

热解纤维素菌属 F32 中乙酰木聚糖酯酶 Axe7 的表征

韩文杰^{1,2} 苏航² Md Abu Saleh² 张培玉^{1*} 李福利² 吕明^{2*}

(1. 青岛大学环境科学与工程学院 山东 青岛 266071)

(2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东 青岛 266101)

摘要:【目的】从嗜热厌氧微生物热解纤维素菌属 F32 (*Caldicellulosiruptor* sp. F32) 菌株中鉴定出可水解木聚糖侧链乙酰基团的脂酶。【方法】通过基因组序列注释、比对以及蛋白结构预测的方法,发现一个潜在的脂酶 7 家族的(CE-7)乙酰木聚糖脂酶 Axe7。利用基因克隆、质粒构建以及在大肠杆菌中表达目标蛋白并纯化等实验方法,获得了该酶的重组蛋白。【结果】以 4-甲基乙酸伞形酯(4-Methylumbelliferyl-acetate)作为底物时,该酶的最适反应 pH 在 6.5–7.0 之间,最适反应温度为 85 °C,在最适的温度和 pH 条件下,Axe7 活性半衰期(Half-life)超过 4 h。在不同金属离子(1.5 mmol/L)存在下,Axe7 活性可保持为最适反应酶活的(66.3±4.6)%–(95.7±2.3)%之间,说明金属离子对其酶活有一定的影响。通过测定酶动力学发现 Axe7 的 K_m 和 k_{cat} 值分别为 0.39 mmol/L 和 66.95 s⁻¹。【结论】从高温厌氧微生物中发现并表征一个热稳定性良好的乙酰木聚糖脂酶,为木质纤维素的高温糖化和生物炼制提供了一个可工业化的潜在选择。

关键词: 乙酰基, 木聚糖, 脂酶, 热稳定性

Characterization of an acetyl xylan esterase Axe7 from *Caldicellulosiruptor* sp. F32

HAN Wen-Jie^{1,2} SU Hang² Md Abu Saleh² ZHANG Pei-Yu^{1*} LI Fu-Li² LU Ming^{2*}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

(2. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, CAS, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: [Objective] A thermostable acetyl xylan esterase (Axe) was identified from a thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor* sp. F32. [Methods] Based on genome annotation, protein blast, and protein structural prediction, a family-7 carbohydrate esterase (Axe7) was found. After gene cloning, plasmid construction, protein expression and purification in *Escherichia coli*, the recombinant protein

Foundation item: Outstanding Youth Foundation of Natural Science of Shandong Province (No. JQ201507); National Natural Science Foundation of China (No. 31400060); Science and Technology Major Project of Shandong Province (No. 2015ZDXX0403A01)

*Corresponding authors: ZHANG Pei-Yu: Tel: 86-532-83780155; E-mail: envbio@163.com
LU Ming: Tel: 86-532-80662656; E-mail: lvming@qibebt.ac.cn

Received: July 15, 2016; Accepted: October 19, 2016; Published online (www.cnki.net): November 03, 2016

基金项目: 山东省自然科学基金杰出青年基金项目(No. JQ201507); 国家自然科学基金项目(No. 31400060); 山东省科技重大专项(新兴产业)(No. 2015ZDXX0403A01)

*通讯作者: 张培玉: Tel: 86-532-83780155; E-mail: envbio@163.com

吕明: Tel: 86-532-80662656; E-mail: lvming@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2016-07-15; 接受日期: 2016-10-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-03

Axe7 was produced. [Results] On the substrate of 4-Methylumbelliferyl-acetate (4-MUA), the optimal pH of Axe7 was between 6.5 and 7.0, the optimal temperature was 85 °C, and the half-life of Axe7 under the optimal condition was more than 4 hours. By incubation with 1.5 mmol/L different metal ions, the retained activities of Axe7 were between (66.3±4.6)% and (95.7±2.3)%, suggesting the effect of metal ions on enzyme activity. The results of enzyme kinetics showed that the K_m of Axe7 was 0.39 mmol/L and k_{cat} was 66.95 s⁻¹. [Conclusion] Our findings provide a potential enzyme for the biorefinery industry.

Keywords: Acetyl, Xylan, Esterase, Thermostability

农林业废弃物木质纤维素主要由纤维素、半纤维素、木质素三种高分子化合物组成。半纤维素是除纤维素以外含量最丰富的碳水化合物。在组成成分上,半纤维素主要是由半乳糖、葡萄糖、果糖、葡萄糖醛酸、木糖、阿拉伯糖等几种单糖构成。这些单糖以不同的组合形式构成了不同类型的结构(如木聚糖、木葡聚糖、葡糖醛酸木聚糖、阿拉伯糖基木聚糖、葡糖醛酸阿拉伯糖基木聚糖等),从而导致了植物结构的多样性(如硬木、软木、牧草等)。木聚糖作为大部分半纤维素的主干部分(Backbone),是含量最丰富的一种,木聚糖的结构强度较低,易在稀酸、稀碱等环境下水解,但由于木聚糖侧链上含有不同基团的取代基,如阿拉伯糖、O-乙酰基、阿魏酸和 4-O-甲基葡萄糖醛酸等^[1],对其完全降解需要多种酶的协同作用。目前,已报道的可降解半纤维素酶制剂主要有木聚糖酶、 β -1,4-木糖苷酶、乙酰木聚糖酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶和阿魏酸酯酶等^[2]。

乙酰木聚糖酯酶(Acetyl xylan esterase, Axe, EC3.1.1.6)能够水解乙酰化木聚糖中木糖残基 C-2 和 C-3 位的 O-乙酰修饰基团^[3]。硬木、谷物等植物中的木聚糖乙酰化程度较高,通常能达到总木聚糖的 15%–25%^[4],而在软木中较为少见。对于乙酰化程度较高的木聚糖底物,由于空间位阻效应,木聚糖酶的催化区域难以接近底物^[5]。当添加乙酰木聚糖酯酶时,木聚糖或木寡糖上的乙酰基团可先被乙酰木聚糖酯酶水解,使木聚糖酶能够接近暴露的木聚糖或木寡糖,从而导致底物降解的速率明显提高^[6]。因此,大多数乙酰木聚糖酯酶可与木聚糖酶进行协同作用,促进乙酰基木聚糖的水解^[7]。在工业上,乙酰木聚糖酯酶对造纸业的生物漂白、饲料

业的原料预处理、生物能源工业的生物质降解等方面有重要作用和广泛用途,因此不同来源的乙酰木聚糖酯酶逐渐被发现和表征。

酶制剂的工业化应用通常需要酶本身具有较好的稳定性(热稳定性和对化学试剂的稳定性),常温微生物来源的酶制剂往往热稳定性较差,因而工业化的潜力有限。本课题组在 2013 年首次报道了一株在高温生物堆肥中分离出的具有嗜高温厌氧特性的热解纤维素菌属细菌 *Caldicellulosiruptor* sp. F32, 该细菌在 75–80 °C 下有较强的降解未经预处理的小麦、玉米等秸秆的能力^[8]。通过对其基因组序列分析,发现有 4 个 CE-4 家族、1 个 CE-7 家族、1 个 CE-9 家族和 1 个 CE-12 家族的脂酶。根据 CAZy 网站(www.cazy.org)的功能性预测,CE-9 家族和 CE-12 家族主要是以 *N*-乙酰基葡萄糖胺-6 磷酸盐和鼠李半乳糖醛酸聚糖为底物的脱乙酰脂酶,CE-4 家族的作用底物通常以乙酰化壳聚糖为主。然而 CE-7 家族作用于乙酰化木聚糖,且对乙酰基存在位置没有特殊要求,工业化应用前景较广,因此在本研究课题中选择 CE-7 家族的乙酰木聚糖酯酶(Axe7)作为研究对象。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、载体、试剂、培养基及主要仪器

热解纤维素菌属 F32 菌株由中国科学院青岛生物能源与过程研究所从生物堆肥中分离所得。大肠杆菌 Trans1-T1 和 BL21(DE3)、表达载体 pEASY-blunt-E2、DNA 聚合酶 2×EASYPfu SuperMix 等试剂材料均购于北京全式金生物技术有限公司。4-甲基乙酸伞形酯(4-Methylumbelliferyl-acetate, 4-MUA)购于 Alfa Aesar 公司;PCR 引物合成与测序由青岛擎科梓熙生物技术有限公司完成。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0, 定容至 1 L, 然后 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

主要仪器: Mastercycler 梯度 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; Bio-Rad 凝胶电泳仪及凝胶成像系统, 美国伯乐公司; 台式离心机 1-14, 德国 Sigma 公司; Ultrospec 2100 *pro* 分光光度仪, 美国通用电器公司; 生化培养箱 ZSD-1160, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 目标基因的生物信息学分析

利用 RAST (Rapid annotation using subsystem technology) 系统(<http://rast.nmpdr.org/>)对热解纤维素菌属 F32 的基因组序列进行注释分析^[9], 而氨基酸序列同源进化树则采用 MEGA 5.0 软件进行分析^[10]。蛋白质结构预测则采用 I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)在线系统进行预测^[11]。

1.3 表达载体的构建及转化子的表型鉴定

根据热解纤维素菌属 F32 基因组中 Axe7 的序列合成表 1 中引物。

以热解纤维素菌属 F32 基因组为模板 PCR 扩增目的基因, 50 μ L PCR 扩增体系为: 1 μ L 15 ng/ μ L 基因组 DNA, 25 μ L 2 \times EASY*Pfu* SuperMix, 1 μ L 10 μ mol/L 正、反引物及 22 μ L 灭菌超纯水。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物与载体 pEASY-blunt-E2 连接, 连接产物直接转化到大肠杆菌 Trans1-T1 进行质粒扩增。通过质粒的 DNA 测序确认构建正确的质粒, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)进行原核表达。

1.4 乙酰木聚糖酯酶 Axe7 的重组表达及提纯

挑取阳性克隆接种至含 100 mg/L Amp 的 LB 培养基, 培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8。加入 IPTG (终

浓度 0.3 mmol/L)后, 诱导表达 5–6 h, 离心收集菌体。诱导后的产物经过超声破碎和离心处理, 得到含有目标蛋白的上清溶液。经过 0.45 μ m 滤膜过滤后, 利用镍离子亲和吸附层析柱(Ni-NTA)进行纯化, 纯化后的蛋白经过 SDS-PAGE 以检验目标蛋白的纯度与分子量。

1.5 乙酰木聚糖酯酶活性测定

乙酰木聚糖酯酶活性测定参照 Shao 等的方法^[12], 并稍作修改, 以 4-甲基乙酸伞形酯(4-MUA)为底物测定酶活力。以每分钟水解底物释放产生 1 μ mol 4-甲基伞形酮(4-Methylumbelliferyl, 4-MU)的乙酰酯酶量为 1 个酶活力单位。测定方法: 在 800 μ L 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)加入 95 μ L 超纯水和 100 μ L 10 mmol/L 4-甲基乙酸伞形酯(溶于 DMSO), 放入分光光度计, 在特定温度下的金属浴中预热 5 min, 加入 5 μ L 酶液并迅速混匀, 在 354 nm 光波长下连续测其开始反应 30 s 内的吸收值。

1.6 乙酰木聚糖酯酶酶学性质

1.6.1 最适 pH 与最适温度: 70 $^{\circ}$ C 条件下, 分别以磷酸缓冲液和 Tris 盐酸缓冲液测定 Axe7 在不同 pH 条件下对底物 4-甲基乙酸伞形酯的酶活, 分析 Axe7 的最适 pH。然后在最适 pH 条件下, 分别测定 60–100 $^{\circ}$ C 时乙酰木聚糖酯酶对底物 4-甲基乙酸伞形酯的酶活, 分析 Axe7 的最适温度。

1.6.2 热稳定性分析: 以 4-甲基乙酸伞形酯(4-MUA)作为底物, 在最适 pH 条件下的磷酸缓冲液中, 利用不同温度对 Axe7 进行温育, 测定不同温育时长 Axe7 的残余酶活。

1.6.3 K_m 和 k_{cat} 等催化常数和酶动力学曲线: Axe7 的米氏常数 K_m 值和催化常数 k_{cat} 值的测定采用 GraphPad Prism 软件计算。在最适条件下用等量的酯酶与不同浓度的底物反应 20 s 内生成的产物量计算出 K_m 与 V_{max} , 当底物浓度远大于酶浓度 ($[E]$)后, 根据公式 $k_{cat} = V_{max}/[E]$, 计算得出 k_{cat} 值。

1.7 催化位点的鉴定、突变体的制备实验

利用 I-TASSER 在线分析软件同源蛋白序列比对, 找到 Axe7 中的催化活性位点。利用点突变技术设计引物(表 2), 将目标氨基酸(第 183 位的

表 1 本文所用的引物
Table 1 Primers for Axe7

Primers	Sequences (5'→3')
P1 (Axe7)	ATGGTATTTGATAATGCCGCTTG
P2 (Axe7)	TCATTCTAACATCTCCATAAGATAC

表 2 点突变所用的引物
Table 2 Primers for point mutation

Primers	Sequences (5'→3')
P1 (S183A)	GCCGCAATGGGATTTGCACAAGGTGGTGGCTTG
P2 (S183A)	CAAGCCACCACCTTGTGCAAATCCCATTGCGGC
P1 (E227A)	CAAAGGATGCGTATGAAGCAATTAGAACATATTTTCAG
P2 (E227A)	CTGAAATATGTTCTAATTGCTTCATACGCATCCTTTG
P1 (H302A)	TATCCTGACTTTGGAGCTGAACAGATTTTCTACTT
P2 (H302A)	AAGTAGAAAATCTGTTTCAGCTCCAAAGTCAGGATA

丝氨酸、第 227 位的谷氨酸和第 302 位的组氨酸) 分别替换为丙氨酸, 并测定相关活性。

2 结果与分析

2.1 Axe7 的基本信息和结构同源建模分析

根据 CAZy 数据库(www.cazy.org)统计, 截止目前共有 671 个 CE-7 家族脂酶的基因被发现, 其中 666 个归类于细菌中, 另有 5 个来自未被培养的微生物。针对 Axe7 进行氨基酸序列分析发现: 理论分子量为 36.58 kD, pI 为 5.03。利用基因组注释系统 RAST 筛选发现, Axe7 与其它已注释基因(例如梭状芽胞杆菌属的 *Clostridium cellulolytic* 和芽孢杆菌属的 *Bacillus halodurans*) 存在于不同的基因簇中(图 1A)。采用 GenBank 上 BLAST 程序进行搜索发现, Axe7 与同属菌株的氨基酸同源相似性也不超过 89%, 而与其它种属来源 CE7 的相似性则普遍低于 64% (数据未显示)。此外, 运用 MEGA 5.0 软件进行蛋白多序列比对与一致性分析并构建系统进化树发现, Axe7 与其它已被表征的乙酰木聚糖脂酶聚类于不同的分支(图 1B), 因此揭示该酶可能具有独特的生物学和酶学意义。

以同源建模系统 I-TASSER Serve 对 Axe7 进行同源建模(图 1C), 发现其与来自嗜热厌氧菌属 JW/SL YS485 (*Thermoanaerobacterium* sp. JW/SL YS485) 的乙酰木聚糖酯酶序列相似性高达 62.34%, 因此, 以其晶体结构(PDB ID 号 3FCY)

为主要模板同源建模。如图 1C 所示, 该模型显示其结构带有 12 个 α -螺旋环绕于 9 个 β -折叠组成。

2.2 Axe7 的质粒制备和蛋白表达纯化

Axe7 基因以热解纤维素菌 F32 基因组为模板, 通过设计引物(表 1)进行目标基因扩增(图 2A)。随后, 将目标基因连接到表达载体 pEAZY-blunt-E2 上, 得到重组质粒 pEAZY-Axe7。将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 并利用镍柱进行纯化得到与预测蛋白分子量一致的目标蛋白(图 2B)。

2.3 Axe7 的酶学性质研究

首先, 对获得的 Axe7 蛋白进行最适 pH 和最适温度的测定。在 70 °C 下, 该酶的最适 pH 在 6.5–7.0 之间, 而当 pH 小于 6.0 或者大于 7.5 时, Axe7 的活性低于最高酶活(81.0±1.7 U/mg)的 40% (图 3A)。随后, 在最适 pH 7.0 的条件下测定 Axe7 的最适温度。结果显示, 该酶的最适温度为 85 °C (图 3B)。60 °C 时, Axe7 的酶活依然为最适温度下的 45%以上。

该酶的热稳定性实验结果如图 3C 所示, Axe7 在最适温度 85 °C 下的酶活半衰期(Half-life)大于 4 h, 而温度在 75 °C 时, 其酶活半衰期则超过 70 h, 因此说明 Axe7 是高温下相当稳定的脂酶。此外, 通过实验测定了该酶的酶动力学参数(图 3D), 以 4-甲基乙酸伞形酯为反应底物时, Axe7 的 K_m 和 k_{cat} 值分别为 0.39 mmol/L 和 66.95 s⁻¹。通过比较来自不同细菌的同属 CE7 家族的酯酶,

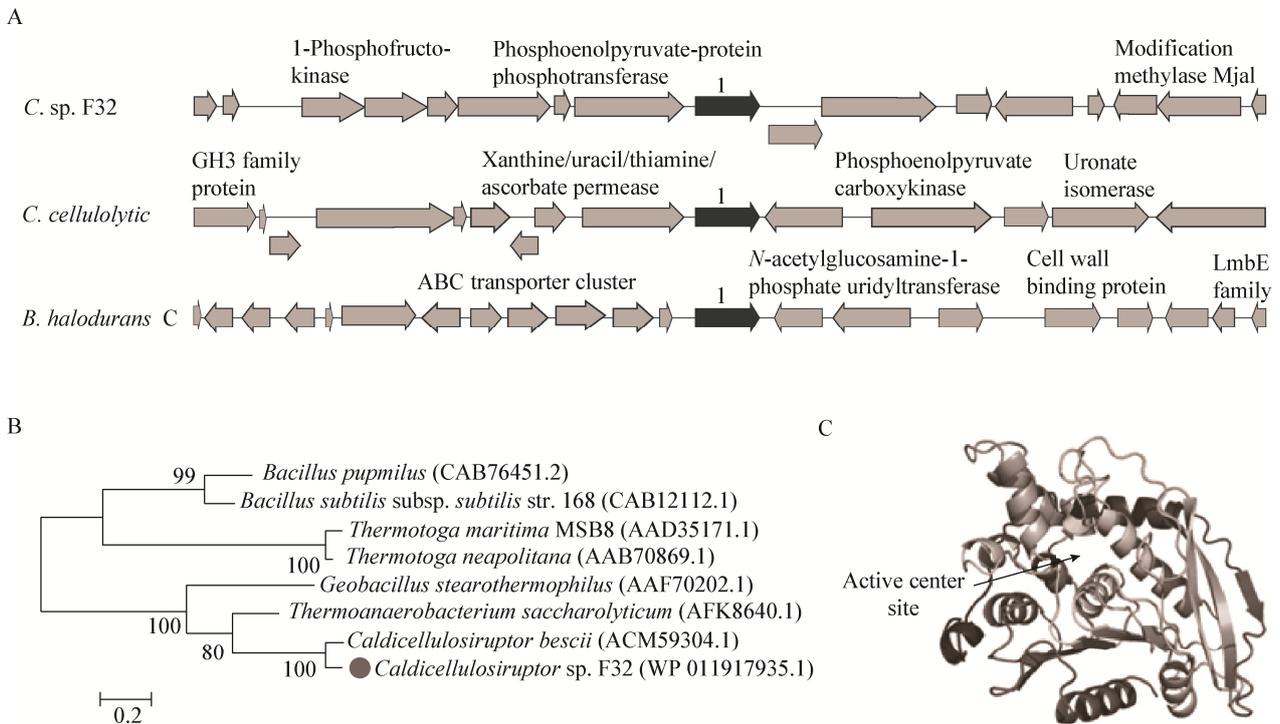


图 1 Axe7 脂酶的基本信息分析

Figure 1 Bioinformation of Axe7

注：A：基于 RAST (Rapid annotation using subsystem technology) 的基因组注释分析；B：利用 MEGA 5.0 进行的同源进化树分析；C：利用 I-TASSER 系统进行的结构预测。

Note: A: RAST-based genome annotation analysis; B: Phylogenetic tree of Axe7 and other homologous by MEGA 5.0; C: Predicted structure of Axe7 by on-line tool 'I-TASSER'.

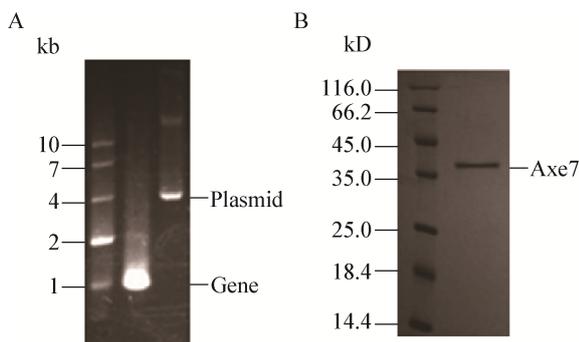


图 2 Axe7 脂酶目标基因的扩增和构建的表达质粒(A) 及纯化后的重组蛋白(B)

Figure 2 Target gene and constructed plasmid (A), and purified recombinant Axe7 in SDS-PAGE (B)

如表 3 所示，Axe7 对底物的亲和性较好，并且比酶活力较高。

在反应体系中分别加入金属离子(Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L)、金属螯合剂 EDTA 以及变性剂(十二烷基硫酸钠，SDS，终浓度 5 mmol/L)，分别测定这些化学试剂对 Axe7 酶活的影响，结果如图 4 所示，除镁离子 (95.7 ± 2.3)% 和金属离子螯合剂 EDTA (98.4 ± 1.2)% 对其酶活影响较小外，多数金属离子(1.5 mmol/L) 对 Axe7 的酶活有一定的抑制作用，在 (66.2 ± 4.6)%–(77.2 ± 4.8)% 之间，而变性剂 SDS 则能显著抑制该酯酶活性 (<10%)。

2.4 Axe7 活性中心鉴定

通过结构预测和分子对接软件分析发现(图 5A) ,Axe7 酯酶中的保守氨基酸残基 Ser¹⁸³、Glu²²⁷、His³⁰² 可以组成一个 Ser/Glu/His 的催化三联体 (Catalytic triad) , 与之前报道的 CE-7 家族脂酶一

致, 其中 Ser¹⁸³ 作为亲核基团是该酶的活性催化位点。通过对上述 3 个位点进行点突变, 将其分别突变为丙氨酸并测定突变体的活性, 结果如图 5B 所示, 突变体均失去了对 4-MUA 的水解活性, 进而证明预测结果的正确性。

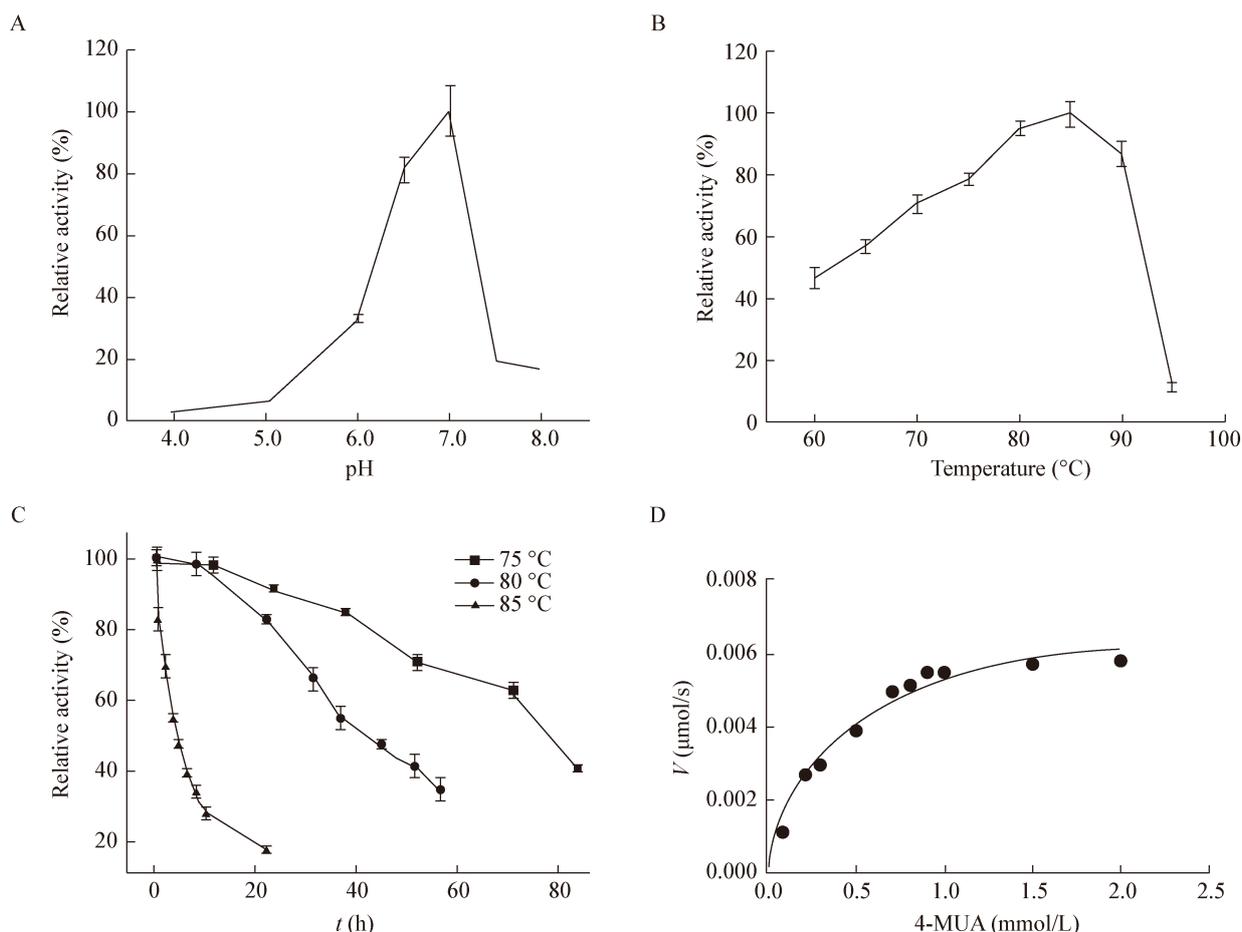


图 3 Axe7 酶学表征

Figure 3 Enzymological characterization of Axe7

注: A: Axe7 的最适 pH; B: 最适温度; C: 热稳定性; D: 动力学拟合曲线。

Note: A: Optimum pH; B: Optimum temperature; C: Thermostability; D: Kinetic curve of Axe7.

表 3 来自不同细菌的 CE7 家族酯酶比较
Table 3 Comparison of CE7 family esterase from different bacteria

菌名 Bacteria species	最适 pH Optimum pH	最适温度 Optimum temperature (°C)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	Specific activity (U/mg)
<i>Bacillus pumilus</i> PS213 ^[13]	8.0	55	1.54 (α -Naphthyl acetate)	—	34.00±2.00 (4-MUA)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 ^[14]	—	—	—	—	4.7 (<i>p</i> NP-acetate)
<i>Thermotogamaritima</i> MSB8 ^[15]	6.5	90	0.12±0.08	69.9	89.0 (<i>p</i> NP-acetate)
<i>Caldicellulosiruptor</i> sp. F32	6.5–7.0	85	0.39	66.9	81.0±1.7 (4-MUA)

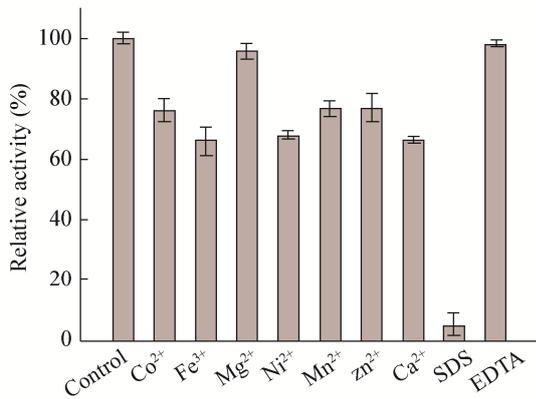


图 4 不同金属阳离子、金属整合剂 EDTA 及变性剂 SDS 对 Axe7 酶活力的影响

Figure 4 Effect of different metal ions, metal chelating agent (EDTA), and denaturant SDS on Axe7 activity

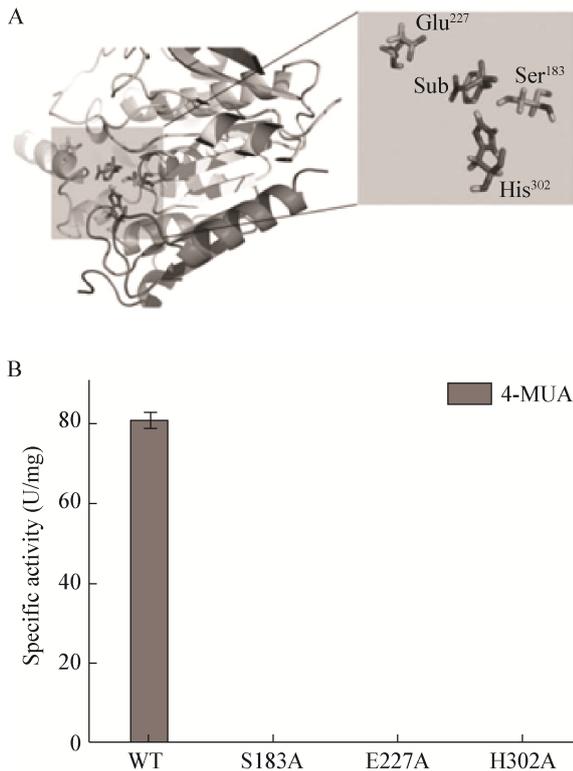


图 5 Axe7 活性位点的预测与鉴定

Figure 5 Identification of the active sites on Axe7

注：A：I-TASSER 预测的活性位点；B：活性位点突变后酶活性对比。

Note: A: Predicated catalytic sites of Axe7 by I-TASSER; B: Specific activities of Axe7 after mutation.

3 讨论

植物细胞壁中木质纤维素的降解不仅取决于纤维素酶、半纤维素酶的作用，也取决于乙酰木聚糖酯酶(Axe)、呋喃型阿拉伯糖苷酶等其它侧链降解酶的协同效应。木质纤维素降解酶系中，乙酰木聚糖酯酶的发现虽然较晚，但其潜在的应用价值正日益受到研究者的重视。乙酰木聚糖酯酶可水解天然木聚糖中木糖单元上的 2 和/或 3 号位的乙酰基酯键，从而使 β -1,4-木聚糖酶能够深入地靠近木聚糖主链，提高木聚糖的水解效率^[16-17]，因此揭示了该酶在木聚糖降解过程中的必要性。乙酰木聚糖酯酶往往发现于半纤维素降解酶系的基因簇中，调控该基因的启动元件往往也是其他一些木质纤维素降解酶系的调控基因，这些证据都表明乙酰木聚糖酯酶在自然界生物降解过程中的重要作用。在本研究中，目标乙酰木聚糖酯酶基因虽然未被注释出位于木聚糖降解(或代谢)酶系(图 1A)，但该菌株属于较少研究的嗜热厌氧微生物，可能存在较多未知的木聚糖降解(或代谢)酶；同时，通过同源进化树分析发现，该酶与其它 7 家族酯酶的序列有较大差异(图 1B)。因此，针对该酯酶的研究具有一定的科学意义。

本研究的目的是从嗜热厌氧微生物热解纤维素菌 F32 中发现和鉴定出高效水解半纤维素侧链的辅助性酶。通过对 Axe7 进行基因克隆、蛋白纯化(图 2)、酶学表征等一系列实验后发现，Axe7 在高温下，对 4-甲基乙酸伞形酯有很好的活性和热稳定性(图 3)；对另外一种底物对硝基苯酚乙酸酯(*p*NP-acetate)在较低温度下($<40\text{ }^{\circ}\text{C}$)也具有较强活性(因为对硝基苯酚乙酸酯在高于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下极易分解，因此难以测定高温下活性^[15]，数据未展示)。在最适条件下 Axe7 的各项酶学指标(表 3)，如比酶活力($81.0\pm 1.7\text{ U/mg}$)、 k_{cat} 、 K_{m} 等，均与目前报道的最高指标——来源于海栖热袍菌 MSB8 (*Thermotoga maritime* MSB8)的酯酶相当。此外，通过多种金属离子、金属整合剂和变性剂试验表明(图 4)，金属离子使 Axe7 的活性保持在最适酶活的($66.3\pm 4.6\%$)–($95.7\pm 2.3\%$)之间，说明金属离子对

其酶活有一定的影响。此外金属螯合剂 EDTA 没有明显影响该酯酶的活性,说明 Axe7 参与底物反应的过程中,不以金属离子为辅助因子。利用 I-TASSER 在线分析软件和氨基酸序列比对,找到了 Axe7 中高度保守的催化位点,利用点突变的技术手段进一步验证了该催化位点与已报道的 CE7 家族的一致。因此,通过上述的一系列研究基本阐明了 Axe7 的酶学特征。

热稳定性是酶制剂在工业利用过程中的重要参数之一。当前报道的大多数乙酰木聚糖酯酶的最适反应温度多在 45–60 °C 之间,并且热稳定性参差不齐^[18-21]。一些嗜热细菌和真菌来源的乙酰木聚糖酯酶有较高的最适反应温度,如嗜热裂孢菌 NTU22 中的 5 家族乙酰木聚糖酯酶在 60 °C 下 3 h 可保持 70% 的活性^[22],而 *Caldanaerobacter subterraneus* 菌属^[19]中分离出的 4 家族乙酰木聚糖酯酶在 70 °C 下的酶活半衰期仅为 40 min。然而从热解纤维素菌属 F32 中提纯得到的乙酰木聚糖酯酶最适反应温度更是高达 85 °C,在 75 °C 下的酶活半衰期长达 70 h 以上,在 80 °C 下的酶活半衰期长达 40 h 以上。因此,较高的最适反应温度和优良的耐热性使该酯酶有良好的工业化利用价值。

为了完全降解木质纤维素、提高酶降解效率,国内外正逐步开展关于乙酰木聚糖酯酶的研究,主要聚焦于乙酰木聚糖酯酶理论及应用的研究^[23-26]。此外,乙酰木聚糖酯酶对打破饲料中抗营养屏障、提高禽畜对饲料的吸收率有重要作用,热稳定良好的乙酰木聚糖酯酶也对饲料酶制剂的工业化生产有重要意义,在生物漂白等方面也显示出良好效果。综上所述,乙酰木聚糖酯酶的市场应用潜力广阔,且符合环境友好的要求。通过本研究发现,Axe7 是具有最适温度高、热稳定性好、酶催化效率高等诸多优点的、具有一定商业化潜力的乙酰木聚糖酯酶,为该类型酯酶的工业化应用提供了一种选择。

参 考 文 献

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(1): 3-23
- [2] Krastanova I, Guarnaccia C, Zahariev S, et al. Heterologous expression, purification, crystallization, X-ray analysis and phasing of the acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2005, 1748(2): 222-230
- [3] Till M, Goldstone DC, Attwood GT, et al. Structure and function of an acetyl xylan esterase (Est2A) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2013, 81(5): 911-917
- [4] Koutaniemi S, van Gool MP, Juvonen M, et al. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylanesterases in xylan deacetylation[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 684-692
- [5] Bouveng HO, Garegg PJ, Lindberg B. Position of the o-acetyl groups in birch xylan[J]. Acta Chemical Scandinavica, 1960, 14: 742-748
- [6] Zhang JH, Siika-Aho M, Tenkanen M, et al. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 60
- [7] Huy ND, Thiyagarajan S, Kim DH, et al. Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase with carbohydrate binding module from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(5): 507-513
- [8] Ying Y, Meng DD, Chen XH, et al. An extremely thermophilic anaerobic bacterium *Caldicellulosiruptor* sp. F32 exhibits distinctive properties in growth and xylanases during xylan hydrolysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 53(3): 194-199
- [9] Overbeek R, Olson R, Pusch GD, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D206-D214
- [10] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [11] Yang JY, Yan RX, Roy A, et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 7-8
- [12] Shao WL, Wiegel J. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylanesterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 729-733
- [13] Degrassi G, Okeke BC, Bruschi CV, et al. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 789-792
- [14] Tian QQ, Song P, Chen C, et al. Identification of acetyl xylan esterase from *Bacillus subtilis* and effects of inducers on its production[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2013, 11(1): 60-64 (in Chinese)
田倩倩, 宋萍, 陈晨, 等. 枯草芽孢杆菌乙酰木聚糖酯酶的鉴定及诱导剂对酯酶活力的影响[J]. 生物加工过程, 2013, 11(1): 60-64
- [15] Drzewiecki K, Angelov A, Ballschmiter M, et al. Hyperthermostable acetyl xylan esterase[J]. Microbial Biotechnology, 2010, 3(1): 84-92
- [16] Wu HL, Xue Y, Liu J, et al. Research progress of acetyl xylan esterase[J]. China Biotechnology, 2016, 36(3): 102-110 (in Chinese)
吴红丽, 薛勇, 刘健, 等. 乙酰木聚糖酯酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(3): 102-110
- [17] Biely P. Microbial xylanolytic systems[J]. Trends in Biotechnology, 1985, 3(11): 286-290
- [18] Chung HJ, Park SM, Kim HR, et al. Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus ficuum* and its expression in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(4): 384-391
- [19] Moriyoshi K, Koma D, Yamanaka H, et al. Expression and characterization of a thermostable acetyl xylan esterase from

- Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis* involved in the degradation of insoluble cellulose acetate[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(12): 2495-2498
- [20] McDermid KP, MacKenzie CR, Forsberg CW. Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(1): 127-132
- [21] Egana L, Gutierrez R, Caputo V, et al. Purification and characterization of two acetyl xylanesterases from *Penicillium purpurogenum*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1996, 24(1): 33-40
- [22] Huang YC, Chen GH, Chen YF, et al. Heterologous expression of thermostable acetylxylan esterase gene from *Thermobifida fusca* and its synergistic action with xylanase for the production of xylooligosaccharides[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 400(4): 718-723
- [23] Aguilar-Pontes MV, Zhou MM, van der Horst S, et al. Sexual crossing of thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* improved enzymatic degradation of sugar beet pulp[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 41
- [24] Peng XW, Qiao WB, Mi SF, et al. Characterization of hemicellulase and cellulase from the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor owensensis* and their potential application for bioconversion of lignocellulosic biomass without pretreatment[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 131
- [25] Mai-Gisondi G, Turunen O, Pastinen O, et al. Enhancement of acetyl xylan esterase activity on cellulose acetate through fusion to a family 3 cellulose binding module[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 79/80: 27-33
- [26] Pawar PMA, Derba-Maceluch M, Chong SL, et al. Expression of fungal acetyl xylan esterase in *Arabidopsis thaliana* improves saccharification of stem lignocellulose[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 387-397

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果，产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有：研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>，点击作者投稿区，第一次投稿请先注册，获得用户名和密码，然后依照提示提交稿件，详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确，数据可靠，简明通顺，重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出，多于3人时列出前3人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例：

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.1130)