

木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展

Recent Advances in Structures and Relative Enzyme Properties of Xylanase

杨浩萌¹, 姚 斌^{1*}, 范云六²

YANG Hao-Meng¹, YAO Bin^{1*} and FAN Yun-Liu²

1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 木聚糖是一种多聚五碳糖, 是植物细胞中主要的半纤维素成分。木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的水解酶, 它在饲料、造纸、食品、能源工业和环境科学上有着广阔的应用前景。随着分子生物学、结构生物学的发展及蛋白质工程的应用, 对木聚糖酶结构和功能的研究不断深入。这里重点阐述与酶的活性、热稳定性、作用 pH、等电点、底物亲和性及催化效率等重要性质相关的分子结构研究进展, 讨论了其进一步的研究发展方向。研究木聚糖酶结构与功能的关系, 对进一步加深木聚糖酶作用机制的了解、指导木聚糖酶的分子改良有重要意义。

关键词 木聚糖酶, 结构与功能, 催化残基, 热稳定性, pH 性质, 底物亲和性

中图分类号 Q556 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0006-06

Abstract Xylanase can hydrolyze xylans into xylooligosaccharides and D-xylose, and has great prospect for applications in feed industry, paper and pulp industry, food industry and environment science. The study of xylanase had been started in 1960's. With the development and application of the new technologies, such as molecular biology, structural biology and protein engineering, many progresses have been made in the research of structures and functions of xylanase. This paper reviews the research progress and trend in the structure correlating with the important properties of xylanase. Analyses of three-dimensional structures and properties of mutants have revealed that glutamine and aspartic acid residues are involved in the catalytic mechanism. The thermostability of xylanase correlated with many factors, such as disulfide bridges, salt bridges, aromatic interactions, content of arginine and proline, and some multidomain xylanase have thermostability domains in N or C terminal. But no single mechanism is responsible for the remarkable stability of xylanase. The isoelectric points and reaction pH of xylanase are influenced by hydrophobicity and content of electric charges. Many researches had demonstrated that aromatic amino acid, histidine, and tryptophan play an important role in improving enzyme-substrate affinity. The researches of structures and functions of xylanase are of great significance in understanding the catalytic mechanism and directing the improvement of xylanase properties to meet the application requirement.

Key words xylanase, structure and function, catalytic residues, thermostability, pH properties, substrate affinity

Received: July, 13, 2004; Accepted: September, 16, 2004.

This work was supported by Grant from Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863)(No. 2001AA214041).

* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; E-mail: yaubin@public3.bta.net.cn

国家高技术研究与发展计划(863计划)项目资助(No. 2001AA214041)。

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的水解酶。一个木聚糖分子的完全酶解需要几步酶促反应,其中作用于主链的酶有两种: β -1,4-木聚糖酶(1,4- β -D-xylanohydrolase; EC3.1.2.8)和 β -木糖苷酶(1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC3.2.1.37)。一般而言,前者从主链内部作用于木糖苷键,将木聚糖分解成低聚木糖,而后者则作用于低聚木糖的末端,释放出木糖^[1]。对木聚糖酶的研究早在60年代就已开始,已经从不同来源的微生物中分离到大量的不同类型不同性质的木聚糖酶^[2]。木聚糖酶的酶学性质决定了其在应用上的潜力及应用领域,一般要求木聚糖酶有较高的催化效率、较好的抗逆性、较广的pH和温度适应范围等。近年来,大量有关木聚糖酶结构与功能的研究不断展开,一方面加深了对木聚糖酶作用的分子机理的了解,另一方面为通过基因工程和蛋白质工程改良木聚糖酶的性质、研制出符合不同应用领域要求的木聚糖酶产品提供了指导。

1 木聚糖酶的催化残基

为了阐明木聚糖酶的催化机制,鉴定出其氨基酸组成中哪些氨基酸参与酶的催化作用是十分必要的。随着化学修饰诱变和X-ray等技术的广泛应用,这方面的研究已取得了较大的进展。

Elizabeth^[3]等根据木聚糖酶的作用机制可能与同样水解多糖的蛋清溶菌酶的酸碱催化机制相似,推测其催化过程可能涉及酸性氨基酸残基。他对来源于*Bacillus pumilus*的木聚糖酶晶体的三维结构进行分析,发现该酶分子可分为两个结构域,两域之间有一个长3nm宽1.5nm的裂缝,裂缝的大小足以容纳直径1.1nm的木聚糖纤维。因此,木聚糖酶的活性位点很有可能是位于裂缝中的酸性氨基酸。对*Bacillus pumilus*的木聚糖酶的三维结构进行分析并与其他酶进行同源性比较后,选出D21、E93、E128三个酸性氨基酸残基进行定点诱变,证明E93、E128是酶的催化残基。同样发现,来自alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*的木聚糖酶BadX的E94、E184^[4],来自*Geobacillus stearothermophilus*的木聚糖酶XT6的E159、E265^[5],来自*Neocallimastix patriciarum*的木聚糖酶xyn-CD/WT的E117和E210也是酶的催化残基^[6]。这些研究进一步证实了木聚糖酶的催化机制可能是广义的酸碱催化。

McCarthy^[7]等人对来自*Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1的木聚糖酶XynB进行高分辨率(18nm)X-ray同晶置换法衍射实验,证明了XynB是典型的第11族木聚糖酶,由两个 β 折叠片形成底物与酶结合的裂缝,催化残基E90和E180就位于该裂缝中。Larson^[8]用同样的方法证明E165和E253是来自*Erwinia chrysanthemi*的木聚糖酶的催化残基,分别位于 β 折叠股4和7上,它属于第5族糖苷水解酶。Wouters^[9]用X-ray分子置换法证明了来自*Streptomyces* sp. S38.的木聚糖酶Xyl1的E87和E177是酶的催化残基。

Moreau^[10]等人对来源于*Streptomyces lividans*的Xylanase A进行点突变。E128Q和E236Q使酶完全失活,D124N使酶的V_{max}值下降14倍,这表明E128、E236是该酶的活性残基。

D124对酶的催化活性也起一定作用。同实验室的Roberge发现N127D突变酶虽然折叠方式没有发生变化,但与野生型相比,酶活性下降70倍。进一步研究发现,N127对维持两个催化残基的离子状态及产物中间体的稳定起重要作用。

来源于*Streptomyces lividans*的木聚糖酶XlnA有3个组氨酸残基位于酶的活性区,其中H81和H207又是第10组木聚糖酶超家族4/7(两个催化残基位于第4和第7 β -折叠的碳端)的保守氨基酸残基,因此,对H81和H207分别进行了三个点突变H81R/S/Y;H207E/K/R,结合对酶的三级结构的分析,Roberge^[11]指出,6个突变酶的活性都至少下降95%,另外点突变H207K使酶的K_m值提高3倍,其原因可能是H81和H207与催化残基E236以氢键结合,形成电荷网,以保持两个催化残基的离子状态,从而有效地水解木聚糖的 β -1,4-糖苷键。

另外Lee^[12]等用点突变的方法也证明了来自*Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI的木聚糖酶XynA的D537N、D602N、E600Q点突变使酶完全失活,说明它们与酶的催化活性有关。对来自alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1的xylanaseJ的定点突变分析表明,E93、E183、W18、W86、Y84、Y95对酶的催化活性也起重要作用^[13]。

总之,通过木聚糖酶的三维结构的分析,同源性的比较和对突变酶性质的分析表明,木聚糖酶的作用机制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的作用,它们与空间位置相近的其他极性氨基酸残基互作,维持两个催化残基的离子状态及产物中间体的稳定性,保持酶的催化活性^[14]。因此,在利用点突变或其他手段改善酶学性质时,要尽量避免涉及这些保守的氨基酸,以免影响酶的活性。

2 木聚糖酶的热稳定性

大多数木聚糖酶的最适温度在50~60℃之间。迄今为止,只发现20余种细菌和不足10种真菌能产耐热木聚糖酶。嗜热真菌比嗜热细菌产生的木聚糖酶耐热性差,只有*Gloephyllumtrabeum*产生的木聚糖酶最适温度为80℃。而嗜热细菌产生的木聚糖酶的最适温度有的(栖热袍菌属)高达100℃以上。值得注意的是现已发现的耐热木聚糖酶中只有*Thermomonospora fussa*的XynA属于G/11族糖苷水解酶,其它都属于F/10族^[15]。为了使木聚糖酶更好的应用于生产,对木聚糖酶耐热性的研究正不断进行。下面主要从结构上分析影响木聚糖酶热稳定性的可能因素。

2.1 热稳定区(thermostabilizing domain, TSD)

现已发现有22种含有多功能区域的耐热木聚糖酶含有TSD,其中16种的TSD在N末端(3种单一区,12种一前一后和一种含有3个区),5种含有单一C末端热稳定区,只有1种含有中间和N末端TSD。值得注意的是含有N末端TSD的16种木聚糖酶都属于F/10族,而4种含有单一C末端TSD的木聚糖酶为G/11族中温木聚糖酶^[15]。因而有人认为G/11族木聚糖酶本质上更耐热,不像第F/10族木聚糖酶需

要通过折叠方式而使它们相对容易进化为嗜热酶^[16]。

来自 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI 的木聚糖酶 XynA 的 N 端是其热稳定区。对该基因的 5' 端的删除突变表明酶的活性不变, 但热稳定性丧失。由此推测, N 端缺失可能对该酶的二级结构有影响^[12]。

在对来源于 *Thermotoga maritime* 的 XynA 木聚糖酶进行研究时发现, 该酶与 *T. saccharolyticum* B6A-RI 的木聚糖酶 XynA 的 N 端有相似的重复序列, N 端的删除同样使酶的热稳定性急剧下降。因此有人认为这种 N 端的重复有利于蛋白抵抗热变性^[17]。在对支链淀粉酶 (*Clostridium thermolydrosulfuricum* 39E) 的研究中也有相似的报告, 因此, 推测在 N 端引入适当的突变, 可以提高木聚糖酶的热稳定性。

2.2 盐桥 (Salt bridge)

蛋白的酸性或碱性氨基酸侧链在生理环境中是带正电或负电的, 随着蛋白的卷曲折叠, 当正负基团相互接近时, 则通过静电吸引而形成盐桥。盐桥结构对木聚糖酶的热稳定性有一定的作用。

对来自 *Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶的结构与功能进行研究, 在木聚糖酶基因的第 29 位氨基酸处插入 Pro 和 Arg, 发现酶的最适温度由 70℃ 下降到 50℃, 而且在 50℃ 时的酶活力较原酶低, 同时, 在 75℃ 时的半衰期下降 75%。推测第 29 位插入的氨基酸可能破坏了盐桥结构, 使酶失去了正确的三级构象, 从而改变了最适温度及热稳定性^[18]。将来源于 *Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶基因与其他来源于嗜热菌的木聚糖基因相比较发现一些保守的带电荷的氨基酸与盐桥结构的形成有关。Tomazich 和 Klibanov 对耐热的 α -淀粉酶的盐桥结构的分析表明盐桥结构可以使淀粉酶保持紧密和牢固的构象并且使淀粉酶具有耐热性, 证明了盐桥在提高酶的热稳定性方面的作用^[9]。但由于蛋白分子中带电荷基团少, 能接近者更少, 因此在维持蛋白稳定性中, 盐桥的作用是有限的^[20]。

2.3 二硫键 (Disulfide bridge)

在蛋白分子中, 两个在空间上邻近的半胱氨酸可形成二硫键 (在肽链上至少间隔两个氨基酸残基)。二硫键一般出现在 α 螺旋与另一个伸展肽链或末端不规则的 α 螺旋之间, 另外在 β 转角上也常有二硫键, 但很少有二硫键出现在相邻的 β 折叠肽段间或两端都连在 α 螺旋上。二硫键对提高木聚糖酶的热稳定性也有一定的作用。

Wakarchuk^[21] 等在来源于 *B. circulans* 的木聚糖酶中引入不影响其活性的二硫键, 使其耐热性提高了 15℃。但有研究发现, 在分子内或分子间引入二硫桥, 热稳定性虽提高了, 但酶的活性可能会下降。推测是分子间及分子内二硫键可能使酶分子形成二聚体或使酶的结构紧凑, 从而提高酶的热稳定性。但同时由于酶分子结构的改变, 也影响了酶的活性。二硫键对提高木聚糖酶热稳定性及对酶的活性的影响还有待进一步研究。

2.4 芳香族氨基酸

芳香族氨基酸的相互作用对提高酶的疏水性、增强酶和

底物的相互作用, 从而提高酶的热稳定性, 有十分重要的作用。

Jacques georis^[22] 等人为了研究蛋白的耐热性, 将来自 *Streptomyces* sp. S38 的嗜温木聚糖酶 XylI 与来自 *Thermomonospora fusca* 的耐热木聚糖酶 TfxA 进行三级结构的相似性比较。一些存在于 TfxA 中的被认为与耐热性相关的氨基酸残基被用点突变的方法引入 XylI 中, 用以提高 XylI 的耐热性。T11Y 点突变使 XylI 获得了与 TfxA 中 Y9-F14 结构相似的 Y11-Y16 的芳香氨基酸的相互作用机制, 这两个芳香族氨基酸分别位于 XylI 突变酶的第一和第二个 β 折叠上。突变酶的最适温度和 Tm 值都提高了 9℃, 在 57℃ 时, 突变酶的热稳定性是野生型酶的 6 倍。结构分析表明 Y11 和 Y16 的相互作用可以提高酶的氮端的稳定性, Y11、Y16 与 5 个其他残基组成的连续的芳香氨基酸区是木聚糖的结合部位, T11Y 点突变使底物在较高的温度下与酶的结合力提高, 从而提高酶的热稳定性。我们对来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 的高比活木聚糖酶基因 xynB 的研究^[23], 也取得了类似的结果, 通过点突变造成芳香氨基酸的相互作用, 突变酶经过酶学性质的分析, 在 70℃ 处理 10min, 热稳定性比野生型提高了 3 倍。

2.5 蛋白质表面的精氨酸含量

一些研究表明, 某些木聚糖酶的稳定性与其表面的精氨酸含量有关。对于嗜热蛋白, 一般来说, 表面都有较高的精氨酸含量, 而赖氨酸的含量却有所下降。同时, 精氨酸与赖氨酸含量的比值的升高也使木聚糖酶在碱性条件下的酶活提高。其原因可能是精氨酸的胍基基团与其附近的极性基团有很强的相互作用。

Ossi Turunen^[24] 等人使用 Swiss-pdbviewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>) 软件对来自 *Trichoderma reesei* 的第 11 组木聚糖酶 XYN II 的结构进行分析, 并用 PCR 的方法引入突变。第一种突变是在蛋白表面的不同位置替换上了 6 个 Arg, 突变结果表明, 对酶的热稳定性并无太大影响, 但却使酶的最适 pH 范围变窄。当用 5 个 Arg 替换下酶表面的 Ser 和 Thr 时, 酶在 65℃ 的半衰期提高 4~5 倍。酶的最适 pH 也有所提高。因此可知, 在富含碱性氨基酸的木聚糖酶表面引入 Arg, 对改善酶学性质有一定的作用。

2.6 脯氨酸的含量

据统计, 耐热性的蛋白中脯氨酸的含量比耐中温蛋白高 40%~50%, 而嗜冷蛋白中脯氨酸的含量明显低于耐中温蛋白。以脯氨酸代替耐中温蛋白中的某些氨基酸, 其耐热性可能会有所提高。

对来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 的第 49 位氨基酸残基进行随机突变, 并在大肠杆菌 XLI-BLUE 中进行表达, 以 0.15% 的蓝色木聚糖平板筛选转化子, 发现 I49P 突变酶的耐热性提高了 4 倍。这表明特定位点的脯氨酸对木聚糖酶的耐热性有很重要的作用^[25]。

2.7 一些保守的氨基酸

从氨基酸序列相似性判断, 产自 *Streptomyces. liv.* 1326 的

xylanaseA 属于第 10 族木聚糖酶。通过点突变对其保守氨基酸进行研究时发现 R156E 点突变酶的最适温度比未突变酶提高 5℃。来自 *Clostridium thermocellum* (xynE) 和 *Cryptococcus albidus* 的木聚糖酶 156 位也是精氨酸,最适温度为 65℃或稍低。而产自 *Bacillus* sp. C125 及 *Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶的 156 位是 Glu,最适温度是 70℃,与 R156E 突变酶 xylanaseA 的最适温度相同。在 *Thermoascus aurantiacus* 中,木聚糖酶的 156 位是 Ala,最适温度也是 70℃^[26]。因此,我们认为 R156E/A 可能会影响某些第 10 组木聚糖酶的热稳定性。

L. Lo leggio^[27] 等人总结了影响第 10 组木聚糖酶热稳定性的几种因素:①酶的疏水中心的有效包埋。②酶的螺旋结构 N 端存在脯氨酸。③酶的带电侧链与螺旋偶极子的互动。④耐热酶没有太长的环状结构。⑤氢键和盐桥对第 10 组木聚糖酶的热稳定性并不起太大作用。以上结论对运用点突变技术提高第 10 组木聚糖酶的热稳定性有重要的参考价值。

在第 11 组木聚糖酶中,盐桥相对于芳香族氨基酸的相互作用而言,对提高酶的热稳定性影响较弱。同源性比较结果也显示,二硫键的形成对提高第 11 组木聚糖酶的热稳定性没有太大影响^[28]。但特定位点的突变,如: Gly→X; X→Pro 对提高的 11 组木聚糖酶的热稳定性却十分有效。在多种蛋白的保守区以 Val 代替 Leu 或 Ile,在 α-螺旋区以 Ala 代替 Leu 或 Ile 对木聚糖酶的热稳定性也有影响^[22]。研究表明,虽然第 10 组木聚糖酶的热稳定性要高一些,但在造纸工业中,由于酶的分子量较小,第 11 组木聚糖酶更有应用前景。

总之,精氨酸和脯氨酸的含量;蛋白结构中二硫键的引入和盐桥的形成对木聚糖酶的热稳定性都有一定的影响。木聚糖酶的热稳定性还与带电侧链和螺旋偶极子的疏水堆积及芳香族氨基酸有利的相互作用有关。但在具体的酶中,可能只有一种或几种因素在起作用,例如氢键和盐桥对第 10 组木聚糖酶的热稳定性并不起决定性作用^[29-30]。另外,多功能区域的耐热木聚糖酶的 N 端被认为是酶的热稳定区。

3 木聚糖酶的最适作用 pH 和等电点

不同微生物来源的木聚糖酶所能耐受的 pH 值一般是 3~10,最适 pH 值一般为 4~7。不同木聚糖酶的等电点变化范围在 pH 值 3~10 之间。工业上应用的木聚糖酶在 pH 值范围上有不同的要求。例如,在饲料工业中,木聚糖酶作为饲料添加剂要求在酸性的 pH 值范围作用。而在造纸工业中,又要求木聚糖酶在碱性的 pH 值范围作用。所以,对木聚糖酶结构中影响最适 pH 值的因素进行研究有利于木聚糖酶在生产中的应用。

根据第 10 组木聚糖酶超家族 4/7 中序列的同源性, Roberge^[31] 对来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 进行 N127D 点突变,对突变酶的性质研究发现,突变酶的结构没发生任何变化,酶的最适 pH 由 7.1 下降到 6.5。最有趣的是,这个单一点突变使酶的等电点由 5.1 变到 5.5,即改变了整个酶的带电性。进一步研究发现, N127 对催化中间体起稳定

作用并参与氢键网的形成,对两个催化残基维持离子状态起重要作用。

YEW-loom chen^[6] 等人用随机突变的方法研究来自 *Neocallimastix patriciarum* 的木聚糖酶 xyn-CD/WT。先将 xyn-CD/WT 的基因克隆在 pGEX-4T-1 载体上,用 PCR 的方法构建随机突变库,并用含有木聚糖的高 pH 值的平板筛选出耐碱突变株 xyn-09D,再对 xyn-09D 进行随机突变,又筛选出 5 株比 xyn-09D 的耐碱性更好的,再利用定点突变将各突变株的突变位点集中起来,获得含 7 个突变位点 (I97S, K168N, G214V, N164D, S128F, E24VN, V218A) 的突变株 xyn-CD-BFV。实验证明 xyn-CDBFV 比任何一种随机突变酶的耐碱性都高。野生型酶 xyn-CD/WT 的最适 pH 为 6.0,当 pH 为 7.5 时,酶活只余 10%,而在 pH 为 8.5/9.0 时酶活为 0。相比之下,突变株 xyn-CDBFV 的酶活在 pH 为 7.5、8.5、9.0 时的酶活是 pH 为 6.0 时的 60%、45%、25%。进一步研究表明, G214V 及 S128F 和 E24V 提高了酶的疏水性, N164D 使酶的负电性提高了,这些对提高酶的耐碱性都有帮助。K168N 也通过对带正电的赖氨酸的替换,间接提高了酶的负电荷,使酶的耐碱性提高。同时, xyn-CDBFV 突变酶的耐热性也有所提高。

还有人通过对酸性和碱性纤维素酶的氨基酸序列进行比较分析,发现了在碱性纤维素酶中有 8 个保守性氨基酸,其中有丙氨酸,丝氨酸,色氨酸和脯氨酸等。通过基因的定点突变表明,碱性纤维素酶的耐碱性与其分子中的丙氨酸和丝氨酸有关,它们可与活性位点氨基酸形成氢键。由于纤维素酶和木聚糖酶都为聚糖酶,活性中心相似,因而推测其耐碱机理可能也有相似之处。

总之,木聚糖酶的疏水性和负电性的提高,对提高酶的耐碱性可能有一定的作用,还有人推测木聚糖酶耐碱性可能与其分子中的丙氨酸和丝氨酸有关。关于木聚糖酶的最适作用 pH 和等电点与其结构的研究还有待深入。

4 木聚糖酶的底物亲和性

木聚糖酶以可溶或不可溶性木聚糖为底物。但不同的木聚糖酶对底物的要求略有不同。例如:第 10 组木聚糖酶与底物结合需要较少的位点,特异性较低。但 MU-X2 (4-Methylumbelliferyl-β-D-xylobioside) 是第 10 组木聚糖酶的特异性底物。又如第 11 组木聚糖酶对较短的 β-1,4 寡聚糖有较高的亲和性等。

Alain moreau^[32] 等人对来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的 Xylanase A 进行研究,用组氨酸代替保守的催化残基 E128,酶对底物——对硝基 β-D-木二糖苷 (PNP-X2) 的亲合性提高 1000 倍。说明组氨酸对酶与底物的结合有促进作用。但该突变酶的活性却大大下降,可能是由于组氨酸不能作为质子供体来完成酶的催化作用。

Satoshi Kaneko^[33] 等人提出,点突变只能研究某些氨基酸在蛋白中的作用,而对蛋白的较大区域的功能研究无能为力。他们用“基因移动”的方法来研究蛋白的结构与功能之

间的关系。即用所谓的“多肽模块”,它们一般是由 15 个氨基酸组成,能形成紧密球形结构的多肽序列。木聚糖酶 FXYN (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 的模块 10 被来自 *Cellulomonas fimi* 的木聚糖酶 Cex 的模块 10 取代后,突变酶的 K_m 值下降到野生型的 1/10。根据 FXYN 和 Cex 的模块 10 的同源性,对 FXYN 的几个氨基酸进行删除和插入突变,结果表明,当 D133 或 S135 被删除时,酶的动力学性质不变,而当 D133 和 S135 一起被删除时,酶对 PNP-X2 底物的 K_m 由 2.0 mmol/L 下降到 0.6 mmol/L。在此双突变基础上在 140 位插入 Gln 时, K_m 进一步下降到 0.3 mmol/L,而此时突变酶的模块 10 更接近 Cex 的模块 10。进一步研究表明, E128 是 FXYN 的催化残基, N127 是底物的 -1 结合位点, D133 和 S135 的删除及 Q140 的插入影响了 D132 和 Y172 及 R139 的氢键相互作用,使 Y172 更易于识别 PNP-X2 的酚环而与底物结合。由此可知, FXYN 的模块 10 对酶与底物的相互作用有关,并可通过一些氨基酸的改变而改变酶与底物的亲和力。

来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 是第 10 组木聚糖酶中研究较多的酶,其催化区的三级结构已知。经同源性比较,发现了几个保守的芳香族氨基酸,它们位于催化残基附近的底物结合位点。对该酶进行了 W85A/H/F; W266A/H/F; W274A/H/F; Y172A/F/S 点突变研究,结果显示, W85 以氢键同催化残基 E128 及 N127 相连,对酶的催化效率起重要作用。W85 的三个突变型酶的活性都下降 70%, W85F 突变没有改变酶与底物的亲和性,而 W85A/H 与底物的亲和性下降,说明芳香族氨基酸对底物结合的重要作用。W85A/H/F 使酶在无底物时 60℃ 的半衰期下降,说明 W85 对酶的热稳定性起作用。用非芳香族氨基酸对 Y172 进行替换,酶与底物的亲和性下降,底物的结合又会影响酶的热稳定性,而使酶的热稳定性下降。总之, W85, Y172, W274, W266 是酶与底物结合相关的残基,并且影响酶的热稳定性。而 W266 对酶的催化效率也有影响^[34]。

Moreau^[10] 等证明用带负电的 Asp 代替 *S. lividans* 木聚糖酶中的 A173 可以显著改变木聚糖酶的转糖基作用。利用定点突变的方法,证明了 Tyr 和 Trp 残基位于该酶与底物的结合位点。

总之,多种研究表明,芳香族氨基酸和杂环族氨基酸在酶与底物结合中起重要的作用,是底物的结合位点。利用点突变的技术可以在一定程度上改善酶的底物特异性和催化效率,使酶更好地应用于生产。

5 结论与展望

木聚糖酶可以广泛应用于饲料工业、食品工业、纸浆工业、能源工业等众多领域,充分显示出它在生产上的巨大潜力^[35]。有望在生产实践中应用的木聚糖酶必须具备优良性质,如高比活性^[36]的酶可降低应用成本,抗逆性强的酶具有更好的贮存和应用稳定性等。而在不同领域中应用的木聚糖酶还需具备一些特殊的性质。例如,在饲料中添加的木聚糖酶必须同时具备在酸性到中性的条件下均能维持高

活性以利于在动物的整个消化道内起作用;能耐饲料加工的高温,同时在正常动物体温下具有高活性;抗动物消化道内的蛋白酶降解等综合特性^[37-38]。又如在纸浆工业中应用的木聚糖酶,应具有在强碱条件下具有高活性、热稳定性、抗各种化合物和各种离子等特性^[39]。由于在不同领域中应用的木聚糖酶需具有不同的综合性质,而天然酶往往难以满足,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,从而发挥其应用潜力。

虽然到目前为止已对木聚糖酶的结构与功能进行了大量的研究,在分子水平上对与各种酶学性质相关的结构有了一定的了解,也通过蛋白质工程创造出一些性质有所改良的工程酶,但还不能形成一套普遍适用的、完整的、确定的理论方法来指导特定木聚糖酶的定向改良。随着基因突变技术和蛋白质高级结构研究技术的发展,大量性质各异的木聚糖酶,尤其是在极端微生物中获得的具有极端性质的木聚糖酶,有望使木聚糖酶的结构与功能研究取得突破性进展。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Prade BA. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 101 - 131
- [2] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993, 293 (Pt 3): 781 - 788
- [3] Ko EP, Akatsuka H, Moriyama H *et al*. Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*. *Biochem J*, 1992, 288: 117 - 121
- [4] Poon DK, Webster P, Withers SG *et al*. Characterizing the pH-dependent stability and catalytic mechanism of the family 11 xylanase from the alkalophilic *Bacillus agaradhaerens*. *Carbohydr Res*, 2003, 338(5): 415 - 421
- [5] Teplitsky A, Mechaly A, Stojanoff V *et al*. Structure determination of the extracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* by selenomethionyl MAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 5): 836 - 48
- [6] Chen YL, Tang TY, Cheng KJ. Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Can J Microbiol*, 2001, 47: 1088 - 1094
- [7] McCarthy AA, Morris DD, Bergquist PL *et al*. Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* R146B.1, at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000, 56 (Pt 11): 1367 - 1375
- [8] Larson SB, Day J, Barba de la Rosa AP *et al*. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis. *Biochemistry*, 2003, 42(28): 8411 - 8422
- [9] Wouters J, Georis J, Engler D *et al*. Crystallographic analysis of family 11 endo-beta-1,4-xylanase Xyl1 from *Streptomyces* sp. S3-8. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57 (Pt 12): 1813 - 1819
- [10] Moreau A, Roberge M, Manin C *et al*. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Biochem J*, 1994, 302: 291 - 295

- [11] Roberge M, Shareck F, Morosoli R *et al.* Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase. *Biochemistry*, 1997, **36**(25):7769 - 7775
- [12] Lee YE, Lowe SE, Henrissat B *et al.* Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *J Bacteriol*, 1993, **175**(18): 5890 - 5898
- [13] Nakamura S, Nakai R, Namba K *et al.* Structure-function relationship of the xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1995, (34):99 - 100
- [14] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **23**(4):411 - 456
- [15] Jiang ZQ (江正强), Li LT (李里特), Li Y (李颖). Research progress in the thermostable Xylanase. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2003, (8):47 - 51
- [16] Hu YH (胡沂淮), Shao WL (邵蔚蓝). Xylanase. *Chemistry of Life* (生命的化学), 2002, **12**(3):281 - 285
- [17] Winterhalter C, Hinrich P, Candusso A *et al.* Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol*, 1995, **15**(3):431 - 444
- [18] Luthi E, Reif K, Jasmat NB *et al.* *In vitro* mutagenesis of a xylanase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**: 503 - 506
- [19] Tomazic SJ, Klibanov AM. Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? *J Biol Chem*, 1988, **263**(7):3092 - 3096
- [20] Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL *et al.* Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci*, 1994, **3**(3):467 - 475
- [21] Wakarchuk WW, Sung WL, Campbell RL *et al.* Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Engineering*, 1994, **7**(11): 1379 - 1386
- [22] Georis J, De Lemos, Esteres F *et al.* An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Science*, 2000, **9**:466 - 475
- [23] Zhang HL, Yao B, Wang YR *et al.* Characterization, gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(8):761 - 765
- [24] Turunen O, Vuorio M, Fenel F *et al.* Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Engineering*, 2002, **15**(2):141 - 145
- [25] Ebanks R, Dupont M, Shareck F *et al.* Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, **25**: 310 - 314
- [26] Moreau A, Shareck F, Kluepfel D *et al.* Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-specific mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**(5):420 - 424
- [27] Lo Leggio L, Kalogiannis S, Bhat MK *et al.* High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta) alpha-barrel architecture. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 1999, **36**:295 - 306
- [28] Sapag A, Wonters J, Lambert C *et al.* The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J Biotechnol*, 2002, **95**(2):109 - 131
- [29] Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, 2000, **13**(3):179 - 191
- [30] Lehmann M, Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **12**(4):371 - 375
- [31] Roberge M, Dupont C., Morosoli R *et al.* Asparagine-127 of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a key residue in glycosyl hydrolases of superfamily 4/7: kinetic evidence for its involvement in stabilization of the catalytic intermediate. *Protein Engineering*, 1997, **10**(4): 399 - 403
- [32] Kuno A, Shimizu D, Kaneko S *et al.* Significant enhancement in the binding of p-nitrophenyl-beta-D-xylobioside by the E128H mutant F/10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *FEBS Lett*, 1999, **450**(3):299 - 305
- [33] Kaneko S, Kuno A, Fujimoto Z *et al.* An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the Cex of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, 1999, **460**(1):61 - 66
- [34] Roberge M, Shareck F, Morosoli R *et al.* Characterization of active site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Protein Eng*, 1999, **12**(3):251 - 257
- [35] Zhang HL (张红莲), Yao B (姚斌), Fan YL (范云六). Molecular Biology and Applications of xylanase. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2003, **3**:23 - 30
- [36] He YZ (何永志), Yao B (姚斌), Wang YR (王亚茹) *et al.* Overexpression of *Streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity and analysis of enzymic properties. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2004, **44**(3):340 - 344
- [37] Huang DF (黄大昉), Lin M (林敏). Genic Engineering of Agricultural Microorganism (农业微生物基因工程). Beijing: Science Press (科学出版社), 2001
- [38] Fang LY (方洛云), Zou XT (邹晓庭), Xu ZR (许梓荣). Molecular Biology and Gene Engineering of Xylanase Genes. *China Feed* (中国饲料), 2002, **13**(7):11 - 13
- [39] Xie XM (谢响明), He XQ (何晓青). Research development of microbial xylanases and their use for biobleaching. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), 2003, **25**(3):111 - 116