



专论与综述

木聚糖酶与 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白相互作用分子机制的研究进展

刘新育 谢夏 朱东东 陈红歌*

河南农业大学生命科学学院 农业部农业微生物酶工程重点实验室 河南 郑州 450002

摘 要: Xylanase inhibitor protein (XIP)型木聚糖酶抑制蛋白对大部分 GH10、GH11 家族的真菌木聚糖酶具有抑制作用,但是却不能抑制细菌来源和植物自身所产生的木聚糖酶。XIP 型木聚糖酶抑制蛋白对木聚糖酶的抑制作用主要是通过模拟底物接触酶的活性位点,迅速阻塞底物进入活性位点区域的通道。然而,在对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白具有抗性的 GH10 和 GH11 木聚糖酶晶体结构中,连接二级结构的 Loop 构象严重阻碍了 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的抑制功能。与对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白敏感的木聚糖酶相比,氨基酸残基的插入突变导致抗性木聚糖酶的 Loop 具有明显的凸出构象;而在 GH11 家族抗性木聚糖酶中,“拇指”结构中部分氨基酸的替换致使 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白与“拇指”结构无法形成稳固的氢键和疏水键,从而削弱 XIP 的抑制作用。

关键词: 木聚糖酶, XIP 型木聚糖酶抑制蛋白, 分子识别

Interaction between xylanase and XIP-type xylanase inhibitor protein: a review

LIU Xin-Yu XIE Xia ZHU Dong-Dong CHEN Hong-Ge*

Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture; College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China

Abstract: XIP-type xylanase inhibitor proteins have inhibitory effects on most fungal xylanases of the GH10 and GH11 families, but they cannot inhibit xylanase produced by plants and bacteria. The inhibitory effect of XIP-type xylanase inhibitor protein on xylanase is mainly through simulating substrate contacting the active site of the enzyme, and quickly blocking the channel of the substrate into the active site region. However, in the crystal structures of GH10 and GH11 xylanase that are resistant to XIP-type xylanase inhibitor proteins, the loop conformations linking secondary structures obviously hinder the inhibition of XIP-type xylanase inhibitor proteins. Compared with XIP-sensitive xylanase, the insertion mutation of amino acid residues results in a prominent conformation of the loop of resistant xylanase. In XIP-resistant GH11 xylanase, the substitution of some amino acids in the thumb structure prevents the XIP-type xylanase inhibitor protein from forming a stable hydrogen bond and hydrophobic structure with the thumb

Foundation items: National Nature Science Foundation of China-Henan Talent Training Joint Fund (U1404324); Key Science and Technology Program of Henan Province (142102310035)

*Corresponding author: Tel: 86-371-63555790; E-mail: honggeyz@163.com

Received: 19-01-2020; **Accepted:** 09-05-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金-河南人才培养联合基金项目(U1404324); 河南省科技攻关计划(142102310035)

*通信作者: Tel: 0371-63555790; E-mail: honggeyz@163.com

收稿日期: 2020-01-19; **接受日期:** 2020-05-09; **网络首发日期:** 2020-05-21

structure, thereby weakening the inhibitory effect of XIP.

Keywords: Xylanase, XIP-type xylanase inhibitor protein, Molecular recognition

1 木聚糖酶和木聚糖酶抑制蛋白

β -1,4-内切木聚糖酶(EC 3.2.1.8)在木聚糖的降解过程中具有重要作用,其可通过水解 β -1,4 糖苷键从而破坏木聚糖的主链。木聚糖酶作为饲料酶可以有效解除木聚糖引起的抗营养作用,用于淀粉-谷朊粉分离以提高淀粉的得率,因此木聚糖酶在饲料^[1]、食品加工^[2]和纸浆漂白^[3]等领域具有重要的作用。

小麦中共有 3 种类型的木聚糖酶抑制蛋白,分别为 *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI)^[4]、Xylanase inhibitor protein (XIP)^[5]、Thaumatococcus-like xylanase inhibitor (TLXI)^[6]。Croes 等^[7]利用免疫印迹的方法对 8 个欧洲小麦品种的木聚糖酶抑制蛋白进行测定,发现以 XIP 型的抑制蛋白含量最高,平均含量达到 235 $\mu\text{g/kg}$ 。因此在添加木聚糖酶的谷物加工领域中,抑制蛋白的广泛且大量存在对木聚糖酶的用酶效果产生了不利影响。鉴于此,研究 XIP 型抑制蛋白与木聚糖酶相互作用的分子机制,获得 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的抗性木聚糖酶将最大程度地发挥外加木聚糖酶的应用效果。

2 GH10 和 GH11 木聚糖酶的分子结构

不同来源木聚糖酶的氨基酸数目相差很大,但催化区域的大小比较一致。根据催化区域保守氨基酸序列和疏水簇的分析,木聚糖酶主要集中在糖苷水解酶 GH10 家族和 GH11 家族,同一家族的木聚糖酶催化区域具有较高的相似性^[8]。GH10 家族木聚糖酶是由 $(\alpha/\beta)_8$ 构成的桶状结构,形似“色拉碗”,底物结合缝隙位于桶状结构内部 β 折叠的 C 末端,催化中心是两个高度保守的 Glu (图 1)^[9]。GH10 家族木聚糖酶一般拥有 4-6 个底物结合亚位点,其中-2、-1、+1 亚位点高度保守并展现出与底物的高亲和力,导致 GH10 家族木聚糖酶能够催化木聚糖产生低聚合度的木寡糖(图 2)^[10]。

GH11 家族木聚糖酶由一个 α 螺旋与两个反向平行的 β 折叠片构成,形似“半握状的右手”,拥有一个简单的催化结构域,催化中心两个保守的 Glu 位于“手掌”状的凹面底物结合缝隙中,亚位点的数目一般为 5-6 个,并且水解反应发生在-1、+1 亚位点之间;位于底物结合缝隙上方的两个 β 折叠股之间的 Loop 被称作“拇指”(thumb)结构, GH11 家族木聚糖酶中“拇指”结构的长短各不相同,其通过疏水作用力和氢键保持自身的稳定,较高的灵活性可以使其自由移动来调整底物结合缝隙入口的宽度(图 3)^[11]。

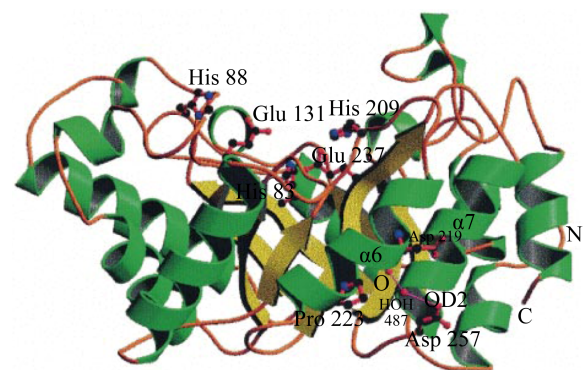


图 1 *T. aurantiacus* GH10 木聚糖酶的 3D 结构特征^[9]
Figure 1 3-dimensional structural characteristics of GH10 xylanase from *T. aurantiacus*^[9]

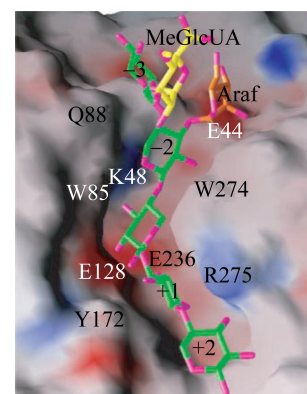


图 2 *Streptomyces olivaceoviridis* GH10 木聚糖酶结合木寡糖的立体模型^[10]

Figure 2 Stereo model of the bound xylooligosaccharides with GH10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis*^[10]

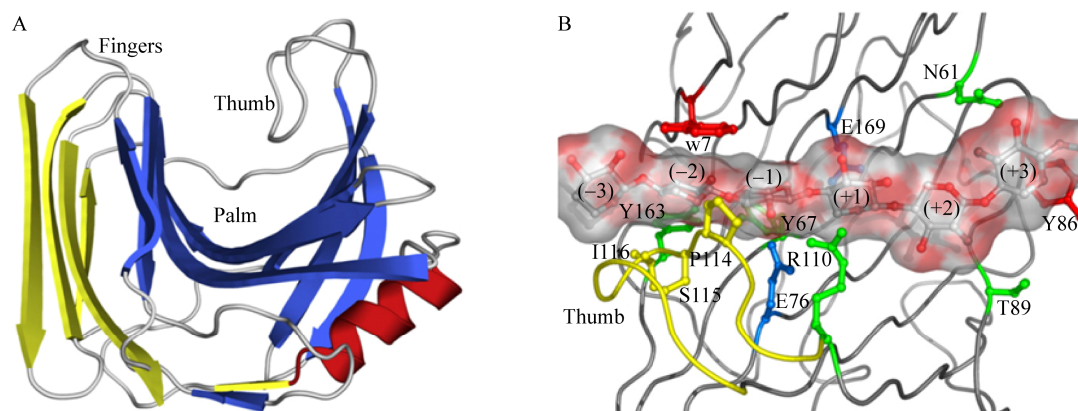


图 3 GH11 木聚糖酶的结构模式(A)及底物结合位点(B)^[11]

Figure 3 Structural patterns (A) and substrate binding site (B) of GH11 xylanase^[11]

3 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的分子结构

通过 X-ray 得知 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的三维结构是一个由 $(\beta/\alpha)_8$ 构成的椭圆骨架，其顶端的环沿着分子的一面形成一个凹陷；在 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的活性中心存在 3 个保守的芳香族氨基酸残基，分别是 Trp256_{XIP-I}、Tyr189_{XIP-I} 和 Phe11_{XIP-I}；XIP 型抑制蛋白通过底物模拟方式竞争性抑制木聚糖酶(图 4)^[12]。XIP 型的抑制蛋白能够同时抑制来自真菌大部分 GH10 和 GH11

木聚糖酶的活力，但对不同结构木聚糖酶的抑制常数 K_i 变化范围较大^[13-14]。

4 XIP 型抑制蛋白与 GH10 和 GH11 木聚糖酶的相互作用

目前，XIP 型木聚糖酶抑制蛋白对 GH10 家族真菌木聚糖酶的抑制机制尚不十分清楚。已经解析的 XIP-I 蛋白与 *Aspergillus nidulans* 木聚糖酶 XLNC 复合体的晶体结构显示(图 5A)，XIP-I 与 XLNC 活性位点的结合致使木聚糖酶的底物结合缝

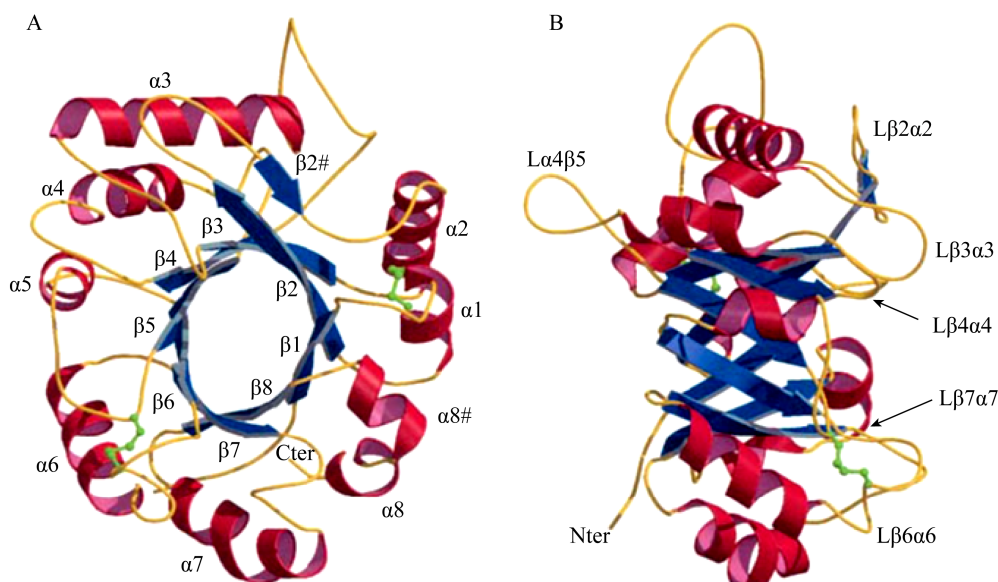


图 4 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的二级结构与三级结构^[12]

Figure 4 Secondary and tertiary structures of XIP inhibitor protein^[12]

注：A：XIP 型木聚糖酶抑制蛋白晶体结构示意图；B：将 A 图旋转 90° 的 XIP-I 分子。

Note: A: Crystal structure diagram of XIP inhibitor protein; B: Diagram A of XIP-I molecule is rotated about 90°.

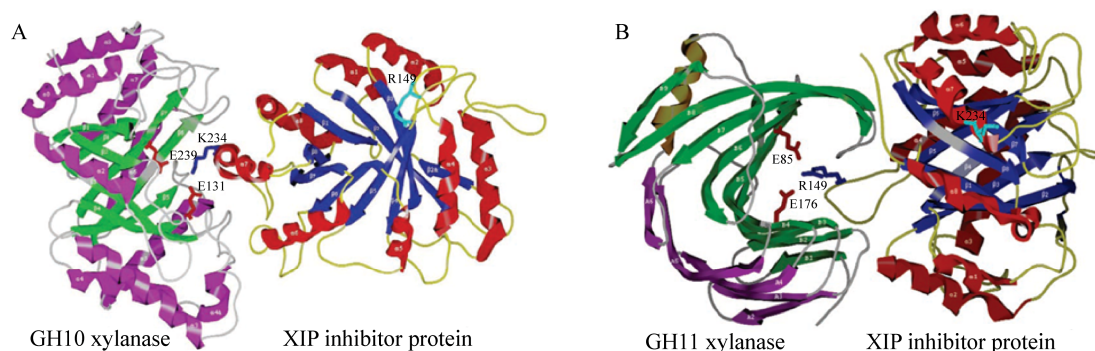


图 5 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白与 GH10、GH11 木聚糖酶的相互作用模式图^[15]

Figure 5 Interaction pattern of XIP-type xylanase inhibitor protein with GH10 and GH11 xylanase^[15]

注: A: XIP 型木聚糖酶抑制蛋白与 GH10 木聚糖酶; B: XIP 型木聚糖酶抑制蛋白与 GH11 木聚糖酶.

Note: A: XIP-type xylanase inhibitor protein and GH10 xylanase; B: XIP-type xylanase inhibitor protein and GH11 xylanase.

隙被完全覆盖, 底物分子无法正常进出酶的底物结合缝隙; 二者相互作用的面积达到了 $1\,130\text{ Å}^2$, 位于 XIP-I $\alpha 7$ (232–245) 肽段中的 Lys234_{XIP-I}、Asn235_{XIP-I}、His232_{XIP-I} 和 Tyr238_{XIP-I} 等 4 个氨基酸残基牢牢地占据了 XLNC 的 -1、+1、+2 和 -2 亚位点, 同时 Lys246_{XIP-I} 阻塞了底物接近 -3 亚位点的通道; 各亚位点区域关键的底物结合位点 Trp269_{XLNC}、His209_{XLNC}、Trp277_{XLNC}、Tyr174_{XLNC}、Arg278_{XLNC} 分别与 Tyr237_{XIP-I}、Tyr238_{XIP-I}、His232_{XIP-I}、Trp230_{XIP-I}、Tyr273_{XIP-I} 相结合, 从而阻碍底物分子的结合; Lys234_{XIP-I} 则直接与的酸碱催化残基 Glu131_{XLNC} 形成氢键相连, 同时通过与水分子形成的氢键间接地与起亲核攻击作用的 Glu239_{XLNC} 相连。酶的催化中心被 XIP-I 以氢键的形式牢牢结合, 彻底失去了水解糖苷键的机会^[15]。

XIP 型木聚糖酶抑制蛋白对 GH11 家族木聚糖酶的抑制机理比较清楚。*Penicillium funiculosum* 木聚糖酶 XYNC 和 XIP-I 抑制蛋白复合体的晶体结构显示(图 5B), XIP-I 蛋白的 $\alpha 4$ 与 $\beta 5$ 之间的 Π 型 Loop (148–154) 和木聚糖酶 XYNC 的活性中心、“拇指”结构、“手掌”结构区域同时作用, 占据了酶的活性位点并堵塞了底物进入活性位点区域的通道; 该 Loop 的顶端轻微地扭曲, 导致处于 150–152 位的 3 个氨基酸 Gly-Gly-Pro 在 Gly150_{XIP-I}

处转向平行延伸至 -3 亚位点, 阻碍底物接近, 同时 XIP 蛋白的 Gly150_{XIP-I} 的主链羰基和木聚糖酶 XYNC 上被预测为可以与木糖环结合的 Ser16_{XYNC} 相互作用; Arg149_{XIP-I}、Gly150_{XIP-I} 的主链片段则牢牢占据了 -2 亚位点, Arg149_{XIP-I} 的侧链从 Loop 的左侧边缘展露出来, 与高度保守的 Trp18_{XYNC} 形成疏水作用力, 模拟木糖环在 -2 亚位点堆叠; 同时, Arg149_{XIP-I} 的胍基进入 -1 亚位点, 与酸碱催化碱基 Glu176_{XYNC} 和 Tyr87_{XYNC} 以氢键的形式相结合, 阻止了降解产物的释放^[15-16]。此外, XIP-I 的 $\alpha 4\beta 5$ 、 $\alpha 5\beta 6$ 和 $\alpha 6\beta 7$ 之间的 Loop 与 XYNC 的“拇指”结构也有着紧密的结合^[15]。最近研究者通过分子动力学模拟揭示了水稻木聚糖酶抑制(rice xylanase inhibitor, RIXI)蛋白中一个长的 Loop 结构(144–153 位点)插入 GH11 木聚糖酶的催化裂隙中; 非变性 PAGE 检测到 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白与木聚糖酶相互作用后形成了复合物; 同时在活酵母细胞中也观察到了 RIXI 蛋白和木聚糖酶之间相互作用^[17]。

5 对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白具有抗性的木聚糖酶

研究表明, XIP 型木聚糖酶抑制蛋白对隶属于 GH10 家族的植物木聚糖酶以及细菌来源的 GH10 和 GH11 木聚糖酶并未展现出抑制性^[13], 因此上述

三类木聚糖酶均为 XIP 抗性木聚糖酶, 另外个别真菌来源的野生型木聚糖酶也对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白表现出明显的抗性^[18-21]。

5.1 细菌和真菌来源的 GH10 木聚糖酶

Pseudomonas fluorescens 木聚糖酶 Xyn10A 不受 XIP-I 抑制蛋白所抑制; 序列比对显示, 在与 XIP-I 相互作用区域, Xyn10A 与 XLNC 两个不同来源 GH10 木聚糖酶的氨基酸序列之间并无明显的区别, 然而木聚糖酶 Xyn10A 中连接 $\alpha 4$ 和 $\beta 4$ 的 Loop 以及连接 $\alpha 8$ 和 $\beta 8$ 的 Loop 上插入了更多的氨基酸, 从而导致 Loop 明显增长; 据推测, 这些长的 Loop 在空间上排斥 XIP-I 接近酶的底物结合缝隙; 这种较长 Loop 结构同样存在于唯一不受 XIP-I 所抑制的 *Aspergillus aculeatus* GH10 木聚糖酶中, 在其 $\beta 7$ 和 $\beta 8$ 后同样插入了较多的氨基酸^[13-14]。

在生物质降解过程中, GH10 家族木聚糖酶比 GH11 家族木聚糖酶具有更好的催化性能, 因此在酶的应用中更具有经济可行性^[22], 然而关于真菌 GH10 木聚糖酶 XIP 抗性改造的研究报道较少, 目前在 PubMed、ScienceDirect 和 Web of Science 数据库中只查到 2019 年的一篇文章, 该文献中 Denisenko 等^[23]将真菌来源的 2 种 XIP 敏感性木聚糖酶与 4 种 XIP 抗性木聚糖酶进行了序列比对及空间结构叠加, 确定了靠近抗性木聚糖酶活性位点的 Loop 环插入(含 GQGGA 肽段)可能是影响 XIP 抑制作用的关键因素; 他们进一步对来自于 *P. canescens* 的 XIP 敏感性 GH10 家族木聚糖酶 PcXylA 和 *T. reesei* 来源的 GH10 家族木聚糖酶 TrXyn3 进行了蛋白质工程改造, 在活性位点裂口的 Loop 环中插入 GQGGA 5 个氨基酸残基, 结果表明该 Loop 环的延长导致木聚糖酶对黑麦提取物中的蛋白质抑制剂产生了抗性。

5.2 真菌来源的 GH11 木聚糖酶

动物瘤胃厌氧真菌新丽鞭毛菌(*Neocallimastix patriciarum*)来源的 GH11 木聚糖酶 NpXyn11A 对 XIP-I 抑制蛋白具有天然的强烈抗性; 相比其他

GH11 木聚糖酶, NpXyn11A 的“拇指”结构区域(氨基酸序列为 TGPTINGGSE)顶端插入了 Gly154_{NpXyn11A}, 导致“拇指”结构比其他 GH11 家族木聚糖酶更加凸出, 并且 Gly154_{NpXyn11A} 的氨基和 α 碳原子与 Ala144_{XIP-I} 的羰基团相互排斥; 另一方面, NpXyn11A 中位于 $\beta 3$ 与 $\beta 4$ Loop 上的 Leu25-Asn31 均与 XIP-I 在空间上形成对抗; 此外, NpXyn11A 宽广的底物结合缝隙也减少了 XIP-I 的 Π 型 Loop 与酶结合位点相互作用的频率, 甚至无法接触结合位点(图 6)^[18]。我们将 *Neocallimastix* sp. GMLF1 的 XIP 抗性木聚糖酶 Xyn1B (GenBank 登录号: ACG68418.1)与 *A. niger* 的 XIP 敏感木聚糖酶 (UniProt ID: P55328)及 *P. funiculosus* 的 XIP 敏感木聚糖酶 XYNC (UniProt: Q9HFH0)进行序列比对, 发现 XIP 抗性木聚糖酶的“拇指”部位氨基酸发生了 GTS 到 GGSE 的突变^[24]。然而将抗性木聚糖酶 Xyn1B 的“拇指”结构¹⁶²GPTINGGSETF¹⁷²中的¹⁶⁷GGSE¹⁷⁰突变为 GTS, 甚至将 Xyn1B 的“拇指”序列完全由 *P. funiculosus* 木聚糖酶 XYNC 的“拇指”序列来替换, 得到的突变酶对 XIP 的抗性并没有发生变化; 依据 XIP-I 与抗性木聚糖酶 Xyn1B 以及 *P. funiculosus* 敏感性木聚糖酶 XYNC 相互作用的结构模型, 将 Xyn1B 的“手掌”结构区域中 $\beta 3$ - $\beta 4$ 环及 $\beta 4$ - $\beta 5$ 环同时突变为木聚糖酶 XYNC 的相应序

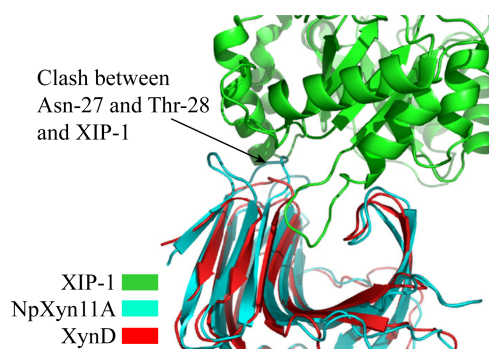


图 6 叠合有木聚糖酶 NpXyn11A 的 *P. funiculosus* GH11 木聚糖酶 XynD 与 XIP-I 的复合物结构^[18]

Figure 6 The complex structure of the XIP-I/*P. funiculosus* GH11 xylanase overlaid with xylanase NpXyn11A^[18]

列,以扩大酶的底物结合缝隙,然而所得突变酶的 XIP 抗性仍未受到影响;由此推测瘤胃真菌的抗性木聚糖酶 Xyn1B 可能具有独特的分子结构,其对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白保持抗性并不仅仅是某个氨基酸或某个多肽片段的影响^[25-26]。

植物病原真菌 *Fusarium graminearum* 来源的 GH11 木聚糖酶 XylA 和 XylB 经原核表达得到的重组酶,同样不能被 XIP-I 抑制^[19],然而 XIP-I 抑制能力损失与糖基化无关^[27]。通过与其他 GH11 家族木聚糖酶序列比对,发现 *Aspergillus niger* 木聚糖酶“拇指”结构中高度保守的 Gly 后面的 Thr 被木聚糖酶 XylA 中 Val151 所替代,而 Val151 及其侧链在空间上与 XIP-I 相斥,是木聚糖酶 XylA 获得抗性的原因;然而 Thr 侧链可以与 XIP-I 的 Asn147 形成氢键,从而使酶受到 XIP-I 的抑制;木聚糖酶 XylB 的“拇指”结构中两个特有的 Cys 存在导致 XylB 无法与 XIP-I 的 Gly179、Ala214、Asn147 之间形成氢键结合,从而产生抗性(图 7)^[28]。

相较于上述 XIP 抗性 GH11 木聚糖酶, *Penicillium griseofulvum* 木聚糖酶 PgXynA 的“拇指”结构区域(氨基酸序列为 NQPSIISDSS)在相同的位

置同样有一个额外的氨基酸 Asp130 的插入,并且高度保守的 Gly 被 Ser129 替换;Ser129、Asp130 组合突变酶的抗抑制性损失严重, K_i 值变成了 3.9×10^{-12} mol/L;模型分析显示, Ser129、Asp130 的侧链分别与 XIP-I 的 Lys145、Asn147 形成对抗(图 8)^[20]。在 *Penicillium griseofulvum* 来源的另一种木聚糖酶 PgXynB 中,将其“拇指”结构区域(氨基酸序列为 DQPSIDGPKK)插入的 Pro130 删除,同时将随后的两个 Lys 突变成 Ser,突变体酶失去了对 XIP-I 的抗性,抑制常数 K_i 变为 16.5×10^{-12} mol/L;根据 PgXynB 与 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白复合体的模型分析,木聚糖酶 PgXynB 的 Pro130 和 Lys131 分别与 XIP-I 的 Asn146、His147 和 Ile180 在空间上形成了对抗,并且木聚糖酶 PgXynB 的 Lys132 与 Asp128 之间形成的氢键使得“拇指”结构韧性更强,从而无法灵活地调节进入底物结合缝隙的开口大小,使其对 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白产生了抗性(图 9)^[21]。因此,“拇指”结构灵活性的降低在抗 XIP-I 的过程中起着至关重要的作用,而木聚糖酶 PgXynA、PgXynB 对 XIP 蛋白的抗性并不完全是由于“拇指”结构区域单个氨基酸的插入所导致。

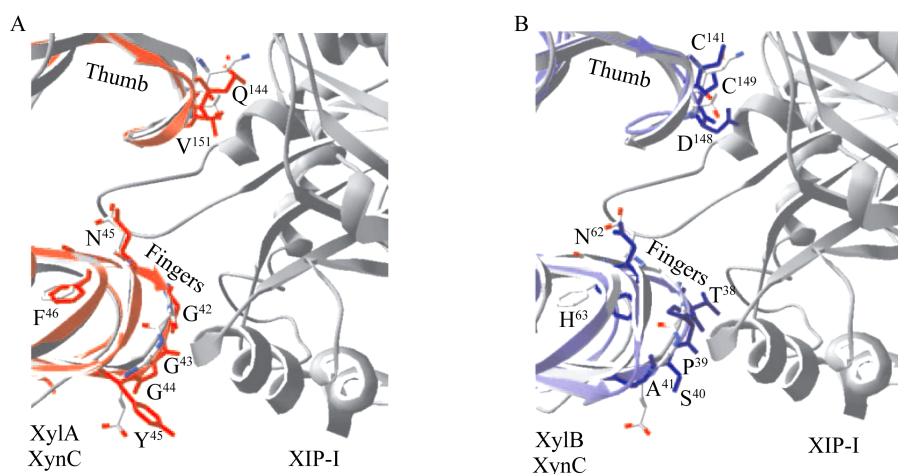


图 7 叠合有木聚糖酶 XynC 的 *F. graminearum* GH11 木聚糖酶 XylA 和 XylB 与 XIP-I 的复合物结构^[28]

Figure 7 The complex structure of the XIP-I/*F. graminearum* GH11 xylanases XylA and XylB overlaid with *P. funiculosum* XynC^[28]

注: A: 木聚糖酶 XylA 与 XIP-I 抑制蛋白; B: 木聚糖酶 XylB 与 XIP-I 抑制蛋白。

Note: A: Xylanase XylA and XIP-I inhibitor protein; B: Xylanase XylB and XIP-I inhibitor protein.

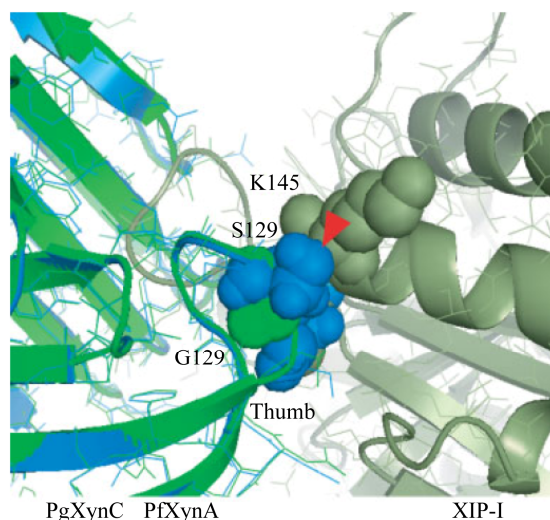


图8 木聚糖酶 PgXynA 和 XIP-I 抑制蛋白之间存在空间位阻的证据^[20]

Figure 8 Evidence of steric hindrance between xylanase PgXynA and XIP-I inhibitor protein^[20]

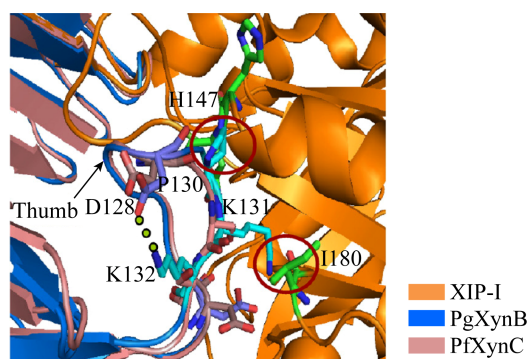


图9 木聚糖酶 PgXynB 和 XIP-I 抑制蛋白间可能冲突位点的结构模型^[21]

Figure 9 Structural model of the predicted clashes between xylanase PgXynB and XIP-I inhibitor protein^[21]

5.3 人工构建的 XIP 抗性 GH11 木聚糖酶突变体

XIP-I 对 *Aspergillus niger* 的 GH11 木聚糖酶具有强烈的抑制性, Tahir 等^[29]通过单点突变构建了部分突变体, 当第 117 位 Asn 突变成 Ala 后, 对 XIP-I 敏感的 *Aspergillus niger* 木聚糖酶获得了抗性; Asn117 位于 $\beta 8$ 的末端, 毗邻“拇指”结构, 并且高度保守; 结构复杂的 Asn 突变为简单的 Ala 后致使“拇指”结构滑动, 导致突变体酶的底物结合缝

隙变窄, 从而阻止了大分子量的 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白进入; 同时, “拇指”结构区域的一些氨基酸 Thr114、Thr116、Asn117、Thr124、Thr126 和 Thr128, 包括其侧链基团均与 XIP-I 形成空间上的对抗。

6 结论与展望

XIP-I 与木聚糖酶的相互作用过程十分迅速, 通过模拟底物接触方式竞争性地结合酶的活性位点, 阻止底物进出底物结合缝隙。细菌 GH10 木聚糖酶产生的 XIP 抗性, 可能是部分连接 α/β 之间的 Loop 结构较长, 因而造成连接各 α/β 的 Loop 长短不一, 从而在较远的距离就能与 XIP-I 接触, 导致 XIP-I 无法接近底物结合缝隙。

XIP 作用于 GH11 家族真菌木聚糖酶主要是 XIP 的 Π 型 Loop 堵塞了进入活性位点区域的通道。在大部分 XIP 抗性 GH11 木聚糖酶中, “拇指”结构区域有额外的氨基酸插入, 同时伴有保守氨基酸被替换, 导致“拇指”构象变化以及灵活性的降低, 不能调节进入底物结合缝隙入口的宽度。

外源木聚糖酶抑制蛋白对不同的微生物木聚糖酶有着复杂的识别特异性, 这种识别特异性是植物为防御来自不同病原菌的多种木聚糖酶侵害而不断进化的结果。XIP 型外源木聚糖酶抑制蛋白的存在贯穿整个植物的生命阶段, 在植物的生长过程以及防御致病真菌的入侵过程中起着重要的作用^[30], 同时通过过量表达实验还发现水稻 XIP 型木聚糖酶抑制剂 Oshi-XIP 参与了水稻对危害最为严重的常发性害虫二化螟的抗性^[31], 因此, 构建 XIP 过量表达的植株将有效提高其抗病抗虫能力。另一方面, 利用厌氧真菌 *Neocallimastix* sp. 产生的 XIP 天然抗性木聚糖酶用于麦芽汁糖化, 可以有效抵抗外加 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白的不利作用, 提高木聚糖酶的用酶效果^[19]。Frederix 等^[32]在谷朊粉-淀粉的分离过程中外加对 TAXI 及 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白同时具有抗性的两种木聚糖酶, 发现棘孢曲霉木聚糖酶 XAA 具有显著的改善效果, 外

加枯草杆菌木聚糖酶 XBS_{ni} 时也只需要较少的酶量即可提高分离效果。因此依据抑制蛋白与木聚糖酶的相互作用机制对商业常用真菌木聚糖酶进行蛋白质工程改造, 获得抑制蛋白抗性的高活性木聚糖酶突变体用于食品加工将有效提高用酶效果。

REFERENCES

- [1] He X, Yu B, He J, et al. Effects of xylanase on growth performance, nutrients digestibility and intestinal health in weaned piglets[J]. *Livestock Science*, 2020, 233: 103940
- [2] Adiguzel G, Faiz O, Sisecioglu M, et al. A novel endo- β -1, 4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 571-578
- [3] Campioni TS, de Jesus Moreira L, Moretto E, et al. Biobleaching of Kraft pulp using fungal xylanases produced from sugarcane straw and the subsequent decrease of chlorine consumption[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2019, 121: 22-27
- [4] Debyser W, Peumans WJ, van Damme EJM, et al. *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance[J]. *Journal of Cereal Science*, 1999, 30(1): 39-43
- [5] McLauchlan WR, Garcia-Conesa MT, Williamson G, et al. A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 338(2): 441-446
- [6] Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, et al. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 403(3): 583-591
- [7] Croes E, Gebruers K, Luyten N, et al. Immunoblot quantification of three classes of proteinaceous xylanase inhibitors in different wheat (*Triticum aestivum*) cultivars and milling fractions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(3): 1029-1035
- [8] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29 (1): 3-23
- [9] Natesh R, Bhanumoorthy P, Vithayathil PJ, et al. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 288(5): 999-1012
- [10] Fujimoto Z, Kaneko S, Kuno A, et al. Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(10): 9606-9614
- [11] Paës G, Berrin JG, Beaugrand J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(3): 564-592
- [12] Payan F, Flatman R, Porciero S, et al. Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson)[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 372(2): 399-405
- [13] Flatman R, McLauchlan WR, Juge N, et al. Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat[J]. *Biochemical Journal*, 2002, 365(3): 773-781
- [14] Goesaert H, Elliott G, Kroon PA, et al. Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2004, 1696(2): 193-202
- [15] Payan F, Leone P, Porciero S, et al. The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I: structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(34): 36029-36037
- [16] Sidhu G, Withers SG, Nguyen NT, et al. Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(17): 5346-5354
- [17] Liu MQ, Wu XQ, Huo WK, et al. Differential inhibition of GH family 11 endo-xylanase by rice xylanase inhibitor and verification by a modified yeast two-hybrid system[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 514-523
- [18] Vardakou M, Dumon C, Murray JW, et al. Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 375(5): 1293-1305
- [19] Beliën T, van Campenhout S, van Acker M, et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 327(2): 407-414
- [20] André-Leroux G, Berrin JG, Georis J, et al. Structure-based mutagenesis of *Penicillium griseofulvum* xylanase using computational design[J]. *Proteins*, 2008, 72(4): 1298-1307
- [21] Tison MC, André-Leroux G, Lafond M, et al. Molecular determinants of substrate and inhibitor specificities of the *Penicillium griseofulvum* family 11 xylanases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(3): 438-445
- [22] 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
- [23] Denisenko YA, Gusakov AV, Rozhkova AM, et al. Protein engineering of GH10 family xylanases for gaining a resistance to cereal proteinaceous inhibitors[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 17: 690-695
- [24] Liu XY. Properties of xylanase inhibitor protein from wheat and its influence on efficacy of exogenous xylanases[D].

- Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Henan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 刘新育. 小麦木聚糖酶抑制蛋白的性质及对外源木聚糖酶功效的影响研究[D]. 郑州: 河南农业大学博士学位论文, 2016
- [25] Zhu DD. Structure elements for inhibitor protein resistance of Xylanase Xyn1B and its application experiment[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 朱东东. 抗抑制性木聚糖酶 Xyn1B 抗性结构基础及抗性酶应用试验[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2018
- [26] Zhu DD, Liu XY, Xie X, et al. Characteristics of a XIP-resistant xylanase from *Neocallimastix* sp. GMLF1 and its advantage in barley malt saccharification[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(5): 2152-2160
- [27] Juge N, Payan F, Williamson G. XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004, 1696(2): 203-211
- [28] Beliën T, van Campenhout S, van Acker M, et al. Mutational analysis of endoxylanases XylA and XylB from the phytopathogen *Fusarium graminearum* reveals comprehensive insights into their inhibitor insensitivity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4602-4608
- [29] Tahir TA, Berrin JG, Flatman R, et al. Specific characterization of substrate and inhibitor binding sites of a glycosyl hydrolase family 11 xylanase from *Aspergillus niger*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(46): 44035-44043
- [30] Sun RJ, Xu Y, Hou CX, et al. Expression and characteristics of rice xylanase inhibitor OsXIP, a member of a new class of antifungal proteins[J]. Biologia Plantarum, 2018, 62(3): 569-578
- [31] Xin ZJ, Wang Q, Yu ZN, et al. Overexpression of a xylanase inhibitor gene, *OsHI-XIP*, enhances resistance in rice to herbivores[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(2): 465-475
- [32] Frederix SA, Courtin CM, Delcour JA. Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation[J]. Journal of Cereal Science, 2004, 40(1): 41-49