加到 14 min<sup>[30]</sup>。韩承

业等通过定点突变的方法,将 *T. reesei* 的木聚糖酶 XYNII 的 N 末端两个  $\beta$  折叠片层间引入二硫键,突变体的最适反应温度提高了 10 °C,在 70 °C 的半衰期由 1 min 提高到 14 min<sup>[31]</sup>。Wang 等将疏棉状嗜热丝胞菌 *Thermomyces lanuginosus* 的 11 家族木聚糖酶 TLX 进行定点突变 (Q1C 和 Q24C),在 N-末端引入二硫键。突变体的最适温度从 65 °C 提高了 75 °C,  $T_m$  从 66 °C 提高到 74 °C<sup>[32]</sup>。以上结果表明在 11 家族木聚糖酶的氨基末端或者  $\alpha$ -螺旋中引入二硫键都可以提高酶的热稳定性。

5) 表面精氨酸含量的增加。嗜热蛋白表面一般含有较高的精氨酸含量和较低的赖氨酸含量。其原因可能是:精氨酸的解离常数较大,对一些化学反应的敏感性较低,比赖氨酸更适应高温的环境;精氨酸较大的侧链基团与附近的极性基团形成氢键和/或离子键,有利于蛋白的稳定性。因此,将 Lys 突变为 Arg 可以提高蛋白的热稳定性<sup>[31]</sup>。然而,与氨基酸的组成相比,对蛋白质热稳定性更重要的是带电荷氨基酸的位置以及它们之间的相互作用。Turunen 等在 *T. reesei* 的木聚糖酶 II 表面增加了 Arg, 结果发现:将 5 个 Arg 引入到 Ser/Thr 表面中,提高了酶在较高温度下的活性及底物存在时的热稳定性;而在酶的其他表面引入 6 个 Arg 后,酶的热稳定性却没有改变<sup>[33]</sup>。

6) 脯氨酸和甘氨酸的突变。蛋白质可以通过减少去折叠态的熵值来增加其稳定性。在去折叠状态下,甘氨酸由于没有  $\beta$  碳原子,是具有最高构象熵值的氨基酸残基。而脯氨酸只能采取少有的几个构型且限制其前面氨基酸的构型,是具有最低熵值的氨基酸残基。因此,将甘氨酸突变

为其他氨基酸,或者将其他氨基酸突变成脯氨酸,通常可以减少非折叠态的熵值,从而提高蛋白质的稳定性。Wang 等将 *Streptomyces* sp. S9 的木聚糖酶 XynAS9 进行定点突变,发现突变体 V81P 的最适温度提高了 2 °C, 65 °C 时的半衰期从 16 min 提高到 27 min,表明该位点的脯氨酸对酶的热稳定性起一定作用<sup>[34]</sup>。

此外,对于多结构域的木聚糖酶来说,热稳定区 (Thermostabilising domain, TSD) 的存在对酶的热稳定性起重要作用。许多耐热木聚糖酶的氨基末端存在 TSD,将其删除后,酶的活性不变,但是热稳定性丧失。Zhao 等将耐热梭状芽胞杆菌 *Clostridium stercorarium* 木聚糖酶 Xyn10B 的 TSD 去除后,酶的最适温度从 75 °C 降低到 65 °C<sup>[35]</sup>。Jun 等将海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 的木聚糖酶 XynA 的 TSD 连接到 *T. reesei* 木聚糖酶 XynII 的氨基末端,嵌合体酶的最适温度提高了 10 °C,热稳定性也获得提高,60 °C 保温 10 min 后残余酶活性由 40% 提高到 85%<sup>[36]</sup>。

### 3 木聚糖酶的嗜碱机制及分子改造

研究酶的嗜碱机制一般利用同源蛋白的结构比较方法,即将碱性酶和同源的非碱性酶的氨基酸序列、二级结构和高级结构进行差异性比较,将结构上的差异和 pH 相关性联系起来。此外,利用定点突变和随机突变技术,对氨基酸突变后进行 pH 相关活性的分析,可为酶的嗜碱机制的阐述提供一些新的思路和线索。总之,综合运用多种方法,可以更全面系统研究酶的嗜碱机制。

#### 3.1 10 家族木聚糖酶的嗜碱机制研究

目前,从结构和 pH 相关活性的角度,通过比较碱性酶和非碱性酶的氨基酸序列组成、二级

结构元件及高级结构差异,获得了10家族碱性木聚糖酶嗜碱的结构基础<sup>[37-38]</sup>。

在分析碱性木聚糖酶的氨基酸组成时发现,带负电荷的氨基酸(Asp和Glu)数目增加,而导致高的负/正电荷比。碱性的10家族木聚糖酶中有3个长度大于10个氨基酸的富含酸性氨基酸的插入序列<sup>[38]</sup>。这可能是碱性酶快速适应碱性环境的一种策略,无需通过整个蛋白链上多个单位点调整,而是插入或者改变一小段氨基酸组成来实现其嗜碱的特性。

在对碱性木聚糖酶高级结构分析中发现,碱性木聚糖酶的分子表面带负电荷的氨基酸残基数目明显增多,而极性氨基酸(Asn、Gln、Ser和Thr)的数目减少<sup>[38]</sup>。研究发现,离子键有利于10家族木聚糖酶的嗜碱性<sup>[38]</sup>。增加分子内相互作用可以使酶的分子结构更紧凑,有利于蛋白的稳定性。但是,对于不同种类的酶,分子内相互作用对酶的嗜碱性影响不同。

酶的催化反应的最适pH由催化氨基酸的解离常数( $pK_a$ )决定<sup>[39]</sup>。在高pH时的催化反应,需要催化氨基酸保持较高的 $pK_a$ 值。这可以通过活性中心溶剂的屏蔽<sup>[40]</sup>、带电荷氨基酸的静电相互作用<sup>[41]</sup>及氢键网络来实现<sup>[42]</sup>。将*Bacillus* sp. S7的碱性木聚糖酶的催化氨基酸附近3个位点(Val169、Ile170和Asp171)突变为非碱性酶中相应位置的氨基酸(V169A、I170F和D171N),突变体的最适pH从9.0-9.5下降到7.0左右。推测Val和Ile的疏水作用以及Asp的负电荷的去除降低了催化氨基酸的 $pK_a$ 值,进而降低了酶催化反应的最适pH值<sup>[37]</sup>。

10家族木聚糖酶嗜碱结构基础的研究,尤其是影响酶的嗜碱性的氨基酸位点的发现,可为理性设计提高酶的嗜碱性改造提供一定的理论指导。

## 3.2 11家族木聚糖酶的嗜碱机制研究及分子改造

### 3.2.1 11家族木聚糖酶的嗜碱机制研究

目前为止,关于11家族木聚糖酶嗜碱机制尚缺乏系统的研究,唯一广泛认可的结论是:催化氨基酸Glu(酸/碱残基)附近的Asn/Asp可影响催化氨基酸的 $pK_a$ ,从而影响酶的最适pH<sup>[43]</sup>。分析高分辨率的结构发现,酸性酶中的Asp具有低的 $pK_a$ 值,且与催化氨基酸Glu形成氢键。该氢键的形成更倾向于去质子化的Glu,由此降低了催化氨基酸的 $pK_a$ 值。而在碱性酶中,Asn取代Asp,破坏了该氢键或提高了氢键距离,提高了催化氨基酸的 $pK_a$ 值,进而提高了最适pH<sup>[42]</sup>。目前,已有定点突变实验证实了这一理论<sup>[44]</sup>。

本课题组从进化角度,通过比较碱性11家族木聚糖酶和非碱性酶的结构特征,结合pH相关活性,初步获得11家族木聚糖酶嗜碱的结构基础。分析发现,碱性木聚糖酶可能通过增加带电荷的氨基酸含量,降低负电荷/正电荷比值,增加疏水氨基酸亮氨酸和异亮氨酸含量,降低极性氨基酸丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸含量,实现在较高pH条件下的催化特性;提高离子键的数量有利于11家族木聚糖酶的嗜碱性;通过结构比较、序列比对和突变实验验证,发现了5个可能对11家族木聚糖酶在碱性条件下发挥活性起重要作用的位点。这些发现将对理性设计提高11家族木聚糖酶的嗜碱性改造提供一定的理论指导。相关工作待发表。

### 3.2.2 提高11家族木聚糖酶的嗜碱性的分子改造

尽管嗜碱机制复杂,不同蛋白具有不同的嗜碱机制,但其他蛋白嗜碱机制的研究可为提高11家族木聚糖酶嗜碱性的改造提供一定的思路。Shirai等研究证实提高表面Arg含量可以提高蛋

白酶的嗜碱性<sup>[45]</sup>。该结论在 11 家族木聚糖酶中也得到了证实。Turunen 等在 *T. reesei* 木聚糖酶 II “Ser/Thr”表面引入 Arg, 突变体的最适 pH 向碱性方向偏移了 0.5–1.0 个单位<sup>[33]</sup>。Hirohito 等通过增加催化活性中心裂隙和“Ser/Thr”表面的 Arg 残基数目, 提高了 *Bacillus* sp. 41M-1 的木聚糖酶 XynJ 的嗜碱性<sup>[46]</sup>。Xu 等通过理性设计方法提高催化氨基酸的  $pK_a$  值, 在黑曲霉 *Aspergillus niger* 的木聚糖酶 XynB 中引入点突变 Q178R, 突变体的最适 pH 提高了 0.5 个单位<sup>[47]</sup>。以上突变表明, 催化裂隙及表面 Arg 可以提高木聚糖酶在碱性条件下的活性。

由于木聚糖酶嗜碱机制还不确定, 提高 11 家族木聚糖酶的嗜碱性的分子改造主要采用定向进化的方法。但由于嗜碱机制的复杂性, 许多改造难以提高酶的嗜碱性。来自嗜热网球菌 *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 的木聚糖酶 XynB6 的最适 pH 为 6.5, 为了能更好应用于纸浆漂白中, Gibbs 等用简并寡核苷酸基因改组 (Degenerate oligonucleotide gene shuffling, DOGS) 技术将 XynB6 和来自 *Bacillus* sp. 的碱性木聚糖酶 BadX 进行基因改组, 未获得在碱性条件下的活性提高的突变体。相反, XynB6 的片段替换了 BadX 的相应片段后, 降低了 BadX 在碱性条件下的活性<sup>[48]</sup>。Stephens 采用易错 PCR 方法, 对嗜热棉毛菌 *Thermomyces lanuginosus* 来源的木聚糖酶 XynA 进行随机突变, 突变体 G53 在 pH 10 时保留 93% 的酶活性, 而野生型在此条件下仅保留 30% 活性<sup>[49]</sup>。

## 4 总结与展望

嗜热碱木聚糖酶由于具有在高温和碱性条件下的高稳定性和高活性, 是改造传统造纸工

艺, 实现节能降耗、保护生态环境、提高经济效益及产品质量的一类重要酶制剂, 已成为造纸生物技术领域的研究热点。但由于成本及酶的性质等原因, 到目前为止, 国内还没有一种同时具备嗜热嗜碱这两种性质的木聚糖酶在造纸工业批量使用。

从高温和/或高碱环境中继续筛选性质优良的酶, 是获得嗜热嗜碱木聚糖酶的有效途径。随着微生物培养方法和文库筛选方法的进一步发展, 有望通过菌或宏基因组文库筛选到适合造纸工业应用的酶资源。另一方面, 随着结构生物学的发展, 结构和功能关系研究的进一步深入, 人们对酶的嗜热和嗜碱机制的认识越来越清楚, 可以采用理性设计的方法对酶分子进行更好的改造。随着这些工作的深入开展, 有望获得可批量应用于造纸工业中的嗜热碱木聚糖酶。

## REFERENCES

- [1] Berrin JG, Juge N. Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1139–1150.
- [2] Biely P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 286–290.
- [3] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(1): 3–23.
- [4] Bajpai P. Biological bleaching of chemical pulps. *Crit Rev Biotechnol*, 2004, 24(1): 1–58.
- [5] Bajpai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Progr*, 1999, 15(2): 147–157.
- [6] Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, et al. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7): 2311–2316.

- [7] Gessesse A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(9): 3533–3535.
- [8] Simkhada JR, Yoo HY, Choi YH, et al. An extremely alkaline novel xylanase from a newly isolated *Streptomyces* strain cultivated in corn cob medium. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(7): 2017–2027.
- [9] Simpson HD, Haufler UR, Daniel RM. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochem J*, 1991, 277(Pt 2): 413–417.
- [10] Sriyapai T, Somyoosap P, Matsui K, et al. Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5): 528–536.
- [11] Fawzi EM. Highly thermostable xylanase purified from *Rhizomucor miehei* NRL 3169. *Acta Biol Hung*, 2011, 62(1): 85–94.
- [12] Du Y, Shi P, Huang H, et al. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Hemicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresour Technol*, 2013, 130: 161–167.
- [13] Shi H, Zhang Y, Li X, et al. A novel highly thermostable xylanase stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$  from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 26–34.
- [14] Weerachavangkul C, Laothanachareon T, Boonyapakron K, et al. Alkaliphilic endoxylanase from lignocellulolytic microbial consortium metagenome for biobleaching of eucalyptus pulp. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(12): 1636–1643.
- [15] Verma D, Kawarabayasi Y, Miyazaki K, et al. Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e52459.
- [16] Kumar V, Satyanarayana T. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(11): 2279–2285.
- [17] Kohli U, Nigam P, Singh D, et al. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(7/8): 606–610.
- [18] Damiano VB, Ward R, Gomes E, et al. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 129(1/3): 289–302.
- [19] Mamo G, Delgado O, Martinez A, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding an endoxylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Mol Biotechnol*, 2006, 33(2): 149–159.
- [20] Kumar V, Syal P, Satyanarayana T. Highly thermo-halo-alkali-stable beta-1,4-endoxylanase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36(5): 555–565.
- [21] Kumar V, Satyanarayana T. Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. *Bioproc Biosyst Eng*, 2014, 37(6): 1043–1053.
- [22] Verma D, Satyanarayana T. Cloning, expression and applicability of thermo-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues. *Bioresour Technol*, 2012, 107: 333–338.
- [23] Zhang F, Chen JJ, Ren WZ, et al. Cloning, expression, and characterization of an alkaline thermostable GH11 xylanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462<sup>T</sup>. *J Ind Microbiol Biot*, 2012, 39(8): 1109–1116.
- [24] Taibi Z, Saoudi B, Boudelaa M, et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp.



- strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166(3): 663–679.
- [25] Zhang S, Zhang K, Chen X, et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(2): 200–206.
- [26] Georis J, de Lemos Esteves F, Lamotte-Brasseur J, et al. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Sci*, 2000, 9(3): 466–475.
- [27] Yang HM, Yao B, Luo HY, et al. Hydrophobic interaction between beta-sheet B1 and B2 in xylanase XYNB influencing the enzyme thermostability. *Chin J Biotech*, 2005, 21(3): 414–419 (in Chinese).  
杨浩萌, 姚斌, 罗会颖, 等. 木聚糖酶 XYNB 分子中折叠股 B1 和 B2 间的疏水作用对酶热稳定性的影响. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 414–419.
- [28] Xue H, Zhou J, You C, et al. Amino acid substitutions in the N-terminus, cord and alpha-helix domains improved the thermostability of a family 11 xylanase XynR8. *J Ind Microbiol Biot*, 2012, 39(9): 1279–1288.
- [29] Bai W, Zhou C, Xue Y, et al. Three-dimensional structure of an alkaline xylanase Xyn11A-LC from alkalophilic *Bacillus* sp. SN5 and improvement of its thermal performance by introducing arginines substitutions. *Biotechnol Lett*, DOI 10.1007/s10529-014-1512-7.
- [30] Turunen O, Etuaho K, Fenel F, et al. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the alpha-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J Biotechnol*, 2001, 88(1): 37–46.
- [31] Han CY, Yu SY, Ouyang J, et al. Enhancing stability of *Trichoderma reesei* xylanase (XYN II) by site-directed mutagenesis. *Chin J Biotech*, 2010, 26(5): 623–629 (in Chinese).  
韩承业, 余世袁, 欧阳嘉, 等. 定点突变提高里氏木霉木聚糖酶 (XYN II) 的稳定性. *生物工程学报*, 2010, 26(5): 623–629.
- [32] Wang Y, Fu Z, Huang H, et al. Improved thermal performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge. *Bioresour Technol*, 2012, 112: 275–279.
- [33] Turunen O, Vuorio M, Fenel F, et al. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng*, 2002, 15(2): 141–145.
- [34] Wang K, Luo H, Tian J, et al. Thermostability improvement of a *streptomyces* xylanase by introducing proline and glutamic acid residues. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(7): 2158–2165.
- [35] Zhao G, Ali E, Araki R, et al. Function of the family-9 and family-22 carbohydrate-binding modules in a modular beta-1,3-1,4-glucanase/xylanase derived from *Clostridium stercorarium* Xyn10B. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(8): 1562–1567.
- [36] Jun H, Bing Y, Keying Z, et al. Thermostable carbohydrate binding module increases the thermostability and substrate-binding capacity of *Trichoderma reesei* xylanase 2. *New Biotechnol*, 2009, 26(1/2): 53–59.
- [37] Mamo G, Thunnissen M, Hatti-Kaul R, et al. An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie*, 2009, 91(9): 1187–1196.
- [38] Manikandan K, Bhardwaj A, Gupta N, et al. Crystal structures of native and xylosaccharide - bound alkali thermostable xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27: structural insights into alkalophilicity and implications for adaptation to polyextreme conditions. *Protein Sci*, 2009, 15(8): 1951–1960.
- [39] Khawar S, Thomas T, ed. *Protein Adaptation in Extremophiles*. New York: Nova Science Publishers, 2007.
- [40] Shiraki K, Norioka S, Li SL, et al. Electrostatic role

- of aromatic ring stacking in the pH-sensitive modulation of a chymotrypsin-type serine protease, *Achromobacter* protease I. *Eur J Biochem*, 2002, 269(16): 4152–4158.
- [41] Russell AJ, Fersht AR. Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface-charge. *Nature*, 1987, 328(6130): 496–500.
- [42] Joshi MD, Sidhu G, Pot I, et al. Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase. *J Mol Biol*, 2000, 299(1): 255–279.
- [43] Torronen A, Rouvinen J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. *J Biotechnol*, 1997, 57(1/3): 137–149.
- [44] Liu XM, Qu YB, You F, et al. Studies on the key amino acid residues responsible for the alkali-tolerance of the xylanase by site-directed or random mutagenesis. *J Mol Catal B-Enzym*, 2002, 18(4/6): 307–313.
- [45] Shirai T, Suzuki A, Yamane T, et al. High-resolution crystal structure of M-protease: phylogeny aided analysis of the high-alkaline adaptation mechanism. *Protein Eng*, 1997, 10(6): 627–634.
- [46] Umemoto H, Ihsanawati, Inami M, et al. Improvement of alkaliphily of *Bacillus* alkaline xylanase by introducing amino acid substitutions both on catalytic cleft and protein surface. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4): 965–967.
- [47] Xu H, Zhang F, Shang H, et al. Alkalophilic adaptation of XynB endoxylanase from *Aspergillus niger* via rational design of pKa of catalytic residues. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115(6): 618–622.
- [48] Gibbs MD, Reeves RA, Choudhary PR, et al. Alteration of the pH optimum of a family 11 xylanase, XynB6 of *Dictyoglomus thermophilum*. *New Biotechnol*, 2010, 27(6): 803–809.
- [49] Stephens DE, Singh S, Permaul K. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 293(1): 42–47.

(本文责编 郝丽芳)