本文引用:高启禹,徐光翠,张少丹,等.高产木聚糖酶菌株选育研究进展[J].新乡医学院学报,2014,31(7):583-585.

【综述】

高产木聚糖酶菌株选育研究进展

高启禹[1], 徐光翠[2], 张少丹[1], 周晨妍[1]
(1.新乡医学院生命科学技术学院,河南 新乡 453003;2.新乡医学院公共卫生学院,河南 新乡 453003)

摘要: 木聚糖酶是木聚糖降解酶系中最关键的酶,主要以内切方式作用于木聚糖分子中的β-1,4-糖苷键。木聚糖酶主要由微生物产生,可表达于细菌、放线菌、真菌和酵母菌中,目前木聚糖酶在食品加工、纸浆漂白、饲料添加剂、工业乙醇的生产、生物转化等领域得到广泛应用,而不同来源木聚糖酶的性质存在较大差异,同时原料中木聚糖结构和加工工艺等因素均会影响木聚糖酶在工业中的应用效果。本文综述了木聚糖酶的作用机制、产木聚糖酶菌株的筛选培育及木聚糖酶基因的外源高效表达。

关键词: 木聚糖酶;高产菌株;诱变育种;基因工程
中图分类号: Q556 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)07-0583-03

木聚糖作为一种多聚五碳糖,是自然界中含量丰富的可再生生物能源[1],其基本骨架为β-1,4-糖苷键连接的木糖。木聚糖的完全降解需要木聚糖水解酶系中各种酶的协同作用,其中木聚糖酶是最关键的水解酶,可将木聚糖降解为寡聚木糖、木糖和少量其他单糖[2-3]。目前该酶已在啤酒酿造、乙醇生产等领域获得了广泛应用[4-5]。本文就木聚糖酶的作用机制及如何利用生物工程技术获得高表达木聚糖酶的转化菌株、如何进行高产菌的筛选及产酶条件优化等进行综述分析,以提高对木聚糖酶应用的进一步认识。

1 木聚糖酶的结构及作用机制

在分子水平上木聚糖酶通常由功能或非功能结构域和连接区组成,功能结构域又可分为催化结构域和纤维素结合结构域[6],但不同微生物产生的木聚糖酶在结构和性质上有很大差别。木聚糖酶所含区域可能仅有体现功能结构域的催化区,也可能除催化区以外,还具备其他多种体现非功能结构域的非催化区[7]。木聚糖酶的催化特性主要由催化区体现,因此,其理化特性和作用机制通常由功能结构域决定。Wong等[8]依据木聚糖酶的理化性质,将其分为分子量小于30 000的小分子木聚糖酶和大于30 000的大分子木聚糖酶,通常情况下分子量较小者是碱性蛋白,而较大者为酸性蛋白。Zheng等[9]分析证实了多数木聚糖酶作用的最适pH处于酸性范围,而最适温度为40~60 ℃。但随着生物工程技术不断发展,为适应酶的工业化应用,近年来木聚糖酶的最适反应条件已取得明显的改善。

木聚糖酶的作用特性可能是广义的酸碱催化机制,谷氨酸和天冬氨酸等酸性氨基酸残基起催化残基作用,它们与空间位置相近的其他极性氨基酸残基相互作用,维持2个催化残基的离子状态及产物中间体的稳定性,从而保持酶的催化活性[10]。木聚糖酶的催化通常有2种催化反应类型,即保持异头构型的两步置换反应机制及形成倒位异头构型的一步置换[11]。

2 木聚糖酶高酶活性菌株的分离筛选

木聚糖酶广泛存在于细菌、放线菌、真菌和酵母菌中,其中研究较多的产酶菌株有黑曲霉、链霉菌、芽孢杆菌及毕赤酵母等。研究发现真菌所产生的木聚糖酶的活性通常要高于细菌产生的木聚糖酶。目前在产木聚糖酶高酶活性菌株的筛选中,以曲霉[12-13]和链霉菌[14-15]产木聚糖酶的研究更为广泛。本课题组近年以宇佐美曲霉为产酶菌株,通过诱变育种及基因工程技术获得了产木聚糖酶的高酶活性菌株[16],通过研究发现其遗传稳定性及酶学性质稳定,易于工业化应用[17-18]。

野生型木聚糖酶菌种通常从自然环境中获得,但因其产酶特性和遗传稳定性较差,故菌种需进行初始的分离与筛选,从而得到独立健康的菌株。滕超等[19]从土壤中筛选到52种能产生木聚糖酶的放线菌,对其中产木聚糖酶活性较高且产酶稳定的

DOI:10.7683/xxyxyxb.2014.07.027
收稿日期:2014-03-10
基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(编号:112102210299);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14A180018)
作者简介:高启禹(1979-),男,甘肃会宁人,硕士,讲师,研究方向:酶与酶工程。
通信作者:周晨妍(1978-),女,河南焦作人,博士,副教授,研究方向:发酵工程。

F471 菌株通过液体发酵和 Box-Behnken 响应面法优化了其发酵条件。卢庆华等[20]从腐朽的树根下采用乙醇水解圈法筛出 1 株产木聚糖酶较高的菌种,同时对菌种做了初步鉴定,研究了其酶学性质并探讨了酶液在纸浆漂白中的应用。单志琼等[21]从我国青海盐碱湖边的土壤中采样筛选获得了 1 株分泌表达碱性木聚糖酶的短小芽孢杆菌,对该菌株产碱性木聚糖酶的基因克隆并在大肠杆菌中进行了表达,发现该酶有较好的热稳定性和碱稳定性。莫毅等[22]从长期堆放青贮饲料堆下土壤中取样,并通过木聚糖富集培养基和筛选培养基分级筛选出 1 株产木聚糖酶活性较高的菌株,对其进行了细菌形态学鉴定、16S rRNA PCR 扩增及 Oligo 6.44 软件分析,并对木聚糖酶 Xyn B 基因进行了扩增,从而为日后构建木聚糖酶基因酵母表达载体、培育能分泌表达具有高活性的木聚糖酶酵母工程奠定了基础。其次,Alves-Prado 等[23]在巴西塞拉多地区的土壤中分离到 1 株高产木聚糖酶菌株 *Lysinibacillus sp. strain* P5B;Menon 等[24]从印度海洋化工研究院实验盐农场的沉积物中筛选分离出 1 株产耐盐木聚糖酶的短小芽孢杆菌 GESF1;Manimaran 等[25]从印度尼西亚和不列颠群岛的空气中筛选到产木聚糖酶菌株 *Thermomyces lanuginosus* SSBP。

经过不同的筛选方法可获得产酶活性较高的自然菌株,但要真正获得高表达的木聚糖酶还需要对菌株的产酶条件进行优化,优化中应全面考虑最适反应温度、最适 pH、酶学特性及酶的热稳定性等,并通过正交试验或响应面法优化碳源、氮源、发酵时间、发酵温度、pH 等产酶条件。

3 木聚糖酶菌株的诱变育种

木聚糖既是很多微生物所利用的碳源,又是合成木聚糖酶的高效诱导剂,但其诱导水平因微生物不同而不同,同一菌种的不同菌株也存在很大差异。Singh 等[26]研究表明,嗜热真菌在相同的培养条件下,桦木木聚糖诱导产生的木聚糖酶为燕麦木聚糖诱导产酶量的 2 倍。除木聚糖外,有些小分子诱导物(如木二糖、乳糖、阿拉伯糖)也可诱导微生物产木聚糖酶,而葡萄糖、木糖对产酶微生物的作用具有两面性,同时半乳糖则阻遏绝大多数微生物产生木聚糖酶[27]。

木聚糖酶的诱导机制与木聚糖分子有关,因木聚糖是一种大分子聚合物,不能穿过细胞壁直接进入微生物细胞内,随着细胞的生长,先分泌出少量组成型木聚糖酶,把木聚糖降解成低聚木糖、木二糖和木糖,然后将这些降解产物结合到细胞表面,再进入细胞内,从而启动转录加强酶的合成[28]。为进一步提高微生物的产酶特性,微生物育种往往采用物理、化学或生物诱变剂对菌种进行单因素或多因素诱变处理,使菌种发生突变,再通过分离筛选得到目的菌株。而在目前的工业生产中往往采用诱导选育和诱变育种联合处理,先将获得的原始菌株进行突变诱变处理,再用含木聚糖的选择性培养基进行筛选,经反复分离筛选从而得到酶活性最佳的突变株。在诱变处理中采用的诱变剂主要有紫外线诱变、γ-射线和硫酸二乙酯联合诱变、微波诱变、离子束诱变及快中子与硫酸二乙酯复合诱变等。

4 高表达木聚糖酶转化菌株的基因工程技术

微生物是产木聚糖酶的重要来源,但因为自然酶在工业化应用中存在很多不足,所以如何通过一定的技术获得活性高、成本低且遗传稳定性好的转化菌株成为研究重点。目前,高表达木聚糖酶菌株的选育手段主要集中于利用基因工程和蛋白质工程技术对酶基因进行修饰、重组和表达,从而得到优良菌株,为工业化应用奠定基础。郑宏臣等[29]等利用克隆表达载体 pET.22b(+)与短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* G1-3 碱性木聚糖酶基因 XynG1-3 结合,在 *E. coli* BL21 中获得表达。对酶学性质进行分析表明,重组酶 XynG1-3d 的最适作用温度为 55 ℃,最适作用 pH 为 8.0,该酶在 60 ℃保温 1 h,残余酶活性保持为原来的 56%,pH 作用范围较广,在 pH 10.0 下保存 1 h,剩余酶活力仍能保持 75%。王艳君等[30]将来源于角毛壳菌中的编码木聚糖酶的基因导入毕赤酵母后获得重组载体,在毕赤酵母醇氧化酶 AOX 基因启动子作用下,重组蛋白得到高效表达。高金湖等[31]通过 PCR 技术将人溶酶体基因与木聚糖酶基因连接后于中间插入肠激酶识别位点序列,将其克隆至载体 pPIC9K 并构建重组表达质粒,经 Sac Ⅰ线性化后,电转化于毕赤酵母 GS115,通过 G418 抗性筛选得到高拷贝转化子。研究发现,表达的融合蛋白经肠激酶酶切后的目的溶酶菌酶和木聚糖酶活性均有较大提高。Sukhumsirichart 等[32]将含有 726 bp 的木聚糖酶基因 XynSW3 导入大肠杆菌克隆并表达,经镍亲和层析柱纯化后发现酶的 pH 应用范围获得明显改善(pH 0.6 ~ 10.3)。同时 Shi 等[33]将编码木聚糖酶的基因 Xyn10B 导入大肠杆菌克隆并表达后发现,重组木聚糖酶的反应最适温度达到了 80 ℃。

5 展望

近年来,随着对木聚糖酶研究的不断深入,在食

品、环境、造纸、饲料、能源等领域显示出巨大的潜在应用价值。因此,有必要利用现代基因工程技术有目的地选育、改良木聚糖酶,以满足实际生产的需要,将来可在从极端环境筛选优良的木聚糖酶产生菌、通过构建未培养微生物的宏基因组文库以获取优良木聚糖酶基因及对木聚糖酶进行定向固定化等方面做更进一步深入的研究,从而为木聚糖酶的工业化应用奠定更坚实的基础。

参考文献:

[1] 邱并生. 耐碱性木聚糖酶[J]. 微生物学通报,2013,40(5):904.

[2] Berrin J G,Juge N. Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans[J]. *Biotechnol Lett*,2008,30(7):1139-1150.

[3] Himmel M E,Ding S Y,Johnson D K,*et al*. Biomass recalcitrance:engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*,2007,315(5813):804-807.

[4] Qiu Z H,Shi P J,Luo H Y,*et al*. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476,and its potential application in brewing industry[J]. *Enzyme Microb Technol*,2010,46(6):506-512.

[5] Dhiman S S,Garg G,Sharma J,*et al*. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process[J]. *N Biotechnol*,2011,28(6):746-756.

[6] Xu G Y,Ong E,Gilkes N R,*et al*. Solution structure of a cellulose-binding domain from Cellulomonas fimi by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Biochemistry*,1993,34(2):6993-7009.

[7] 阮同琦,赵祥颖,刘建军. 木聚糖酶及其应用研究进展[J]. 山东食品发酵,2008(1):42-45.

[8] Wong K Y,Zhang G,Chen Z. A stratified approach for camera calibration using spheres[J]. *IEEE Trang Image Process*,2011,20(2):305-316.

[9] Zheng H,Liu Y,Sun M,*et al*. Improvement of alkali stability and thermostability of Paenibacillus campinasensis Family-11 xylanase by directed evolution and site-directed mutagenesis[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*,2014,41(1):153-162.

[10] 李勇,王敏,王淑彩,等. 木聚糖酶酶学特性及其催化功能的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2007,39(10):69-71.

[11] Debeire P,Priem B,Strecker G,*et al*. Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe,Clostridium thermolacticum. Aproposal for its action mechanism on larchwood 4-0-methylglucuronoxylan[J]. *Eur J Biochem*,1990,187(3):573-580.

[12] 石磊,郑毅,叶海梅,等. 米曲霉木聚糖酶生产菌的理性选育及发酵优化[J]. 生物技术,2007,17(6):12-16.

[13] Li J,Wang J,Wang S,*et al*. Achieving efficient protein expression in Trichoderma reesei by using strong constitutive promoters[J]. *Microb Cell Fact*,2012,11:84-93.

[14] Zhou J,Shi P,Zhang R,*et al*. Symbiotic Streptomyces sp. TN119 GH 11 xylanase:a new pH stable,protease and SDS resistant xylanase[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*,2011,38(4):523-530.

[15] Simkhada J R,Yoo H Y,Choi Y H,*et al*. An extremely alkaline novel xylanase from a newly isolated Streptomyces strain cultivated in corncob medium[J]. *Appl Biochem Biotechnol*,2012,168(7):2017-2027.

[16] 周晨妍,李东峰,邬敏辰,等. 木聚糖酶 Xyn Ⅱ的 D37N 突变、表达及酶学性质变化[J]. 生物加工过程,2008,6(3):62-67.

[17] 周晨妍,符丹丹,丰慧根,等. 酸性木聚糖酶 XynⅡ活性中心关键氨基酸残基的鉴定[J]. 生物技术,2010,20(2):17-20.

[18] 付冠华,李端,周晨妍. 黑曲霉 XZ-3S 木聚糖酶 Xyn ZF-1 基因克隆和序列分析[J]. 食品工业科技,2012,33(16):187-190.

[19] 滕超,纪烨,李秀婷. 产高活性木聚糖酶放线菌的筛选及其产酶条件的优化[J]. 食品工业科技,2012,33(21):172-177.

[20] 卢庆华,卢俊,蔡禄. 产木聚糖酶菌种的筛选及其在纸浆漂白中的应用[J]. 科学技术与工程,2013,15(5):1257-1261.

[21] 单志琼,周峻岗,周宇飞,等. 产碱性木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质[J]. 遗传,2012,34(3):356-365.

[22] 莫毅,梁方方,赖志强,等. 木聚糖酶产生菌的筛选鉴定及木聚糖酶基因(Xyn B)的克隆[J]. 中国饲料,2011(23):20-22.

[23] Alves-Prado H F,Pavezzi F C,Leite R S,*et al*. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado[J]. *Appl Biochem Biotechnol*,2010,161(1/8):333-346.

[24] Menon G,Mody K,Keshri J. *et al*. Isolation,purification,and characterization of haloalkaline xylanase from a marine Bacillus pumilus strain,GESF-1[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*,2010,15(6):998-1005.

[25] Manimaran A,Kumar K S,Permaul K,*et al*. Hyper production of cellulose-free xylanase by Thermo-myces lanuginosus SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2009,81(5):887-893.

[26] Singh S,Madlala A M,Prior B A. Thermomyces lanuginosus:properties of strains and their hemicellulases[J]. *FEMS Microbiol Rev*,2003,27(1):3-16.

[27] 江正强. 微生物木聚糖酶的生产及其在食品工业中应用的研究进展[J]. 中国食品学报,2005,5(1):25-27.

[28] 单宗星,韦策,李鑫,等. 介孔氧化钛与海藻酸钠固定化木聚糖酶的对比研究[J]. 林业化学与工业,2013,33(1):64-68.

[29] 郑宏臣,刘逸寒,刘晓光,等. 碱性木聚糖酶产生菌的筛选、XynG1-3 基因克隆表达及酶学性质研究[J]. 生物技术通报,2012(10):106-113.

[30] 王艳君,杨谦. 角毛壳茵木聚糖酶基因 xyn24 在毕赤酵母中的高效表达及产酶的固定化研究[J]. 食品发酵与工业,2012,38(8):29-35.

[31] 高金湖,唐存多,邬敏辰. 人溶菌酶-木聚糖酶融合基因在毕赤酵母中的表达[J]. 中国生物制品学杂志,2011,24(3):42-45.

[32] Sukhumsirichart W,Deesukon W,Kawakami T,*et al*. Expression and characterization of recombinant GH11 xylanase from thermotolerant streptomyces sp. SWU10[J]. *Appl Biochem Biotechnol*,2014,172(1):436-446.

[33] Shi H,Zhang Y,Zhong H,*et al*. Cloning,over-expression and characterization of a thermo-tolerant xylanase from Thermotoga thermarum[J]. *Biotechnol Lett*,2014,36(3):587-593.

(本文编辑:李胜利)