

专论与综述

微生物木聚糖降解酶研究进展及应用前景

怀文辉 何秀萍 郭文洁 张博润*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词:微生物,木聚糖酶,研究和应用

中图分类号:Q093 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2000)02-0137-03

木聚糖是植物半纤维素的主要成分,它是除纤维素外,自然界中最为丰富的多糖。木聚糖的基本结构单元是由 β -1.4或 β -1.3糖苷键连接的多聚木糖链,在D-木糖的第二位氧上连接有D-葡萄糖醛酸或4-O-甲基葡萄糖醛酸或在第三位氧上连接有L-阿拉伯呋喃糖。有些木聚糖还在第二或第三位氧上发生乙酰化。不同来源的木聚糖在结构上有一定差异。木聚糖酶是

一类木聚糖降解酶系(表1),对降解自然界大量存在的半纤维素起着重要作用。它们不但可以降解木聚糖生成木糖,而且能以农作物残渣中的半纤维素为原料生产经济价值较高的产品。由于木聚糖酶可以部分取代造纸工业中使用的漂白剂一二氧氯,可以减少环境污染,降低生产成本,已受到广泛关注^[1,2]。本文简要综述了微生物木聚糖降解酶的研究进展及应用前景。

表1 木聚糖降解酶系

| 木聚糖降解酶系 | 作用特点 |
|--|--------------|
| 1. 4- β -木聚糖内切酶(木聚糖酶) | 负责木聚糖主链骨架的降解 |
| 1. 4- β -D木糖苷酶 1.4- β -D甘露糖苷酶 | 负责寡聚糖的进一步降解 |
| 1. 4- β -D葡萄糖苷酶 α -L-阿拉伯糖苷酶 α -D-葡萄糖苷酸酶 α -D-半乳糖苷酶 酯酶 | 负责木聚糖支链的降解 |

1 木聚糖酶的特性

1.1 多样性 木聚糖酶水解木聚糖主链骨架的 β -1.4木糖苷键,其水解产物主要为寡聚木糖和木二糖,少量的木糖和阿拉伯糖。由于木聚糖结构的复杂性及木聚糖酶来源的广泛性,木聚糖酶具有多样性的特点。从对底物的特异性划分有非特异性木聚糖酶和特异性木聚糖酶。非特异性木聚糖酶能作用于多种底物,如纤维素、羧甲基纤维素、纤维寡糖、纤维二糖及海带多糖等^[3]。其它底物和木聚糖竞争酶的活性位点。它们一般有较大的分子量和偏酸的等电点。特异性木聚糖酶则以木聚糖为匹配底物发生作用。研究结果表明微生物中有两类木聚糖酶:低分子量木聚糖酶含182~234个氨基酸残基;高分子量的木聚糖酶含269~809个氨基酸残基。木聚糖酶的功能性划分是根据某些木聚糖酶能够将阿拉伯糖基从带有阿拉伯糖侧基的木聚

糖上释放出来,如从*A.niger*获得的两种酶,一种能降解阿拉伯糖侧基,另一种负责木三糖的水解,这两种酶协同作用,提高了木聚糖的降解效率。而另外一些木聚糖酶却没有这种协同作用。依据对木聚糖主链上降解位点的特异性,可将木聚糖酶分为木聚糖内切酶、木聚糖外切酶以及可同时从内部和多糖链一侧发生作用的木聚糖酶。对不同来源的木聚糖酶的研究已证实了木聚糖酶的多样性。

1.2 木聚糖酶的催化特性 不同来源的木聚糖酶催化特性也有差异,有不同的最适pH和最适作用温度,金属离子对不同来源的木聚糖酶活性的影响各不相同(表2)。在木聚糖酶的活性中心含有多个能与底物结

* 通讯联系人

收稿日期:1999-01-29,修回日期:1999-06-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

合的亚位点,这些位点的结构、大小、数量以及它们与催化基团的空间关系决定该酶对不同底物的亲和力、专一性、作用方式及酶反应的动力学参数^[7]。木聚三糖是能被木聚糖酶作用的最小底物。*T. harzianum*及*T. lignorum*木聚糖酶可以转糖基化的方式降解木四糖。*T. pseudokoningii*的一种木聚糖酶可从玉米枝叶细胞壁降解20%的木糖残基,而只从大豆枝叶细胞壁降解10%木糖残基,表明某些*Trichoderma*木聚糖酶对底物具有高度的选择性。曾宇成等对海枣曲霉木聚糖酶底物特异性的研究也表明木聚糖酶对不同底物的活性有很大差异^[8]。

表2 不同来源木聚糖酶催化特性的比较^[4-8]

| 菌株 | 最适温度 | 最适pH | 金属离子的影响 |
|-----------------------------|--------|---------|---|
| <i>Trichoderma</i> | 45~65℃ | 3.5~6.5 | 受Hg ²⁺ 抑制 |
| <i>Thermotoga</i> | 105℃ | 5.5 | |
| <i>B.stearothermophilus</i> | 57℃ | 7.0 | |
| <i>Aniger</i> | 55℃ | 4.2 | 受Hg ²⁺ 抑制,被Ca ²⁺ 激活 |
| <i>A.clavatus</i> | 50℃ | 4.8 | 受Co ²⁺ -Cu ²⁺ 抑制 |
| <i>A.phoenicis</i> | 45~50℃ | 4.0~5.0 | 受Ag ⁺ -Hg ²⁺ -Mn ²⁺ 抑制 |
| <i>S.thermoviolaceus</i> | 60~70℃ | 7.0 | 受Fe ²⁺ 抑制 |
| <i>B.sp.strainsAR-009</i> | 60~70℃ | 8.0~9.0 | 受Hg ²⁺ -Fe ²⁺ -Ph ²⁺ 等抑制 |

2 其它参与木聚糖降解的酶

2.1 β-木糖苷酶 该酶分子量一般很大,通常由两个或多个亚基组成。它的最适底物为木二糖。β-木糖苷酶通过从非还原末端水解出D-木糖的方式降解寡聚木糖和木二糖,它是从可溶性的木聚糖片段产生木糖单体的关键酶。

2.2 α-阿拉伯糖苷酶 该酶可以从阿拉伯糖基木聚糖及阿拉伯半乳聚糖的非还原端水解下α-L-阿拉伯呋喃糖基。

2.3 α-葡糖苷酸酶 该酶负责降解木糖和D-葡萄糖醛酸及其4-甲基化酯之间的α-1,2-糖苷键。不同来源的α-葡糖苷酸酶在分子大小和等电点方面有所差异。

2.4 酯酶 酰基化的木聚糖及其寡糖的完全降解还需要相应的酯酶。Biely等最早报道了酰基化木聚糖酯酶存在于真菌纤维素和半纤维素降解系统中。目前已在*T. reesei*、*A. niger*、*S. commun*、*A. pullula*、*S. olivochromogenes*等中发现对酰化木聚糖有极高特异性的酯酶,它们能使木聚糖脱酰基。酯酶的作用可以明显改变木聚糖的溶解性和降解速度,在缺乏酯酶的情况下,木聚糖酶难以接近高度酰化的木聚糖的主链骨架。

3 木聚糖酶基因克隆、表达及工程菌的构建

3.1 基因克隆和表达 随着对木聚糖酶研究的深入,近年来已开展了木聚糖酶基因的克隆和表达研究。目前已发现的木聚糖酶基因有 *xynA*、*xynB*、*xynC*、*xynZ* 等。研究较多的是 *xynA*,但主要局限于细菌中的 *xynA* 的克隆和表达,*xynA* 在大肠杆菌中表达但不分泌到胞外。Donald等首次将嗜热细菌的 *xynA* 克隆到酿酒酵母菌并进行了表达,分泌至培养液中的具有活性的木聚糖酶达10mg/L,他们还尝试将不同的强启动子引入表达载体以提高木聚糖酶的产量^[9]。Bergquist等对 *D. thermophilum* Rt46B.1及*Thermotoga* FJSS3.B.1的 *xynA* (D*xynA*和T*xynA*)进行了一系列研究,首先在大肠杆菌中克隆和表达,两者的 *xynA* 均为单一完整的开读框架,前者约为1.5Kb,编码蛋白为352个氨基酸,最适温度为85℃,最适pH为6.5;后者约为1.1kb,编码蛋白为346个氨基酸,有极高的热稳定性和高的pH范围^[10,11]。Tsujibo等从*S. Thermoviolaceus* OPC-520克隆到两个木聚糖酶基因STX-I和STX-II,并分析了其序列和开读框架,这两个基因分别编码476个氨基酸和335个氨基酸的蛋白质,分属于两个不同的木聚糖酶家族。它们的催化域与各大家族成员有高度的同源性^[12]。Dwivedi等从嗜热菌Rt8B.4中克隆了木聚糖酶基因 *xynA*,其中一个重组体含有6.7kb的插入片断,包括多个ORF,*xynA*在2599~4653bp之间,编码含有多个结构域的蛋白质,缩减分析及在大肠杆菌中表达表明羧基端结构域与木聚糖酶活性有关,该片断的表达产物为30kD,酶活性在pH为7.0、温度为70℃时至少稳定12h,具有一定的应用价值^[13]。

3.2 木聚糖酶高产工程菌的构建 Bergquist等将两种 *xynA* 亚克隆到乳酸克乳维酵母中构建工程菌,他们利用β-半乳糖苷酶基因LAC4表达框调节基因的高表达及乳酸克乳维酵母杀死毒素α-亚单位作为分泌信号,使木聚糖酶有效分泌至培养液中,而且没有明显的糖基化。D*xynA*表达产物占胞外蛋白的90%,摇瓶培养分泌出的木聚糖酶最高可达130μg/mL,是大肠杆菌表达体系的300倍^[14]。T*xynA*基因构建的重组体之一具有较高的稳定性和高的木聚糖酶活性,占胞外蛋白的95%,已被用于大规模生产木聚糖酶,其热稳定性与供体菌相同^[15]。研究表明微生物在产木聚糖酶的同时,常伴随有纤维素酶的形成,纤维素酶的污染对木聚糖酶制剂的工业应用

带来不利的影响。培养基质木聚糖中的纤维素会诱导菌株产生纤维素酶。Tremblay等将*B. subtilis*的木聚糖酶基因克隆到不产纤维素酶的*B. cereus* No518中,获得不产纤维素酶的木聚糖酶产生工程菌^[1]。

4 木聚糖酶的应用

4.1 造纸工业 制浆是造纸工业中的一道重要工艺。通过强碱性或强酸性处理可以除掉约90%的木质素。用1,4-β-木聚糖内切酶预处理木浆可以有效去除木质素,这样在减少化学漂白剂-二氧氯用量的同时能使纸浆达到同样的亮度和好的纸浆特性,并减少对环境的污染。将木聚糖酶应用于造纸工业的预漂白工艺中起于八十年代初,但工厂试验是1989年在芬兰开始的。木聚糖酶应用的商品化在1991年成为现实。

4.2 食品及饲料 木聚糖酶能够降解果汁、啤酒中的一些多糖类物质,因而有利于果汁、啤酒的澄清;可用于提取咖啡、植物油和淀粉;可以改善农作物青贮饲料及谷类饲料的营养成分。而木聚糖酶的另一个引人注目用途就是它可以水解木聚糖产生木糖、木二糖及寡聚木糖,后者能被进一步降解为木糖。木糖可用于生产一种重要的糖类替代品-木糖醇。

5 展望

由于木聚糖酶具有重要的应用价值,有不少研究者致力于木聚糖酶的开发研究,如高产菌株的选育、工程菌的构建、培养优化条件、耐高温、耐酸碱、无纤维素酶污染的木聚糖酶等。这些研究的成功将促进木聚糖酶在造纸、食品、饲料等产业的广泛应用,能有效控制制造

纸工业对环境的污染,因而具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Tremblay L, Archibald F. CAN J Microbiol, 1993, 39:853~860.
- [2] Ratto M, Mathrani I M, Ahring B *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41:130~133.
- [3] Biely P, Vrsanske M, Claeysens M. Eur. J Biochem, 1991, 200:157.
- [4] 蔡敬民,张洁,于宙等. 工业微生物, 1996, 26(2): 17~20.
- [5] Tsujibo H, Miyamoto K, Kuda T *et al.* Appl Environ Microbiol, 1992, 58(1):371~375.
- [6] Gessesse A. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(9): 3533~3535.
- [7] 江均平,严自正,张树政. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(3):287~291.
- [8] 曾宇成,张树政. 微生物学报, 1987, 27(4): 350~356.
- [9] Donald K A G, Carle A, Gibbs M D *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 42:309~312.
- [10] Gibbs M D, Reeves R A, Bergquist P L. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(12):4403~4408.
- [11] Saul D J, Williams L C, Reeves R A *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, 61(12):4110~4113.
- [12] Tsujibo H, Ohtsuki T, Iio T *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, 63(2):661~664.
- [13] Dwivedi P P, Gibbs M D, Saul D J *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 45:86~93.
- [14] Walsh D J, Bergquist P L. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(8):3297~3300.
- [15] Walsh D J, Gibbs M D, Bergquist P L. Extremophiles, 1998, 2:9~14.