

研究报告

西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组来源的高比活 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的重组表达及酶学性质

夏尧¹, 杨金茹¹, 梁师思¹, 陈红¹, 黄遵锡^{1,2,3}, 许波^{*1,2,3}

1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南 昆明 650500

夏尧, 杨金茹, 梁师思, 陈红, 黄遵锡, 许波. 西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组来源的高比活 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的重组表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2582-2601.

XIA Rao, YANG Jinru, LIANG Shisi, CHEN Hong, HUANG Zunxi, XU Bo. Recombinant expression and characterization of high-specific activity α -L-arabinofuranosidase from *Nomascus concolor* fecal microbial metagenome[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2582-2601.

摘要:【背景】 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶是一类重要的半纤维素酶, 能协同其他半纤维素酶降解木聚糖, 在食品、医药、生物质能转化中具有应用价值。【目的】挖掘新型 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因, 对其进行异源表达、纯化并研究其酶学性质。【方法】从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中扩增 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行异源表达, 并进行酶学性质研究。【结果】从粪便微生物宏基因组中扩增得到 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *AbfNC2b_38*, 并获得重组 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38, 其分子量为 57.04 kDa。AbfNC2b_38 的最适作用条件为 55 °C、pH 6.0, K_m 和 V_{max} 分别为 (6.48 ± 0.73) mmol/L 和 $(1\ 248.0 \pm 114.6)$ U/mg, 与其他宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶相比具有最高比活 300.81 U/mg。AbfNC2b_38 具有较好的乙醇和 NaCl 耐受性, 30%乙醇下耐受 1 h 保持 68%的活性; 25% NaCl 中耐受 1 h, 相对酶活仍保持在约 70%。与木聚糖酶协同降解山毛榉木聚糖时, 协同率最高为 1.21。【结论】从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得新型 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *AbfNC2b_38* 并成功异源表达。AbfNC2b_38 具有较好的乙醇和 NaCl 耐受性, 能与木聚糖酶协同作用提高木聚糖的降解效率, 在饲料、食品加工等领域具有潜在的应用价值。

关键词: 粪便微生物宏基因组; α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶; 协同作用

资助项目: 国家自然科学基金(31860299)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860299).

*Corresponding author. E-mail: xubo128028@163.com

Received: 2022-12-01; Accepted: 2023-01-12; Published online: 2023-02-23

Recombinant expression and characterization of high-specific activity α -L-arabinofuranosidase from *Nomascus concolor* fecal microbial metagenome

XIA Rao¹, YANG Jinru¹, LIANG Shisi¹, CHEN Hong¹, HUANG Zunxi^{1,2,3}, XU Bo^{*1,2,3}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500, Yunnan, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] As a valuable hemicellulase, α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) can degrade xylan with other hemicellulases and is applied in food, medicine, and biomass energy conversion. **[Objective]** This study aimed to clone a novel α -L-arabinofuranosidase gene and analyze the heteroexpression, purification, and enzymatic properties of the protein. **[Methods]** The α -L-arabinofuranosidase gene was amplified from the fecal microbial metagenome of *Nomascus concolor* and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and then the enzymatic properties of the protein were examined. **[Results]** After α -L-arabinofuranosidase gene *AbfNC2b_38* was amplified from the fecal microbial metagenome, a recombinant protein AbfNC2b_38 with a molecular weight of 57.04 kDa was expressed. At the optimum conditions of 55 °C and pH 6.0, the enzyme showed the K_m of (6.48±0.73) mmol/L, the V_{max} of (1 248.0±114.6) U/mg, and the highest specific activity of 300.81 U/mg compared with the α -L-arabinofuranosidases of other metagenomic sources. This enzyme was highly tolerant to ethanol and NaCl. It showed the relative activity of 68% after being treated with 30% ethanol for 1 h and relative activity of approximately 70% after being exposed to 25% NaCl for 1 h. Moreover, it had the highest synergistic rate of 1.21 when synergistically degrading beech xylan with xylanase. **[Conclusion]** A novel α -L-arabinofuranosidase gene *AbfNC2b_38* was cloned from the fecal microbial metagenome of *N. concolor*, which was successfully heterologously expressed. AbfNC2b_38 was highly tolerant to both ethanol and NaCl, and can cooperate with xylanase to improve the degradation efficiency of xylan. Hence, this enzyme is of significant application potential in feed and food processing.

Keywords: fecal microbial metagenome; α -L-arabinofuranosidase; synergy

木质纤维素生物质是化石资源的主要替代品之一^[1], 其组成包括木质素、纤维素和半纤维素。半纤维素是其含量第二丰富的多糖, 主要包括木聚糖、甘露聚糖、阿拉伯木聚糖等^[2]。木聚糖由 β -1,4-糖苷键连接的 D-木糖形成的主

链和各种复杂侧链组成^[3], 由于结构复杂, 富含半纤维素的原料降解较为困难。利用酶解法完全降解半纤维素为木糖单元需要 β -木糖苷酶、 β -木聚糖酶、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶等酶的参与^[4]。

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α -L-arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55)能催化木聚糖末端和非还原端 α -(1,2)、 α -(1,3)或 α -(1,5)-阿拉伯呋喃糖基键的裂解^[5-6],从木聚糖主链中去除侧链残基,协同其他半纤维素酶系如木聚糖酶、 β -木糖苷酶、阿魏酸酯酶和乙酰木聚糖酯酶完成木聚糖的完全水解,可用于生物燃料的生产、纸浆漂白^[7-8]、改善葡萄酒风味^[9]、提高饲料消化率^[10]、改良面包品质^[11]、澄清果汁^[12]、生产阿拉伯糖^[13]和提高啤酒酿造中麦汁的过滤率^[14]。目前该酶主要来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[14-16]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[17-18]、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)^[19-22]、木霉菌属(*Trichoderma*)^[23-25]、青霉菌属(*Penicillium*)^[26-30]和链霉菌属(*Streptomyces*)^[31]。在碳水化合物活性酶数据库(Carbohydrate-active enzymes database, CAZy)中,根据氨基酸序列相似性, α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶属于GH2、GH3、GH10、GH39、GH43、GH51、GH54和GH62家族。

动物胃肠道蕴含有丰富的微生物酶类基因资源,目前利用宏基因组技术,避开传统的微生物纯培养,通过加入目标基因活性底物的平板进行活性筛选,以及根据已知功能基因的保守序列设计引物进行PCR扩增筛选阳性克隆或宏基因组测序后利用生物信息学进行数据分析对基因序列功能注释等方法,已经从牦牛^[32]、豪猪^[33]、牛瘤胃^[34]、白蚁肠道^[35]、堆肥^[36]等宏基因组中获得一些耐热、高活性、具有独特底物特异性的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶及其基因,但报道的这些 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶仍存在不耐乙醇、底物作用范围窄等不足。

本研究从前期的西黑冠长臂猿(*Nomascus concolor*)宏基因组研究出发,筛选、克隆并异源表达 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶,通过对其酶学性质的研究,以期获得具有更高活性、更稳定

的新型 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶。

1 材料与方法

1.1 样品

西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组DNA和表达载体pEASY-E2均由本实验室保存。大肠杆菌BL21(DE3),北京擎科新业生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒, Omega公司; Ni-NTA Agarose, Qiagen公司; 氨苄青霉素钠, 宝生物工程有限公司; 对硝基苯基- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(*p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside, *p*NPA), 上海源叶生物有限公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶(*Nde* I和*Xho* I), TaKaRa公司; 青霉代谢产生的商业木聚糖酶、青春双歧杆菌来源的商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶, Megazyme公司; 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*NPG)、对硝基苯基- β -D-木吡喃糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*NPX)、对硝基苯基- α -D-甘露糖苷(*p*-nitrophenyl- α -D-mannoside, *p*NPM), Sigma公司; 山毛榉木聚糖、玉米芯木聚糖、甘蔗渣木聚糖, 上海源叶生物有限公司; 甜菜来源的阿拉伯聚糖, 上海甄准生物科技有限公司。细胞超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电泳仪、PCR仪, Bio-Rad公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 基因克隆和序列分析

1.3.1 基因克隆

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中筛选出含有完整序列的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因*AbfNC2b_38*, 根据*AbfNC2b_38*的基因序列设计含有限制性内切酶*Nde* I (CATATG)和*Xho* I

(CTCGAG)识别位点的引物 AbfNC2b_38 *Nde*F (5'-TAAGAAGGAGATATACATATGGAATTGATGTATCGTTTGTATACTAAC-3')和 AbfNC2b_38 *Xho*R (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCTCCTCCGCACTCACGGCAAG-3')。以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *AbfNC2b_38*。PCR 反应体系: PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, 双蒸水补足 50.0 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 55 $^{\circ}$ C 15 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 10 min。随后将纯化后的 PCR 产物与进行酶切后的表达质粒 pEASY-E2 进行连接, 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 构建 BL-21(DE3)/*AbfNC2b_38* 重组子, 经菌液 PCR 验证阳性克隆后, 保存菌种并测序。

1.3.2 序列分析

使用 BLAST 进行核苷酸和氨基酸序列比对; SignalP 4.0 预测信号肽; BioXM 2.6 预测蛋白质分子量大小; ClustalW 进行多序列比对分析; ESPrpt 3.0 对多序列比对结果进行美化; MEGA 7.0 制作系统发育树。

1.4 蛋白的表达与纯化

取菌株 BL-21(DE3)/*AbfNC2b_38* 以 0.1% 的量接种于 5 mL LB (Amp 终浓度为 100 μ g/mL) 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 活化 12 h 后以 1% 的量接种于 500 mL 含终浓度 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.6-0.8$, 培养基冷却至 20 $^{\circ}$ C 左右后加入终浓度为 0.7 mmol/L 的 IPTG, 于 16 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 20 h 左右以诱导重组蛋白产生。在冰水混合物中, 经 150 W 超声细胞破碎仪破碎 20 min 后收集菌体, 12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清, 再用 Ni-NTA Agarose 纯化后得到纯酶 AbfNC2b_38, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋

白分析。

1.5 酶活性的测定

酶活性测定参照彭程等^[12]的方法, 略有改动。将 25 μ L 的 2 mmol/L *p*NPA 与 50 μ L 的 200 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 6.0)混合, 在 55 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 加入 25 μ L 稀释适当倍数的酶, 反应 15 min 后用 100 μ L 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应并显色。取 150 μ L 反应液至酶标版, 用酶标仪读取其 OD_{410} , 煮沸 10 min 将酶失活后加入反应体系作为空白对照。商业酶的活性测定同上。酶活单位定义为: 一个酶活单位(U)即在酶的最适反应条件下, 每分钟水解 *p*NPA 释放 1 μ mol *p*NP 所需的酶量。对木聚糖和阿拉伯聚糖的活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法, 在反应体系中加入 pH 6.0 醋酸-醋酸钠缓冲液和 1% 的木聚糖和阿拉伯聚糖底物, 在 55 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 加入 100 μ L 酶液, 反应 10 min 后加入 1.5 mL DNS 煮沸 5 min, 使其与还原糖产生显色反应, 读取其 OD_{540} 值。

1.6 重组酶 AbfNC2b_38 酶学性质研究

1.6.1 最适温度和温度稳定性测定

测定 20–80 $^{\circ}$ C 条件下的酶活力, 比较不同温度条件下的相对酶活, 确定最适温度。将酶液于 30、37、40、45、50、55 和 60 $^{\circ}$ C 分别放置 10、20、30、40、50 和 60 min, 在 55 $^{\circ}$ C 和 pH 5.0 条件下测定其剩余酶活力, 以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照, 分析热稳定性。

1.6.2 最适 pH 和 pH 稳定性测定

在最适温度下测定 pH 3.0–12.0 (pH 3.0–7.0: 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液; pH 8.0–12.0: 0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)缓冲液中的酶活力。比较各 pH 条件下的相对酶活, 确定最适反应 pH。将纯酶在不同 pH 3.0–12.0 缓冲溶液中保温 1 h (37 $^{\circ}$ C), 最适反应条件下

测定其剩余酶活力,以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照,分析 pH 稳定性。

1.6.3 底物特异性测定

在酶最适反应条件下,以 2 mmol/L 的 *p*NPA、*p*NPG、*p*NPX、*p*NPM 和 1% (体积分数)的山毛榉木聚糖、桦木木聚糖、玉米芯木聚糖、甘蔗渣木聚糖、阿拉伯聚糖为底物进行特异性活力测定分析。

1.6.4 金属离子和化学试剂对重组酶的影响

将金属离子(一价金属离子: Li^+ 、 Ag^+ 、 Na^+ 、 K^+ ; 二价金属离子: Hg^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} ; 三价金属离子 Al^{3+} 、 Fe^{3+})和化学试剂(乙酸乙酯、PEG4000、盐酸胍、DTT、甘油、乙酸、乙醇、甲醇、 β -巯基乙醇、尿素、SDS、Tween-80、triton X-100、EDTA)加入酶促反应体系中,使其终浓度分别为 1 mmol/L、1% (体积分数) (所有金属离子和化学试剂均用双蒸水配制),在酶最适作用条件下测定其活力,以不加金属离子和化学试剂的酶活力为对照。

1.6.5 动力学参数测定

以 0.1–1.8 mmol/L 的 *p*NPA 为底物,在酶最适反应温度及最适 pH 条件下测定,利用米氏方程非线性拟合计算米氏常数(K_m)、最大反应速度(V_{\max})值。

1.7 NaCl 对酶活力的影响

最适条件下,在底物和酶液的混合液中加入 pH 6.0 醋酸-醋酸钠缓冲液配制的浓度 1%–30% 的 NaCl 溶液,以反应体系中不含 NaCl 为对照,测定 NaCl 对酶的影响;将酶用双蒸水配制的 1%–30% 的 NaCl 稀释到指定倍数,在 37 °C 下作用 1 h 后在最适条件下测定剩余酶活,以用双蒸水稀释的酶液在 37 °C 作用 1 h 为空白对照。

1.8 木糖和 L-阿拉伯糖对酶活力的影响

向反应体系中分别加入 pH 6.0 醋酸-醋酸钠缓冲液配制的浓度为 50、100、200、400、800、1 000 mmol/L 的木糖和 L-阿拉伯糖,于最适反应条件下测定酶活力,以未添加任何糖的试验组为对照,分析糖对酶活力的影响。用双蒸水配制的不同浓度的木糖和 L-阿拉伯糖溶液稀释酶液,在 37 °C 下作用 1 h 后在最适条件下测定剩余酶活,以用双蒸水稀释的酶液在 37 °C 作用 1 h 为空白对照。

1.9 乙醇对酶活力的影响

在最适条件下,在底物和酶液的混合液中加入乙醇溶液,使其终浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25% 和 30%,以反应体系中不含乙醇为对照,测定乙醇对酶的影响。用不同浓度的乙醇溶液稀释酶液,37 °C 作用 1 h 后,在最适条件下测定剩余酶活,以用双蒸水稀释的酶液在 37 °C 作用 1 h 为空白对照。

1.10 与木聚糖酶协同水解木聚糖和产物分析

用 pH 6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制 1% 的山毛榉木聚糖底物,考察不同协同条件下酶解 pH (4.0、5.0、6.0 和 7.0) 和酶解温度 (40、50 和 60 °C) 对协同效率的影响。在不同 pH 和温度条件下设置实验组:只加重组酶 AbfNC2b_38 (Abf) (0.5 U/mL)、只加商业木聚糖酶(Xyl) (0.5 U/mL)、同时加入商业木聚糖酶和重组酶 AbfNC2b_38 (Abf+Xyl);先加商业木聚糖酶后再加重组酶 AbfNC2b_38 (Xyl→Abf)、先加重组酶 AbfNC2b_38 后再加商业木聚糖酶(Abf→Xyl),于 200 r/min 摇床中反应 4 h,取出后煮沸 15 min,待冷却后用 DNS 法测定还原糖含量。以不加任何酶液的底物为空白对照(酶的顺序反应为先加一种酶反应 4 h 后煮沸 15 min,冷却后再加另一种酶反应 4 h 后煮沸 15 min)。选取协同效率最高的

酶解条件设置阳性对照(商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶), 再次进行木聚糖降解实验。协同作用的程度被定义为“当酶同时或顺序使用时释放的产物量与每种酶单独使用时释放的产物量之和的比率”^[37]。

反应液于 12 000 r/min 离心 5 min 后, 以三氯甲烷:冰醋酸:水(6:7:1, 体积比)为展开剂, 以丙酮 50 mL、二苯胺 1 g、苯胺 1 mL、正磷酸 5 mL 混匀作为显色剂进行薄层层析(thin layer chromatography, TLC)分析。

2 结果与分析

2.1 基因克隆和序列分析

通过 PCR 扩增得到 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因 *AbfNC2b_38*。*AbfNC2b_38* (GenBank 登录号为 OL416169) 基因全长为 1 509 bp, GC 含量为 49.83%, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。其编码 502 个氨基酸, 理论分子量为 57.04 kDa, 无信号肽序列。BLAST 比对发现, *AbfNC2b_38* 的氨基酸序列与人类肠道细菌毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)的 α -N-阿拉伯呋喃糖苷酶氨基酸序列(GenBank 登录号为 MBD8918061)有 98.21% 的最高相似性; 与 GenBank 中其他来源的阿拉伯呋喃糖苷酶氨基酸多序列比对发现, *AbfNC2b_38* 与解木聚糖耐热芽孢杆菌(*Thermobacillus xylanilyticus*)来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(PDB ID: 2VRQ_A)、人类肠道细菌来源的 α -N-阿拉伯呋喃糖苷酶(MBD8918061.1)、白蚁肠道宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(CCO20976.1)、堆肥宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(QBG80847.1、QBG80848.1、QBG80849.1)具有保守性氨基酸残基 EHLG、PGG、FGT、DEW 和 VNV 等(图 1), 此外还发现了 Glu176 和位于保守区的 Glu298, 推测它们是通用酸/碱催化剂残基和催化亲核试剂

残基^[38]。

选取不同家族来源 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的氨基酸序列构建系统发育树(图 2), 根据上述的序列文库和文献检索发现 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的微生物来源较为广泛, 主要来源于双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉菌属和木霉菌属。结果表明 *AbfNC2b_38* 与白蚁肠道微生物宏基因组和堆肥环境微生物宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶聚为一支, 并且与 GH51 家族的其他 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶具有高度相似性, 而与 GH62、GH54、GH43 家族来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶亲缘性较远。这表明 *AbfNC2b_38* 是 GH51 家族成员。其他宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶主要分布在 GH51 家族和 GH62 家族。

2.2 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 *AbfNC2b_38* 的异源表达与纯化

将重组质粒 pEASY-E2/*AbfNC2b_38* 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 经测序验证后, 加入 IPTG 诱导表达 20 h 左右, 经破碎收集菌体后 Ni-NTA Agarose 纯化 *AbfNC2b_38*。经计算 *AbfNC2b_38* 的蛋白分子量约为 57.04 kDa, 对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 检测发现, 在 44.3 kDa 和 66.4 kDa 之间有明显的重组条带, 计算的分子量与理论分子量基本相符(图 3), 表明从宏基因组中获得的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因成功得到表达。

2.3 重组 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 *AbfNC2b_38* 的酶学性质

2.3.1 最适温度和温度稳定性

在不同温度条件下检测 *AbfNC2b_38* 酶活的结果如图 4A 所示, 重组 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 *AbfNC2b_38* 的最适温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 在 45–70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保持 50% 以上的酶活。

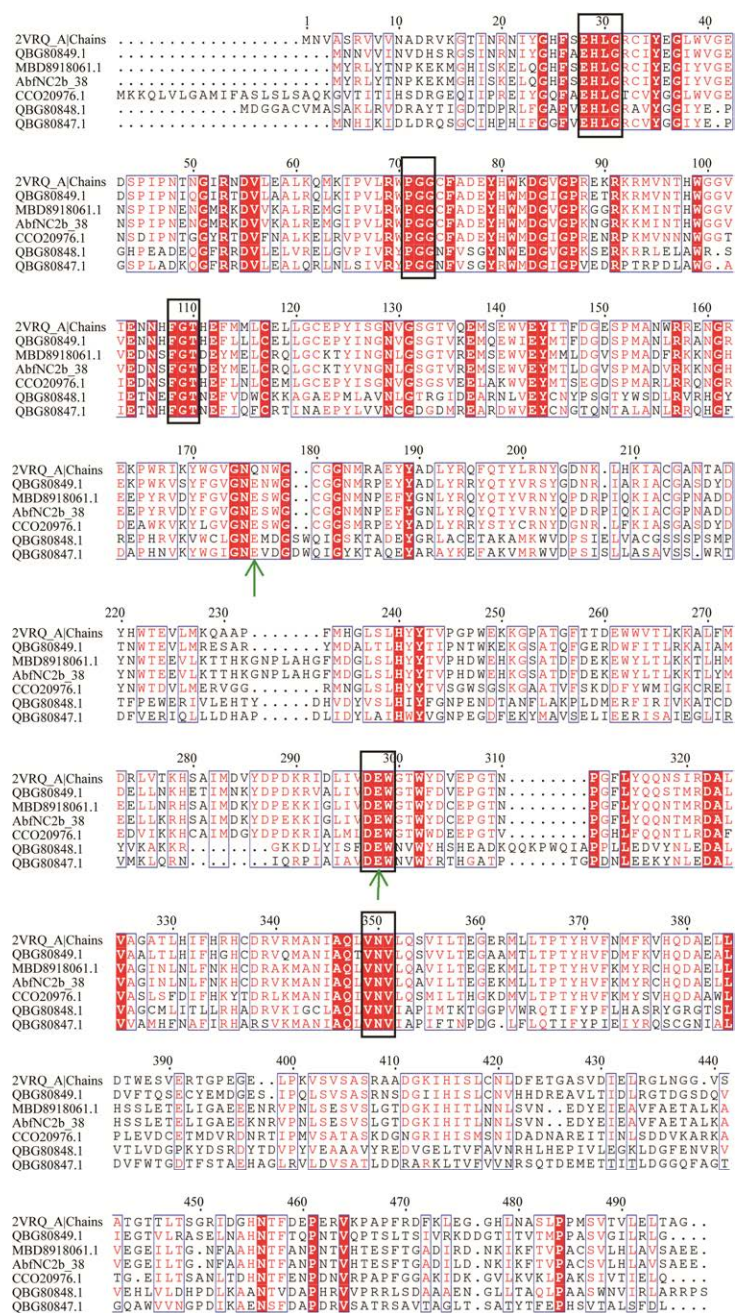


图1 AbfNC2b_38的多序列比对分析 MBD8918061.1、QBG80847.1、QBG80848.1、QBG80849.1、CCO20976.1 分别来自人类肠道细菌毛螺菌科、堆肥宏基因组和白蚁肠道宏基因组，来自解木聚糖耐热芽孢杆菌的 PDB: 2VRQ_A 作为二级结构模板。黑色方框表示保守性氨基酸残基，箭头表示通用酸/碱催化剂残基 Glu176 和催化亲核试剂残基 Glu298

Figure 1 Multiple sequence alignment analysis of AbfNC2b_38. MBD8918061.1, QBG80847.1, QBG80848.1, QBG80849.1, CCO20976.1 are from human intestinal bacteria *Lachnospiraceae*, compost metagenome and termite intestinal metagenome, respectively. PDB: 2VRQ_A from *Thermobacillus xylanilyticus* is used as the secondary structure template. The black box indicates the conserved amino acid residues, and the arrow indicates the common acid/base catalyst residue Glu176 and catalytic nucleophile residue Glu298.

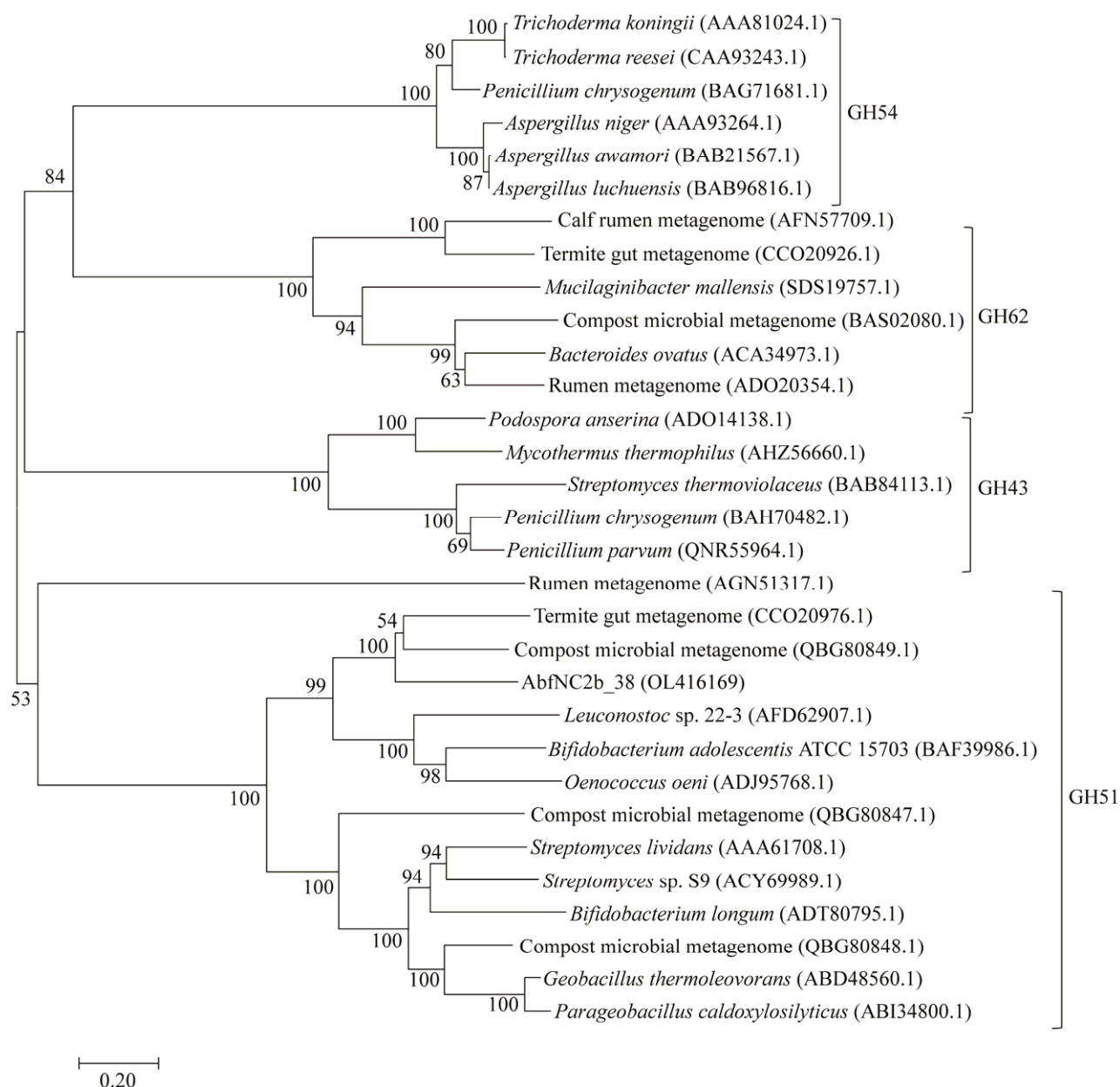


图 2 AbfNC2b_38 与不同家族来源 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶氨基酸序列的系统发育分析 系统发育分析是使用 MEGA 7.0 中 neighbor-Joining (NJ) 方法构建的. 括号内的数字为 GenBank 登录号; 分支线附近的数字表示测试中分支的可靠性百分比; 比例尺表示每个分支的 0.20 个替换核苷酸位置. 序列均来自 GenBank

Figure 2 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of AbfNC2b_38 and α -L-arabinofuranosidase from different families. The phylogenetic analysis was constructed using the neighbor-joining (NJ) method in MEGA 7.0. The number in brackets is the GenBank accession number; The number near the branch line indicates the reliability percentage of the branch in the test; The scale represents 0.20 replacement nucleotide positions for each branch. All sequences are from GenBank.

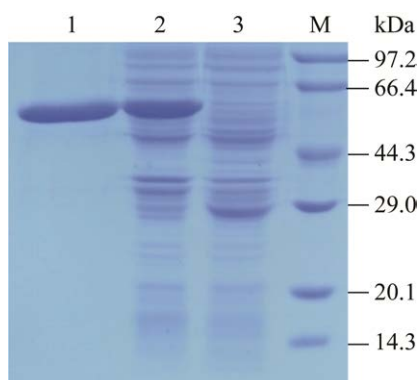


图 3 重组酶 AbfNC2b_38 的 SDS-PAGE 分析
M: 蛋白分子量标准; 1: AbfNC2b_38 纯酶; 2: 未纯化 AbfNC2b_38; 3: 含空载质粒 pEASY-E2 的大肠杆菌细胞裂解液

Figure 3 SDS-PAGE analysis of AbfNC2b_38 recombinase. M: Protein molecular weight standard; 1: AbfNC2b_38 pure enzyme; 2: Unpurified AbfNC2b_38; 3: *Escherichia coli* cell lysate containing empty plasmid pEASY-E2.

温度稳定性如图 4B 显示, 重组酶 AbfNC2b_38 经 30、37、40、45、50、55 和 60 °C 分别处理 1 h, 在 30–55 °C 条件下保持较高酶活性, 残存酶活保持在 80% 以上, 其中 55 °C 条件下热稳定性较好, 在 60 °C 下处理 1 h 半衰期约为 20 min。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

在不同 pH 条件下检测 AbfNC2b_38 酶活的结果如图 5A 所示, 重组 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38 在 pH 6.0 时相对酶活力最高, 在 pH 5.5–7.0 范围内表现出 50% 以上活力。

pH 稳定性如图 5B 显示, 在 pH 3.0–12.0 处理 1 h 后, AbfNC2b_38 在 pH 5.0–9.0 之间表现出较强的活性, 在 pH 6.0、7.0、8.0 和 9.0 条件下处理 1 h, 其残存酶活分别为 113%、113%、98% 和 93%, 在 pH 5.0 时仍保持高达 80% 的残存酶活力。

2.3.3 金属离子和化学试剂的影响

经过在不同金属离子和化学试剂条件下检

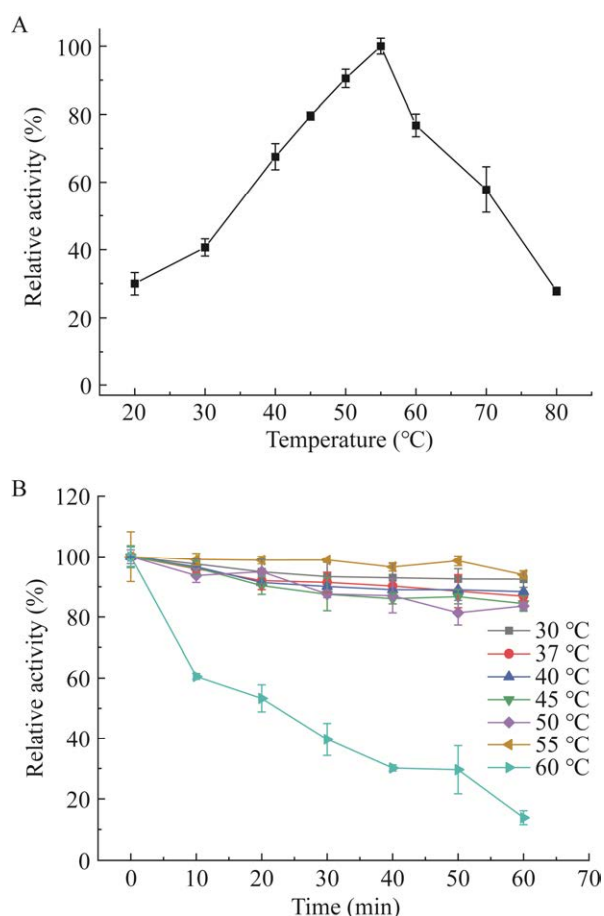


图 4 重组酶 AbfNC2b_38 的最适反应温度(A)及其稳定性(B)

Figure 4 The optimal reaction temperature (A) and stability (B) of AbfNC2b_38.

测 AbfNC2b_38 酶活, 由表 1 可知, 在 1 mmol/L 的金属离子 Ag^+ 的影响下, AbfNC2b_38 的活性被完全抑制, 除 Sn^{2+} 外, 其他金属离子均对该重组酶具有抑制作用, 说明 AbfNC2b_38 对金属离子的作用敏感; 1% 的化学试剂 Triton X-100 可完全抑制 AbfNC2b_38 的活性, 乙酸乙酯、PEG4000、盐酸胍和乙酸对 AbfNC2b_38 也有较强的抑制作用, 残存酶活均低于 15%。DTT、 β -巯基乙醇、SDS 等化学试剂对 AbfNC2b_38 的酶活性有不同程度的抑制作用, 而 1% 的乙醇可使 AbfNC2b_38 的活性提高至 109.76%。

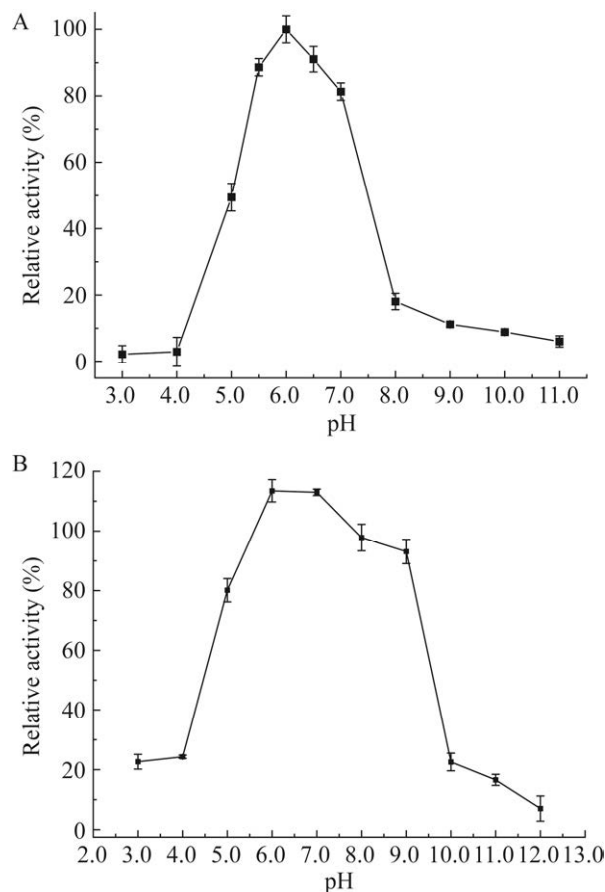


图 5 重组酶 AbfNC2b_38 最适反应 pH (A)及其稳定性(B)
Figure 5 Optimum pH (A) and stability (B) of AbfNC2b_38.

2.3.4 动力学参数

以 *p*NPA 为底物时, AbfNC2b_38 的米氏常数 K_m 值和最大反应速率 V_{max} 分别为(6.48±0.73) mmol/L 和(1 248.0±114.6) U/mg。

2.3.5 底物特异性

经过在不同底物时检测酶活发现, 重组酶 AbfNC2b_38 对 *p*NPA 有较强的水解活性, 酶活为 142.19 U/mL, 比活性为 300.81 U/mg; 对 *p*NPG、*p*NPX、*p*NPM 和 *p*NPG 无活性; 对 1% (体积分数)的山毛榉木聚糖、玉米芯木聚糖、甘蔗渣木聚糖和 L-阿拉伯聚糖活性分别为 1.47、6.26、4.33 和 5.22 U/mL。

表 1 金属离子和化学试剂对重组酶 AbfNC2b_38 活性的影响

Table 1 Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of recombinant enzyme AbfNC2b_38

Metal ions and chemical reagents		Relative activity (%)
Metal ions (1 mmol/L)	Control	100.00±1.74
	Li ⁺	4.97±8.09
	Hg ²⁺	4.31±3.12
	Sn ²⁺	110.21±6.67
	Pb ²⁺	61.69±7.00
	Ag ⁺	0
	Mn ²⁺	78.90±9.43
	Na ⁺	96.74±1.48
	Ca ²⁺	9.37±7.81
	Cu ²⁺	9.80±3.24
	Mg ²⁺	4.23±4.07
	K ⁺	4.89±8.49
	Zn ²⁺	4.62±1.86
	Co ²⁺	90.32±2.81
	Ni ²⁺	1.91±9.77
	Fe ²⁺	9.74±1.93
	Al ³⁺	26.87±5.64
	Fe ³⁺	63.63±4.79
	Control	100.00±0.08
Chemical reagents 1% (V/V)	Ethyl acetate	7.39±0.05
	PEG4000	5.66±0.13
	Guanidine hydrochloride	11.36±0.87
	DTT	78.22±2.05
	Glycerin	76.60±0.37
	Acetic acid	2.67±0.81
	Ethanol	109.76±0.16
	Methanol	70.45±1.35
	β-mercaptoethanol	42.96±0.35
	Urea	52.66±2.23
	SDS	31.52±0.89
	Tween-80	68.37±1.47
	Triton X-100	0
	EDTA	103.64±4.21

2.4 NaCl 浓度对 AbfNC2b_38 酶活的影响

在不同 NaCl 浓度条件下检测 AbfNC2b_38 酶活的结果如图 6A 所示, NaCl 浓度从 1% 增加到 30% 时, AbfNC2b_38 的残存酶活均保持在

70%以上,说明 AbfNC2b_38 有较好的 NaCl 耐受性。

如图 6B 所示, AbfNC2b_38 在 1%–30% 的 NaCl 中耐受 1 h 后, 其残存酶活仍保持在 50% 左右。说明 AbfNC2b_38 有一定的 NaCl 稳定性。

2.5 木糖和 L-阿拉伯糖浓度对 AbfNC2b_38 酶活的影响

在不同木糖和 L-阿拉伯糖浓度条件下检测 AbfNC2b_38 酶活的结果如图 7A 所示, 重组酶受到木糖、L-阿拉伯糖不同程度的影响。随着各种糖浓度的升高, 重组酶的酶活呈下降的趋势。当木糖浓度为 0.4 mol/L 时, AbfNC2b_38 的酶

活力只能维持在 65% 左右; 当 L-阿拉伯糖浓度为 0.05 mol/L 时, AbfNC2b_38 的酶活力小于 50%, 说明 L-阿拉伯糖对 AbfNC2b_38 有较强的抑制作用。

木糖和 L-阿拉伯糖对重组酶稳定性的影响如图 7B 显示, 低浓度的木糖(0.05–0.10 mol/L)对 AbfNC2b_38 有激活作用, 使其活性提高至 110%, 当木糖浓度为 0.8 mol/L 时, AbfNC2b_38 残存酶活仍然维持在 70% 以上; 随着 L-阿拉伯糖浓度升高, AbfNC2b_38 的残存酶活逐渐降低, 当 L-阿拉伯糖浓度为 0.1 mol/L 时, AbfNC2b_38 的残存酶活低于 50%, 表明 L-阿拉伯糖对 AbfNC2b_38 有较强抑制作用。

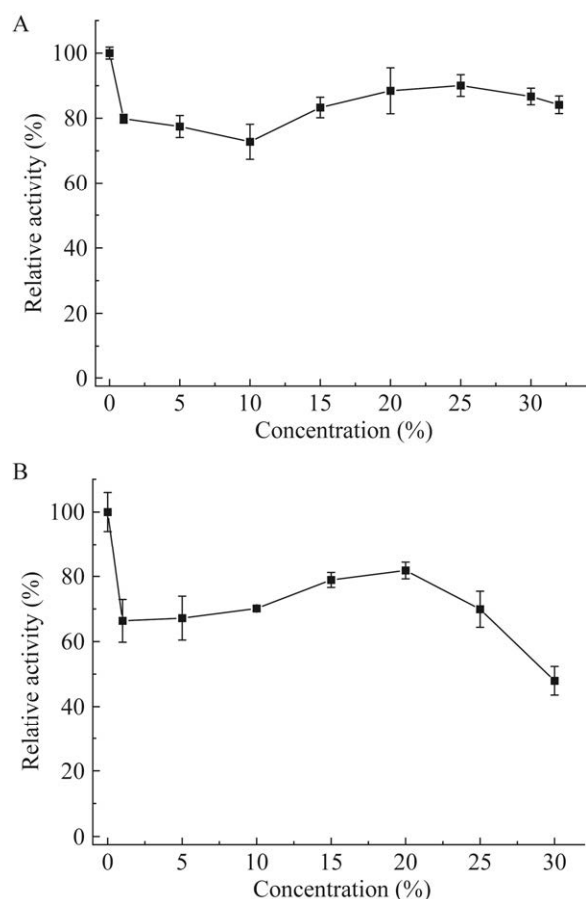


图 6 NaCl 对 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38 的影响(A)及其稳定性(B)

Figure 6 Effect (A) and stability (B) of NaCl on α -L-arabinofuranosidase AbfNC2b_38.

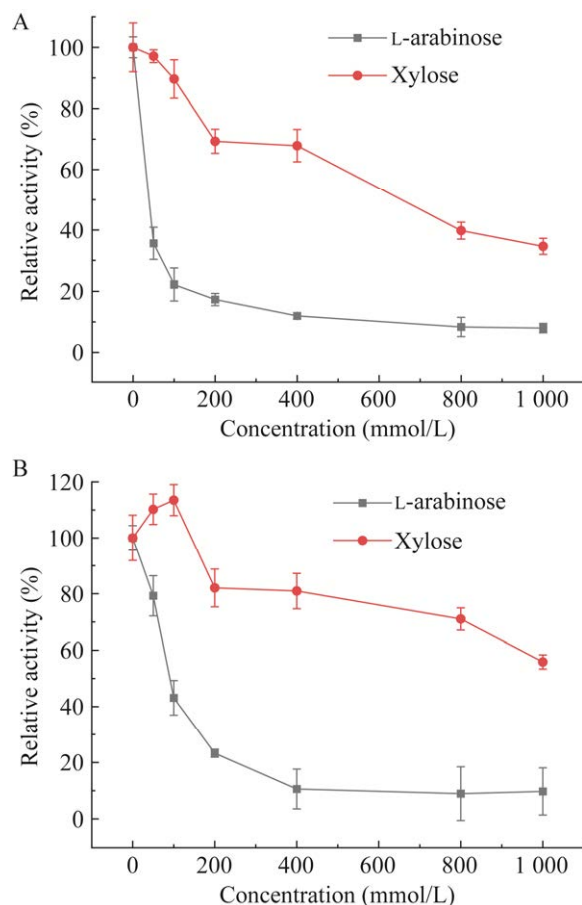


图 7 木糖、L-阿拉伯糖对 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38 的影响(A)和稳定性(B)

Figure 7 Effect (A) and stability (B) of xylose and L-arabinose on α -L-arabinofuranosidase AbfNC2b_38.

2.6 乙醇浓度对 AbfNC2b_38 酶活的影响

乙醇浓度对 AbfNC2b_38 酶活的影响结果见图 8A, 随乙醇浓度升高, 重组酶剩余活性随之降低。AbfNC2b_38 在 15%乙醇存在时, 残存酶活仍能维持在 60%以上。AbfNC2b_38 具有较好的乙醇耐受性(图 8B), 在 5%–30%乙醇条件下处理 1 h 后, 重组酶 AbfNC2b_38 的残存酶活均维持在 65%以上。

2.7 协同实验和产物分析

选取 AbfNC2b_38 和商业木聚糖酶协同率最高的反应条件(pH 5.0 和 50 °C), 在此条件下

将 AbfNC2b_38、商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶分别与商业木聚糖酶进行协同作用发现, AbfNC2b_38 与商业木聚糖酶协同作用的协同率最高可达 1.21 (表 2), 还原糖的产生量为 2.23 mg/mL (图 9); 商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶与商业木聚糖酶协同作用最高协同率为 1.11, 还原糖的产生量为 2.05 mg/mL (图 9), 说明本研究中筛选到的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38 与商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶相比能更好地与商业木聚糖酶协同作用。薄层层析(图 10)反映了木聚糖降解实验中还原糖的产生情况, 除空白对照和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶单独反应组外, 其余实验组均有低聚木糖的产生。

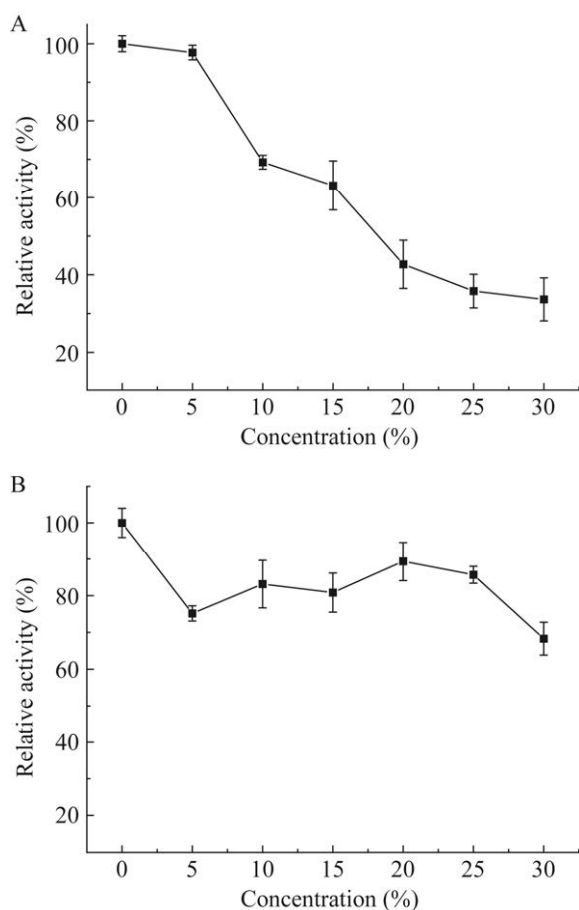


图 8 乙醇对 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38 的影响(A)和稳定性(B)

Figure 8 Effect (A) and stability (B) of ethanol on α -L-arabinofuranosidase AbfNC2b_38.

表 2 不同酶解条件下 AbfNC2b_38 和商业木聚糖酶的协同率

Table 2 Synergy rate of AbfNC2b_38 and commercial xylanase under different enzymolysis conditions

Degradation conditions		Abf→Xyl	Abf+Xyl	Xyl→Abf
pH 5.0	40 °C	0.75	0.99	1.03
	50 °C	1.09	1.21*	1.19
	60 °C	0.96	1.05	1.08
pH 6.0	40 °C	0.83	0.86	0.98
	50 °C	0.89	0.99	0.98
	60 °C	0.96	1.02	0.96
pH 7.0	40 °C	0.96	0.98	0.95
	50 °C	0.92	1.03	1.00
	60 °C	1.07	1.10	1.02

Abf→Xyl: 水解木聚糖时先加入 AbfNC2b_38 再加入商业木聚糖酶; Abf+Xyl: 水解木聚糖时同时加入 AbfNC2b_38 和商业木聚糖酶; Xyl→Abf: 水解木聚糖时先加入商业木聚糖酶再加入 AbfNC2b_38; *: 最高协同率

Abf→Xyl: Add AbfNC2b_38 first and then commercial xylanase when hydrolyzing xylan; Abf+Xyl: Add AbfNC2b_38 and commercial xylanase at the same time when hydrolyzing xylan; Xyl→Abf: Commercial xylanase was added first and then AbfNC2b_38 was added to hydrolyze xylan; *: The highest synergy rate.

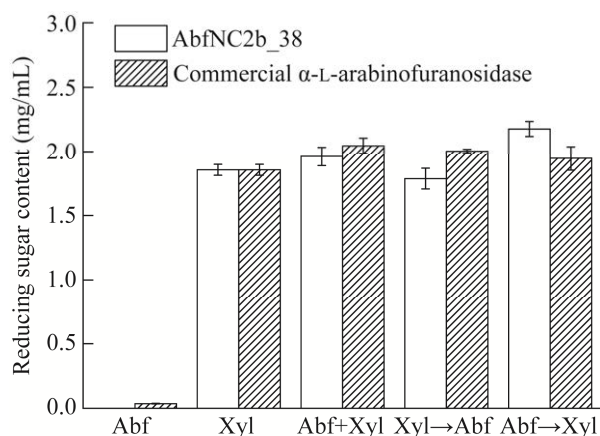


图9 pH 5.0 和 50 °C 条件下重组酶 AbfNC2b_38、商业 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶和商业木聚糖酶协同实验产生还原糖情况 Abf: 水解木聚糖时只加 AbfNC2b_38 或商业 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶; Xyl: 水解木聚糖时只加商业木聚糖酶; Abf→Xyl: 水解木聚糖时先加入 AbfNC2b_38 或商业 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶后加入商业木聚糖酶; Abf+Xyl: 水解木聚糖时同时加入 AbfNC2b_38 或商业 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶和商业木聚糖酶; Xyl→Abf: 水解木聚糖时先加入商业木聚糖酶后加入 AbfNC2b_38 或商业 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶

Figure 9 Production of reducing sugars by synergistic experiments of recombinant AbfNC2b_38, commercial α-L-arabinofuranosidase and commercial xylanase at pH 5.0 and 50 °C. Abf: Only AbfNC2b_38 or commercial α-L-arabinofuranosidase is added to hydrolyze xylan; Xyl: Only commercial xylanase is added to hydrolyze xylan; Abf→Xyl: Commercial xylanase was added after AbfNC2b_38 or α-L-arabinofuranosidase was added to hydrolyze xylan; Abf+Xyl: Add AbfNC2b_38 or commercial α-L-arabinofuranosidase and commercial xylanase when hydrolyzing xylan; Xyl→Abf: Commercial xylanase followed by AbfNC2b_38 or commercial α-L-arabinofuranosidase for xylan hydrolysis.

3 讨论与结论

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中经筛选、克隆和异源表达获得了 GH51 家族的 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38, 经重

组表达并分离纯化后对其酶学性质进行了研究。研究结果表明, AbfNC2b_38 最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–9.0 范围内保持较好的稳定性, 而且最适反应温度为 55 °C。与其他宏基因组来源的 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶比较分析发现, AbfNC2b_38 与北棘白蚁(*Pseudacanthotermes militaris*)宏基因组来源的 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶最适 pH 6.0 相同(表 3)。由表 3 可知, 宏基因组来源的 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶最适反应温度范围为 30–60 °C, AbfNC2b_38 最适反应温度与堆肥微生物宏基因组来源的 AFase-E3 和 AFase-H4 相近, 但 AFase-E3 的耐热性更好, 70 °C 耐受 24 h 残存酶活仍为 100%。与 GH51 家族微生物来源的其他 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶进行比较分析, 发现 GH51 家族微生物来源的该酶最适 pH 在 3.5–7.5 之间, AbfNC2b_38 在 pH 5.0–9.0 之间有较高的酶活。AbfNC2b_38 的最适反应温度与 *Alaromyces leycettanus* strain JCM12802 来源的 TlAbf51、*Alicyclobacillus* sp. A4 来源的 Ac-Abf51A、*Bacillus pumilus* ARA 来源的 AraB、*Streptomyces* sp. S9 来源的 abf51S9 和 *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari 来源的 AbfAC26Sari 相似(最适反应温度为 55–65 °C), 均为中高温酶, 但是耐热性不及 Ac-Abf51A (60 °C 保温 12 h 仍有 100% 的剩余酶活)、AbfAC26Sari (50–65 °C 保温 24 h 仍有 80% 的剩余酶活)、AraB (70 °C 保温 1 h 有 50% 的剩余酶活)和 abf51S9 (60 °C 保温 1 h 有 40% 的剩余酶活)(表 3)。

金属离子和化学试剂对酶活性影响的研究表明, AbfNC2b_38 活性易受金属离子和化学试剂的影响, 多数金属离子和化学试剂对其活性有较强的抑制作用。与其他微生物来源的 GH51 家族的 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶比较分析发现, Cu²⁺、Hg²⁺和 Zn²⁺对 GH51 家族的大部分 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶都有抑制作用^[12,32,40,42–45,48–51], 本

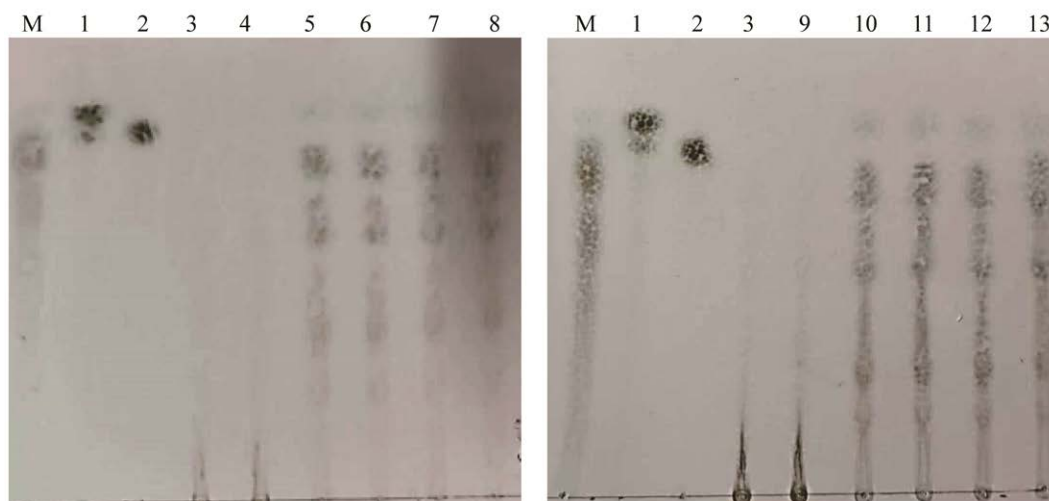


图 10 协同实验水解产物薄层层析分析 M: 低聚木糖标准品; 1: 木糖标准品; 2: 阿拉伯糖标准品; 3: 空白对照; 4: 反应体系只加入商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶; 5: 反应体系只加入木聚糖酶; 6: 反应体系同时加入商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和木聚糖酶; 7: 反应体系先加入木聚糖酶再加入商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的反应产物; 8: 反应体系先加入商业 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶再加入木聚糖酶; 9: 反应体系只加入 AbfNC2b_38; 10: 反应体系只加入木聚糖酶; 11: 反应体系同时加入 AbfNC2b_38 和木聚糖酶; 12: 反应体系先加入木聚糖酶再加入 AbfNC2b_38; 13: 反应体系先加入 AbfNC2b_38 再加入木聚糖酶

Figure 10 Collaborative experimental hydrolysis thin layer chromatography (TLC) analysis. M: Xylo-oligosaccharide standard; 1: Xylose standard; 2: Arabinose standard product; 3: Blank control; 4: Only commercial α -L-arabinofuranosidase was added to the reaction system; 5: Only xylanase was added to the reaction system; 6: Commercial α -L-arabinofuranosidase and xylanase were added to the reaction system; 7: Xylanase and then commercial α -L-arabinofuranosidase reaction products were added to the reaction system; 8: Commercial α -L-arabinofuranosidase was first added to the reaction system and then xylanase was added; 9: Only AbfNC2b_38 was added to the reaction system; 10: Only xylanase is added to the reaction system; 11: AbfNC2b_38 and xylanase were added to the reaction system; 12: Xylanase was first added to the reaction system and then AbfNC2b_38 was added; 13: AbfNC2b_38 and then xylanase were added to the reaction system.

研究结果与之相符。 Ag^+ 对 AbfNC2b_38 的完全抑制与 *Streptomyces* sp. S9 来源的 AfuB-H1^[44] 相一致。但在 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 的存在下, 堆肥微生物宏基因组来源的 CoXyl43^[45]、奶牛瘤胃宏基因组来源的 Bgxa1^[46]和 *Bacillus stearothermophilus* T-6 来源的 AF^[52]活性却均有不同程度的提高。由表 1 可知, 1% EDTA 对该酶活性的影响并不大, 与 *Bifidobacterium breve* K-110 来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶^[48]、堆肥微生物宏基因组来源

的 CoXyl43 和其他 GH51 家族来源的绝大多数 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶相同, 说明该酶可能对金属辅因子的需求并不明显^[45,49,52]。

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶能在酱油生产的高盐环境中与其他酶协同产生戊糖, 从而改变酱油的着色, 提高酱油价值, 因此能耐受 NaCl 的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶能更好地应用于食品行业^[53]。不同 NaCl 浓度对 AbfNC2b_38 活性影响的研究发现, 在 30% NaCl 影响下, AbfNC2b_38

表 3 重组酶与宏基因组及部分 GH51 家族来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶酶学性质比较

Source	Enzyme	GH family	Optimum temperature (°C)	Temperature stability	Optimum pH	pH stability	K_m (mmol/L)	Specific activity (U/mg)	References
<i>Nomascus corcolor</i> fecal metagenome	AbfNC2b_38	GH51	55	30–55 °C for 1 h has more than 80% activities; 60 °C for 1 h has 14% activities	6.0	5.0–9.0 for 1 h (55 °C) has more than 80% activities	6.48±0.73	300.81	This study
<i>Alaromyces leycettanus</i> strain JCM12802	TLAbf51	GH51	55–60	50 °C for 30 min has more than 90% activities	3.5–4.0	3.0–9.0 for 1 h (37 °C) has more than 70% activities	0.28±0.01	1 068.00±8.40	[8]
<i>Alicyclobacillus</i> sp. A4	Ac-Abf51A	GH51	60	60 °C for 12 h has full activities; 80 °C for 30 min has more than 30% activities	6.0	4.0–11.0 °C for 1 h (37 °C) has more than 80% activities	0.46	18.20	[39]
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sari	AbfAC26Sari	GH51	65	50–65 °C for 24 h has 80% more than activities	5.5	4.0–10.0 for 5 h (65 °C) has 60% activities	0.139	112.00	[40]
<i>Bacillus pumilus</i> ARA	AraB	GH51	60	70 °C for 1 h has 50% activities; 60 °C for 2 h has no activity	6.4	4.8–7.6 for 1 h (65 °C) has more than 85% activities	1.05	158.00	[41]
<i>Geobacillus caldxylyticus</i> TK4	AbfA TK4	GH51	75–80	80 °C 30 min has 90% activities; 80 °C 80 min has no activity	6.0	—	0.17	—	[42]
<i>Rhodanobacter ginsenosidimitans</i>	AbfA	GH51	37	45 °C for 30 min has no activity	7.5	—	0.53±0.07	14.90	[43]
<i>Streptomyces</i> sp. S9	abf51S9	GH51	60–65	60 °C for 1 h has 40% activities; 70 °C for 20 min lost all activities	6.0	5.0–11.0 for 1 h (37 °C) has more than 75% activities	1.45	60.00	[44]
Compost metagenome	AFase-E3	GH51	60	70 °C for 24 h has 100% activities	4.0	—	0.33	228.60	[36]
	AFase-H4	GH51	60	50 °C for 12 h has 100% activities	5.0	—	0.31	143.10	
<i>Dairy cow</i> rumen metagenome	CoXy143	GH43		—	—	—	2.60±0.13		[45]
<i>Pseudacanthotermes militaris</i> metagenome	Bgxa1	GH3	30	—	6.5–8.5	—	2.8±0.2	3.61±0.50	[46]
Rumen metagenome	Clone F3	GH43	30	—	6.0	—	—	2.80±0.24	[47]
	RuXyn1	—	—	—	—	—	2.23	14.20	[32]

—: 无或文献中未提及

—: None or not mentioned in the literature.

仍有 70% 的活性。在 25% NaCl 中耐受 1 h 后, AbfNC2b_38 剩余酶活在 70% 左右, 说明 AbfNC2b_38 有较好的耐盐性, 在食品中具有较好的应用价值。 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶能增加葡萄酒中萜烯的释放, 从而增加葡萄酒的香气, 具有乙醇耐受的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶在葡萄酒的酿造中具有潜在的应用价值^[54]。不同乙醇浓度对 AbfNC2b_38 活性影响的研究发现, AbfNC2b_38 的乙醇抗性比毛颖^[55]研究的 ABFA、ABF2 和左莎莎^[56]研究的 CaAraf51 要好。综合乙醇耐受性研究报道可知, AbfNC2b_38 在 5%–30% 的乙醇中耐受 1 h 后, 酶活力均保持在 65% 以上。葡萄酒的酒精度约在 8.5%–15% 之间, 在这个酒精度范围内, AbfNC2b_38 仍保持较高的酶活力, 说明 AbfNC2b_38 在葡萄酒生产过程中具有一定的应用价值。

不同糖浓度影响 AbfNC2b_38 活性的研究发现, 木糖、L-阿拉伯糖的浓度越高, 对 AbfNC2b_38 的抑制也越强。L-阿拉伯糖是 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶分解阿拉伯木聚糖的产物^[57], 当 L-阿拉伯糖浓度为 50 mmol/L 时, AbfNC2b_38 的酶活就降低到 50% 以下, 表明 L-阿拉伯糖对该酶有强产物抑制作用。木聚糖的降解产物中含有木糖, 因此 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶对木糖的耐受有利于木聚糖的酶解。木糖耐受研究发现低浓度(50–100 mmol/L)的木糖对 AbfNC2b_38 有一定的激活作用。当木糖浓度达到 1 mol/L 时, AbfNC2b_38 残存酶活大于 50%, 说明 AbfNC2b_38 对木糖有一定的耐受能力。

为了提高木聚糖的降解效率, 在不同的 pH 和温度条件下对 AbfNC2b_38 和木聚糖酶的组合进行了同时和顺序检测, 结果发现 AbfNC2b_38 和木聚糖酶的协同作用提高了山毛榉木聚糖的降解率。薄层分析结果也进一步说明了不同实验组山毛榉木聚糖的水解情况, 即木聚糖酶单

独或者木聚糖酶和 AbfNC2b_38 组合使用时将山毛榉木聚糖水解为更小单位的低聚木糖。因此, AbfNC2b_38 和木聚糖酶具有协同作用, 在 pH 5.0 和 50 °C 条件下同时加入 AbfNC2b_38 和商业木聚糖酶能达到最高的木聚糖降解率。因此 AbfNC2b_38 在生物燃料的生产上具有一定的应用价值。

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得了与木聚糖酶具有协同作用的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 AbfNC2b_38, 其能与木聚糖酶协同作用提高木聚糖的水解效率, 与其他宏基因组来源的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶相比具有更高的比活力。该酶在 30% 的乙醇中耐受 1 h 仍保持相对较高的活性, 并具有较好的 NaCl 耐受性和稳定性, 在食品加工、葡萄酒酿造等方面具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] SHEN BZ, SUN XG, ZUO X, SHILLING T, APGAR J, ROSS M, BOUGRI O, SAMOYLOV V, PARKER M, HANCOCK E, LUCERO H, GRAY B, EKBORG NA, ZHANG DC, JOHNSON JCS, LAZAR G, RAAB RM. Engineering a thermoregulated intein-modified xylanase into maize for consolidated lignocellulosic biomass processing[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(11): 1131-1136.
- [2] SEGATO F, DAMÁSIO ARL, de LUCAS RC, SQUINA FM, PRADE RA. Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2014, 78(4): 588-613.
- [3] YANG XZ, SHI PJ, MA R, LUO HY, HUANG HQ, YANG PL, YAO B. A new GH43 α -arabinofuranosidase from *Humicola insolens* Y1: biochemical characterization and synergistic action with a xylanase on xylan degradation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(4): 1960-1970.
- [4] LÓPEZ-MONDÉJAR R, ALGORA C, BALDRÍAN P. Lignocellulolytic systems of soil bacteria: a vast and diverse toolbox for biotechnological conversion

- processes[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107374.
- [5] SAHA BC. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(5): 403-423.
- [6] PORIA V, SAINI JK, SINGH S, NAIN L, KUHAD RC. Arabinofuranosidases: characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 123019.
- [7] JORDAN DB, BOWMAN MJ, BRAKER JD, DIEN BS, HECTOR RE, LEE CC, MERTENS JA, WAGSCHAL K. Plant cell walls to ethanol[J]. *The Biochemical Journal*, 2012, 442(2): 241-252.
- [8] TU T, LI XL, MENG K, BAI YG, WANG Y, WANG ZX, YAO B, LUO HY. A GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Talaromyces leycettanus* strain JCM12802 that selectively drives synergistic lignocellulose hydrolysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 138.
- [9] TAVERNINI L, OTTONE C, ILLANES A, WILSON L. Entrapment of enzyme aggregates in chitosan beads for aroma release in white wines[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1082-1090.
- [10] COZANNET P, KIDD MT, MONTANHINI NETO R, GERAERT PA. Next-generation non-starch polysaccharide-degrading, multi-carbohydrase complex rich in xylanase and arabinofuranosidase to enhance broiler feed digestibility[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(8): 2743-2750.
- [11] XUE YM, CUI XB, ZHANG ZH, ZHOU T, GAO R, LI YX, DING XX. Effect of β -endoxylanase and α -arabinofuranosidase enzymatic hydrolysis on nutritional and technological properties of wheat brans[J]. *Food Chemistry*, 2020, 302: 125332.
- [12] 彭程, 肖文熙, 倪辉, 李利君, 谭万森, 林燕玲, 李清彪. 一种黑曲霉 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶克隆表达、性质分析和果汁澄清效果[J]. *食品科学*, 2022, 43(2): 83-92.
- PENG C, XIAO WX, NI H, LI LJ, TAN WS, LIN YL, LI QB. Cloning, expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and its clarification effect on fruit juice[J]. *Food Science*, 2022, 43(2): 83-92 (in Chinese).
- [13] KURAKAKE M, TAKAO J, ASANO O, TANIMOTO H, KOMAKI T. Production of L-arabinose from corn hull arabinoxylan by *Arthrobacter aurescens* MK5 α -L-arabinofuranosidase[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(2): C231-C235.
- [14] LI XM, XIE XZ, LIU J, WU DH, CAI GL, LU J. Characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and its potential use in beer production[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125382.
- [15] BORIN GP, SANCHEZ CC, de SOUZA AP, de SANTANA ES, de SOUZA AT, PAES LEME AF, SQUINA FM, BUCKERIDGE M, GOLDMAN GH, OLIVEIRA JV. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129275.
- [16] REIJNGOUD J, DESEKE M, HALBESMA ETM, ALAZI E, ARENTSHORST M, PUNT PJ, RAM AFJ. Mutations in AraR leading to constitutive of arabinolytic genes in *Aspergillus niger* under derepressing conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(10): 4125-4136.
- [17] JI MH, LI SJ, CHEN A, LIU YH, XIE YK, DUAN HY, SHI JP, SUN JS. A wheat bran inducible expression system for the efficient production of α -L-arabinofuranosidase in *Bacillus subtilis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 144: 109726.
- [18] ZHANG R, TAN SQ, ZHANG BL, GUO ZY, TIAN LY, WENG P, LUO ZY. Two key amino acids variant of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* Str. 168 with altered activity for selective conversion ginsenoside Rc to Rd[J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1733.
- [19] KOMENO M, HAYAMIZU H, FUJITA K, ASHIDA H. Two novel α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(6): e02582-e02518.
- [20] SAITO K, VIBORG AH, SAKAMOTO S, ARAKAWA T, YAMADA C, FUJITA K, FUSHINOBU S. Crystal structure of β -L-arabinobiosidase belonging to glycoside hydrolase family 121[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0231513.
- [21] SASAKI Y, HORIGOME A, ODAMAKI T, XIAO JZ, ISHIWATA A, ITO Y, KITAHARA K, FUJITA K. Novel 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase for the assimilation of gum arabic arabinogalactan protein

- in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(10): e02690-e02620.
- [22] KOMENO M, YOSHIHARA Y, KAWASAKI J, NABESHIMA W, MAEDA K, SASAKI Y, FUJITA K, ASHIDA H. Two α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* are involved in arabinoxylan utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(5): 1957-1965.
- [23] SUN JY, XU F, LU J. A glycoside hydrolase family 62 A-L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* and its applicable potential during mashing[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2020, 9(3): 356.
- [24] LEAL MOTTA ML, ALVES FERREIRA FILHO J, de MELO RR, ZANPHORLIN LM, dos SANTOS CA, de SOUZA AP. A novel fungal metal-dependent α -L-arabinofuranosidase of family 54 glycoside hydrolase shows expanded substrate specificity[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 10961.
- [25] LAMBRÉ C, BAVIERA JMB, BOLOGNESI C, COCCONCELLI PS, CREBELLI R, GOTT DM, GROB K, LAMPI E, MENGELERS M, MORTENSEN A, RIVIÈRE G, STEFFENSEN IL, TLUSTOS C, van LOVEREN H, VERNIS L, ZORN H, ANDRYSZKIEWICZ M, LIU Y, NIELSEN E, NORBY K, CHESSON A. Safety evaluation of the food enzyme non-reducing end α -L-arabinofuranosidase from the genetically modified *Trichoderma reesei* strain NZYM-GV[J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2022, 20(3): e07173.
- [26] YANG Y, ZHU N, YANG JS, LIN YJ, LIU JW, WANG RN, WANG FQ, YUAN HL. A novel bifunctional acetyl xylan esterase/arabinofuranosidase from *Penicillium chrysogenum* P33 enhances enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 166.
- [27] HU YB, YAN XC, ZHANG H, LIU JQ, LUO F, CUI YY, WANG WY, ZHOU YF. Cloning and expression of a novel α -1,3-arabinofuranosidase from *Penicillium oxalicum* sp. 68[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 51.
- [28] GAO LW, LI SY, XU YN, XIA CQ, XU JD, LIU J, QIN YQ, SONG X, LIU GD, QU YB. Mutation of a conserved alanine residue in transcription factor AraR leads to hyperproduction of α -L-arabinofuranosidases in *Penicillium oxalicum*[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(7): e1800643.
- [29] CINTRA LC, Da COSTA IC, de OLIVEIRA ICM, FERNANDES AG, FARIA SP, SANTOS AMORIN JESUÍNO R, RAVANAL MC, EYZAGUIRRE J, RAMOS LP, de FARIA FP, ULHOA CJ. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 133: 109447.
- [30] LI XX, KOUZOUNIS D, KABEL MA, de VRIES RP. GH10 and GH11 endoxylanases in *Penicillium subrubescens*: comparative characterization and synergy with GH51, GH54, GH62 α -L-arabinofuranosidases from the same fungus[J]. New Biotechnology, 2022, 70: 84-92.
- [31] PHUENGMAUNG P, KUNISHIGE Y, SUKHUMSIRICHART W, SAKAMOTO T. Identification and characterization of GH62 bacterial α -L-arabinofuranosidase from thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 that preferentially degrades branched L-arabinofuranoses in wheat arabinoxylan[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 112: 22-28.
- [32] ZHOU JG, BAO L, CHANG L, ZHOU YF, LU H. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(1): 143-152.
- [33] THORNBURY M, SICHERI J, SLAINE P, GETZ LJ, FINLAYSON-TRICK E, COOK J, GUINARD C, BOUDREAU N, JAKEMAN D, ROHDE J, McCORMICK C. Characterization of novel lignocellulose-degrading enzymes from the porcupine microbiome using synthetic metagenomics[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0209221.
- [34] FERRER M, GHAZI A, BELOQUI A, VIEITES JM, LÓPEZ-CORTÉS N, MARÍN-NAVARRO J, NECHITAYLO TY, GUAZZARONI ME, POLAINA J, WALICZEK A, CHERNIKOVA TN, REVA ON, GOLYSHINA OV, GOLYSHIN PN. Functional metagenomics unveils a multifunctional glycosyl hydrolase from the family 43 catalysing the breakdown of plant polymers in the calf rumen[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38134.
- [35] CALUSINSKA M, MARYNOWSKA M, BERTUCCI M, UNTEREINER B, KLIMEK D, GOUX X, SILLAM-DUSSÈS D, GAWRON P, HALDER R, WILMES P, FERRER P, GERIN P, ROISIN Y,

- DELFOSE P. Integrative omics analysis of the termite gut system adaptation to *Miscanthus* diet identifies lignocellulose degradation enzymes[J]. Communications Biology, 2020, 3: 275.
- [36] FORTUNE B, MHLONGO S, ZYL LJ, HUDDY R, SMART M, TRINDADE M. Characterisation of three novel α -L-arabinofuranosidases from a compost metagenome[J]. BMC Biotechnology, 2019, 19(1): 1-13.
- [37] van DYK JS, PLETSCHE BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1458-1480.
- [38] PAËS G, SKOV LK, O'DONOHUE MJ, RÉMOND C, KASTRUP JS, GAJHEDE M, MIRZA O. The structure of the complex between a branched pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 arabinofuranosidase reveals xylan-binding determinants and induced fit[J]. Biochemistry, 2008, 47(28): 7441-7451.
- [39] YANG WX, BAI YG, YANG PL, LUO HY, HUANG HQ, MENG K, SHI PJ, WANG YR, YAO B. A novel bifunctional GH51 exo- α -L-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 197.
- [40] CANAKCI S, KACAGAN M, INAN K, BELDUZ AO, SAHA BC. Cloning, purification, and characterization of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(1): 61-68.
- [41] PEI JJ, SHAO WL. Purification and characterization of an extracellular α -L-arabinosidase from a novel isolate *Bacillus pumilus* ARA and its over-expression in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 115-121.
- [42] CANAKCI S, BELDUZ AO, SAHA BC, YASAR A, AYAZ FA, YAYLI N. Purification and characterization of a highly thermostable α -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(4): 813-820.
- [43] AN DS, CUI CH, SUNG BH, YANG HC, KIM SC, LEE ST, IM WT, KIM SG. Characterization of a novel ginsenoside-hydrolyzing α -L-arabinofuranosidase, AbfA, from *Rhodanobacter ginsenosidimutans* Gsoil 3054^T[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(3): 673-682.
- [44] SHI PJ, LI N, YANG PL, WANG YR, LUO HY, BAI YG, YAO B. Gene cloning, expression, and characterization of a family 51 α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. S9[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(3): 707-718.
- [45] MATSUZAWA T, KANEKO S, YAOI K. Screening, identification, and characterization of a GH43 family β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase from a compost microbial metagenome[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(21): 8943-8954.
- [46] GRUNINGER RJ, GONG X, FORSTER RJ, McALLISTER TA. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7): 3003-3012.
- [47] BASTIEN G, ARNAL G, BOZONNET S, LAGUERRE S, FERREIRA F, FAURÉ R, HENRISSAT B, LEFÈVRE F, ROBE P, BOUCHEZ O, NOIROT C, DUMON C, O'DONOHUE M. Mining for hemicellulases in the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes militaris* using functional metagenomics[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 78.
- [48] SHIN HY, PARK SY, SUNG JH, KIM DH. Purification and characterization of alpha-L-arabinopyranosidase and alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7116-7123.
- [49] SCHWARZ WH, BRONNENMEIER K, KRAUSE B, LOTTSPEICH F, STAUDENBAUER WL. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(5): 856-860.
- [50] LEE JH, HYUN YJ, KIM DH. Cloning and characterization of α -L-arabinofuranosidase and bifunctional α -L-arabinopyranosidase/ β -D-galactopyranosidase from *Bifidobacterium longum*

- H-1[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1097-1107.
- [51] LIU QM, JUNG HM, CUI CH, SUNG BH, KIM JK, KIM SG, LEE ST, KIM SC, IM WT. Bioconversion of ginsenoside Rc into Rd by a novel α -L-arabinofuranosidase, Abf22-3 from *Leuconostoc* sp. 22-3: cloning, expression, and enzyme characterization[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(4): 747-754.
- [52] GILEAD S, SHOHAM Y. Purification and characterization of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 170-174.
- [53] HASHIMOTO T, NAKATA Y. Synergistic degradation of arabinoxylan with alpha-L-arabinofuranosidase, xylanase and beta-xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(2): 164-169.
- [54] RAVANAL MC, ROSA L, EYZAGUIRRE J. A-L-arabinofuranosidase 3 from *Penicillium purpurogenum* (ABF3): potential application in the enhancement of wine flavour and heterologous expression of the enzyme[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 888-893.
- [55] 毛颖. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB800N 的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶在人参皂苷水解中的应用[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2020.
MAO Y. Application of α -L-arabinofuranidase from *Bacillus subtilis* WB800N in the hydrolysis of ginsenoside[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2020 (in Chinese).
- [56] 左莎莎. α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和双功能 β -木糖苷酶/ α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因的克隆与表征[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019.
ZUO SS. Cloning and characterization of gene encoding α -L-arabinofuranosidase and bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinopyranosidase[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese).
- [57] MICHLMAYR H, SCHÜMANN C, KULBE KD, del HIERRO AM. Heterologously expressed family 51 alpha-L-arabinofuranosidases from *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus brevis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(4): 1528-1531.