

黑曲霉 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的重组表达与木糖耐受性表征

李乐¹, 彭程¹, 于坤朋¹, 唐艺玲¹, 林燕玲¹, 李利君^{1,2,3,4*}, 倪辉^{1,2,4,5}, 李清彪^{1,2,3}

- 1 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021
- 2 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021
- 3 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021
- 4 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034
- 5 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361100

李乐, 彭程, 于坤朋, 唐艺玲, 林燕玲, 李利君, 倪辉, 李清彪. 黑曲霉 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的重组表达与木糖耐受性表征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4593-4607.

LI Le, PENG Cheng, YU Kunpeng, TANG Yiling, LIN Yanling, LI Lijun, NI Hui, LI Qingbiao. Expression of β -xylosidase *An-xyl* from *Aspergillus niger* and characterization of its xylose tolerance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4593-4607.

摘要: β -木糖苷酶催化低聚木糖水解在木质纤维素降解中起重要作用, 但该酶活性易被产物木糖抑制, 严重限制了其应用。基于分子对接, 本文研究了茶梗发酵培养基差异表达显著的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的亲合性, 并对其进行了克隆表达和性质表征, 进一步探讨了该酶与纤维素酶对茶梗中木质纤维素的降解作用。分子对接结果表明, *An-xyl* 与木糖的亲合性低于木糖耐受性较差的米曲霉 β -木糖苷酶 *xylA*。重组表达的 *An-xyl* 木糖抑制常数 K_i 值为 433.2 mmol/L, 与同为 GH3 家族的 β -木糖苷酶相比木糖耐受性较高。以 *p*NPX 为底物时, K_m 和 V_{max} 分别为 3.6 mmol/L 和 10 000 μ mol/(min·mL)。 *An-xyl* 最适温度 65 °C, 最适 pH 4.0, 65 °C 处理 300 min 能保持约 61% 的酶活力, 在 pH 2.0–8.0 的范围内处理 24 h 后酶活力仍能维持 80% 左右。添加 *An-xyl* 与纤维素酶共同水解茶梗, 反应 2 h 和 4 h 产生还原糖含量比单独使用纤维素酶水解分别提高了 19.3% 和 38.6%。本研究表明, 通过差异表达挖掘的 *An-xyl* 具有高木糖耐受性和较好的催化活性和稳定性, 可协同作用水解茶梗类木质纤维素, 丰富了具有高木糖耐受性 β -木糖苷酶的资源, 为其应用提供了实验依据。

关键词: 黑曲霉; β -木糖苷酶; 木糖耐受性; 茶梗; 木质纤维素

资助项目: 国家自然科学基金(31871765); 福建省科技经济融合服务平台(B21022)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871765) and the Fujian Provincial Science and Technology Economic Integration Service Platform (B21022).

*Corresponding author. E-mail: ljli@jmu.edu.cn

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-06-28; Published online: 2023-11-01

Expression of β -xylosidase *An-xyl* from *Aspergillus niger* and characterization of its xylose tolerance

LI Le¹, PENG Cheng¹, YU Kunpeng¹, TANG Yiling¹, LIN Yanling¹, LI Lijun^{1,2,3,4*}, NI Hui^{1,2,4,5}, LI Qingbiao^{1,2,3}

1 College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Engineering, Xiamen 361021, Fujian, China

3 Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, Fujian, China

4 Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning, China

5 Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, Fujian, China

Abstract: The hydrolysis of xylo-oligosaccharides catalyzed by β -xylosidase plays an important role in the degradation of lignocellulose. However, the enzyme is easily inhibited by its catalytic product xylose, which severely limits its application. Based on molecular docking, this paper studied the xylose affinity of *Aspergillus niger* β -xylosidase *An-xyl*, which was significantly differentially expressed in the fermentation medium of tea stalks, through cloning, expression and characterization. The synergistic degradation effect of this enzyme and cellulase on lignocellulose in tea stems was investigated. Molecular docking showed that the affinity of *An-xyl* to xylose was lower than that of *Aspergillus oryzae* β -xylosidase with poor xylose tolerance. The K_i value of xylose inhibition constant of recombinant-expressed *An-xyl* was 433.2 mmol/L, higher than that of most β -xylosidases of the GH3 family. The K_m and V_{max} towards *p*NPX were 3.6 mmol/L and 10 000 μ mol/(min·mL), respectively. The optimum temperature of *An-xyl* was 65 °C, the optimum pH was 4.0, 61% of the *An-xyl* activity could be retained upon treatment at 65 °C for 300 min, and 80% of the *An-xyl* activity could be retained upon treatment at pH 2.0–8.0 for 24 h. The hydrolysis of tea stem by *An-xyl* and cellulase produced 19.3% and 38.6% higher reducing sugar content at 2 h and 4 h, respectively, than that of using cellulase alone. This study showed that the *An-xyl* mined from differential expression exhibited high xylose tolerance and higher catalytic activity and stability, and could hydrolyze tea stem lignocellulose synergistically, which enriched the resource of β -xylosidase with high xylose tolerance, thus may facilitate the advanced experimental research and its application.

Keywords: *Aspergillus niger*; β -xylosidase; xylose tolerance; tea stem; lignocellulose

木质纤维素类是自然界丰富的生物质,具有来源广泛、价格低廉和可再生等优点,是生物燃料重要的可持续利用原料^[1]。木质纤维素的3种主要成分为纤维素、半纤维素和木质素,不同来源如农业废弃物、森林树木等的木质纤维素原料各成分含量不同^[2-3]。由于木质纤维素复杂且稳定的聚合物结构,在利用过程中需要经过预处理,

然后使用多种具有不同水解特性的酶如漆酶、葡聚糖酶、 β -D-葡萄糖苷酶、木聚糖酶和 β -木糖苷酶等协同催化降解生成单糖^[4]。木聚糖酶和 β -木糖苷酶是水解半纤维素中主要成分木聚糖的酶类,木聚糖酶可将木聚糖水解为木寡糖和木二糖等低聚木糖, β -木糖苷酶则进一步将低聚木糖水解为木糖^[5]。然而,低聚木糖会抑制木聚

糖酶水解活性^[6], 并对纤维素的水解过程也有很强的抑制作用^[7]。因此, 在木质纤维素的水解过程中, β -木糖苷酶能水解低聚木糖, 对提高水解效率起着重要作用。

β -木糖苷酶属于糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH), 根据碳水化合物活性酶数据库(<http://www.cazy.org/>)分类, 绝大多数 β -木糖苷酶属于 GH3、GH39、GH43、GH52 和 GH54 家族, 它们在细菌、真菌以及高等植物体内均有分布, 被广泛应用于食品、化学和燃料工业^[8-10]。实践应用发现, 已表征的大部分 β -木糖苷酶对产物木糖有着很强的亲和力, 水解过程中随着木糖含量的增加, 酶的活性逐渐被抑制, 如来源于埃默森菌篮状菌(*Talaromyces emersonii*)的 β -木糖苷酶木糖耐受性差, 1.3 mmol/L 的木糖浓度就可抑制其 50% 的酶活力^[11-12]。 β -木糖苷酶易受产物反馈抑制的特征, 不利于其在木质纤维素生物转化上的应用。因此, 挖掘具有高木糖耐受性的 β -木糖苷酶在木质纤维素类转化应用方面有着重要意义。

中国是世界上主要的茶叶生产国, 2022 年中国茶叶产量高达 335 万 t, 茶叶加工过程中挑出的茶梗约占毛重比例的 20%^[13]。茶梗的纤维素、木质素和半纤维素含量分别为 35.01%、20.45% 和 28.01%^[14], 是一种具有应用潜力的木质纤维素原料。实验室前期对黑曲霉(*Aspergillus niger*)在茶梗和未添加茶梗的察氏培养基上发酵产生的胞外酶液进行了定量蛋白组学分析, 发现 β -木糖苷酶 *An-xyl* 在有茶梗培养条件下蛋白的差异倍数为察氏培养基的 124.18 倍^[15]。为了深入探讨该酶是否具有较好的木糖耐受性, 本研究首先利用分子对接方法对比分析了 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的亲和力, 发现该酶与木糖的亲和力较低, 推测其耐受木糖能力较好; 接着利用基因工程手段对该酶进行了克隆、表达和性质表

征, 研究了其与纤维素酶协同水解茶梗木质纤维素的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、含 pPIC9K 载体的 *E. coli* DH5 α 和毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 菌株由福建省食品微生物与酶工程重点实验室保藏。含 *A. niger* β -木糖苷酶目的基因重组质粒 pUC57-*An-xyl*-Kan 的 *E. coli* DH5 α 菌株由苏州金唯智生物科技有限公司合成。对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*NPX)、对硝基苯基- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(*p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside, *p*NPA)、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *p*NPGal)、玉米芯木聚糖、甘蔗渣木聚糖、山毛榉木木聚糖和纤维素酶购于上海源叶生物有限公司。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- α -D-甘露糖苷(*p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside, *p*NPM)购自 Sigma 公司。

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Eco*R I、限制性内切酶 *Not* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶和高效感受态细胞制备试剂盒购于 TaKaRa (大连)有限公司。限制性内切酶 *Pme* I 购于 NEB 公司。*Easy Taq* Mix、*Easy* II Protein Quantitative Kit 购于北京全式金生物技术有限公司。质粒小提试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 仪器和设备

Biometra TAdvanced 基因扩增仪(耶拿分析仪器有限公司), 1652100 电穿孔仪(Bio-Rad 有限公司), AI600 凝胶成像仪(GE 公司), SW-CJ-2FD 双人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司),

Avanti J-26S XP 立式高速冷冻离心机(Beckman 公司), Epoch 2 T 酶标仪(伯腾仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和木糖亲和性分析

在 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>) 获取 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和 β -木糖苷酶 *xylA* 的氨基酸序列, 下载 AlphaFold 预测的蛋白结构模型, 登录号分别为 A0A100I443 和 Q2UR38。利用 UniProt 的 BLAST 程序进行同源性比对。产物木糖和底物 *pNPX* 经 ChemBio Office 2016 处理, 使用 AutoDock Vina 进行半柔性对接。木糖与 β -木糖苷酶 *An-xyl* 对接, 设置对接盒子大小为 $(20 \times 20 \times 20) \text{ \AA}^3$, 对接盒子中心为 $(11.339, -10.443, 7, 1.533)$; 木糖与 β -木糖苷酶 *xylA* 对接, 设置对接盒子大小为 $(24 \times 22 \times 24) \text{ \AA}^3$, 对接盒子中心为 $(6.434, -7.707, 1.929)$; 底物 *pNPX* 与 β -木糖苷酶 *An-xyl* 对接, 设置对接盒子大小为 $(24 \times 24 \times 24) \text{ \AA}^3$, 对接盒子中心为 $(7.721, -4.443, -0.774)$ 。使用 Discovery Studio 2021 和 Pymol 进行可视化分析。

1.3.2 β -木糖苷酶 *An-xyl* 基因的重组质粒构建

分析基因序列, 设计引物 *An-xyl-F* (5'-CCGGAATTCCAGGCCAACACCAGCTATG-3') 和 *An-xyl-R* (5'-ATTTGCGGCCGCCTCCTCCCTCCCCGGCC-3'), 划线部分为酶切位点 *EcoR I* 和 *Not I*。以 *pUC57-An-xyl-Kan* 质粒为模板, PCR 扩增目的基因, 酶切后连接至 *pPIC9K* 载体, 热激法转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 并筛选阳性克隆子, 测序正确的重组质粒命名为 *pPIC9K-An-xyl*。引物合成和 DNA 测序由铂尚生物技术(上海)有限公司完成。

1.3.3 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的诱导表达、纯化及质谱鉴定

提取重组质粒 *pPIC9K-An-xyl* 并使用限制性内切酶 *Pme I* 将其线性化, 然后电转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 筛选后接种至 BMGY

培养基培养, OD_{600} 达到 1.3–1.5 后, 收集菌体沉淀转接入 BMMY 培养基中, 每隔 24 h 按 0.5% (体积分数) 的比例添加甲醇诱导表达, 7 d 后将菌液冷冻离心, 收集上清待用。通过温育、超滤、弱阴离子交换层析和凝胶过滤层析等方法, 对重组 β -木糖苷酶 *An-xyl* 进行纯化。使用 SDS-PAGE 对蛋白样品进行电泳分析。使用全式金生物的 *Easy II Protein Quantitative Kit* 测定蛋白浓度。切下 SDS-PAGE 中的目的蛋白条带, 由上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定分析。

1.3.4 β -木糖苷酶 *An-xyl* 酶活力的测定

以 *pNPX* 为底物, 取 50 μL 酶液和 100 μL 的 *pNPX* 底物缓冲液, 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 加入 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液 1 mL, 终止反应, 取 200 μL 反应液测定其在 410 nm 下的吸光度。酶活力单位(IU)定义为在最适条件下, 每分钟生成 1 μmol 的 *pNP* 所需的酶量。

1.3.5 木糖对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的影响

将木糖添加至酶活力测定反应体系中, 木糖终浓度为 0–500 mmol/L, 在最适条件下测定酶活力, 研究 β -木糖苷酶 *An-xyl* 对木糖的耐受性, 以未加木糖的酶活力为 100%, 计算其相对酶活力和木糖抑制常数 K_i 值。木糖抑制常数 K_i 值定义为抑制 β -木糖苷酶 50% 酶活力所需的木糖浓度。

1.3.6 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的底物偏好性和动力学参数

配制 2 mmol/L 或 0.2% 的 *pNPG*、*pNPGal*、*pNPM*、*pNPX*、*pNPA*、玉米芯木聚糖、甘蔗渣木聚糖和山毛榉木木聚糖等底物溶液, 测定重组酶 β -木糖苷酶 *An-xyl* 在不同底物溶液中的酶活力来研究该酶的底物偏好性。

在最适条件下, 测定重组 β -木糖苷酶 *An-xyl* 于不同浓度(1–10 mmol/L) *pNPX* 中的酶活力, 通过 Lineweaver-Burk plot 法, 计算 K_m 值和 V_{max} 值。

1.3.7 温度和 pH 对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的影响

按照酶活力的测定方法测定 β -木糖苷酶 *An-xyl* 40–80 °C 的酶活力；以最高酶活力为 100%，计算相对酶活力。在 65 °C 条件下孵育，间隔固定时间取 50 μ L 酶液测定其酶活力；以未进行孵育处理的酶活力为 100%，计算相对酶活力。

使用不同 pH 的缓冲液配制 2 mmol/L *p*NPX 底物溶液，分别为 50 mmol/L 的 Gly-HCl (pH 2.0–3.0)、柠檬酸-柠檬酸钠(pH 3.0–6.0)、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl (pH 8.0–9.0)和甘氨酸-NaOH (pH 9.0–10.0)。测定 β -木糖苷酶 *An-xyl* 在上述不同 pH 条件下的酶活力；以最高酶活力为 100%，计算相对酶活力。在不同 pH 条件下，酶液在 4 °C 下放置 24 h，测定残余酶活力；以未处理的酶活力为 100%，计算相对酶活力。

1.3.8 抑制剂和表面活性剂对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的影响

在酶液中分别添加终浓度为 1 mmol/L 或 10 mmol/L 的抑制剂[十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、尿素 (urea)和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)]和 1%或 10% (质量分数或质量体积分数)表面活性剂(Tween-20、Tween-80 和 Triton X-100)，在 4 °C 下处理 24 h，于最适条件下测定酶活力，以未添加抑制剂或去垢剂的酶活力为 100%，计算相对酶活力。

1.3.9 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和纤维素酶对茶梗木质纤维素的降解

将茶梗样品粉碎，按 10% (质量体积分数)比例添加 1% (质量体积分数)氢氧化钠，120 °C 高压灭菌 1 h，纱布过滤并用蒸馏水多次洗涤，40 °C 干燥至重量恒定。反应体系添加 0.25 g 预处理样品，50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)补充反应体系终体积至 50 mL。设 3 个处理组：

(1) 添加 20 U 纤维素酶；(2) 添加 20 U β -木糖苷酶 *An-xyl*；(3) 同时添加纤维素酶和 β -木糖苷酶 *An-xyl* 各 20 U；对照组不加酶。在 200 r/min、50 °C 条件下分别反应 2 h 和 4 h，取样加热至 100 °C 使酶失活，12 000 r/min 离心 5 min，DNS 法测定还原糖含量。

1.4 数据分析和统计

所有实验重复 3 次，使用 Excel 和 Origin 软件处理数据并制作图表。

2 结果与分析

2.1 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和木糖亲和性分析

研究发现米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源 β -木糖苷酶 *xylA* 的木糖耐受能力较差，木糖抑制常数 K_i 值仅为 2.7 mmol/L^[16]。根据 UniProt 数据库可知， β -木糖苷酶 *An-xyl* 和 β -木糖苷酶 *xylA* 都属于 GH3 家族，二者氨基酸序列同源性为 64.3%。为进一步探究 2 种 β -木糖苷酶与木糖的亲合性差异，将 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和 β -木糖苷酶 *xylA* 模拟结构分别与木糖分子对接 100 次，遵循构象合理、对接结合自由能较低的标准，选择最佳的对接构象。 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的对接结果如图 1A 所示， β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖分子对接的结合自由能为-3.7 kcal/mol。分子对接的结合自由能计算值的绝对值越高，木糖与 β -木糖苷酶结合的亲和力越高^[17]。分析木糖与 β -木糖苷酶 *An-xyl* 复合物结构和作用力(图 1B、1C)， β -木糖苷酶 *An-xyl* 共有 7 个氨基酸与木糖形成相互作用力，Asp121 与木糖分子 2 号位上的羟基形成一组氢键，距离为 3.1 Å；Tyr464 的苯环与木糖分子 2 号位的 C 原子的取代基形成 pi-sigma 的相互作用，距离为 3.6 Å；Glu115、Arg122、Asn463、Tyr465 和 Glu527 与木糖分子形成范德华力。 β -木糖苷酶 *xylA* 与木糖的对接结果如图 2A 所示， β -木糖苷酶 *xylA* 与木糖对接的结合自由能为-4.1 kcal/mol，

共有 11 个氨基酸与木糖形成相互作用力(图 2B、2C)，其中，Tyr276 苯环对位上羟基的氧原子与木糖分子 4 号位羟基上的氢原子形成氢键，距离为 3.1 Å；Tyr452 苯环对位上羟基的氧原子、Glu516 侧链上的氧原子与木糖分子 2 号位羟基上氢原子形成 2 组氢键，距离均为 2.9 Å；其余氨基酸与木糖形成范德华力。结果表明，与 β -木糖苷酶 xylA 相比， β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的亲合力以及二者间相互作用力较弱，因此，推测 β -木糖苷酶 *An-xyl* 可能具有较好的木糖耐受能力。

进一步将 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与 *pNPX* 进行分子对接(图 3A)。 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与 *pNPX*

分子对接的结合自由能为 -5.7 kcal/mol， β -木糖苷酶 *An-xyl* 共有 13 个氨基酸与 *pNPX* 形成相互作用力(图 3B)，Arg245 与 *pNPX* 中木糖基吡喃糖环上的氧原子形成 1 组氢键，距离为 3.6 Å；Glu527 与木糖基 2 号位上的羟基形成 1 组氢键，距离为 3.1 Å；Glu527 与 *pNPX* 中苯环结构形成 pi-阴离子相互作用，距离为 4.1 Å；Asn40、Pro41、Leu43、Trp113、Arg122、Tyr281、Cys316、Asn463、Tyr464、Asn522 和 Ala526 与 *pNPX* 形成了范德华力(图 3C)。同 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的分子对接结果相比，*pNPX* 与氨基酸间相互作用力较强，体现出较好的亲合力。

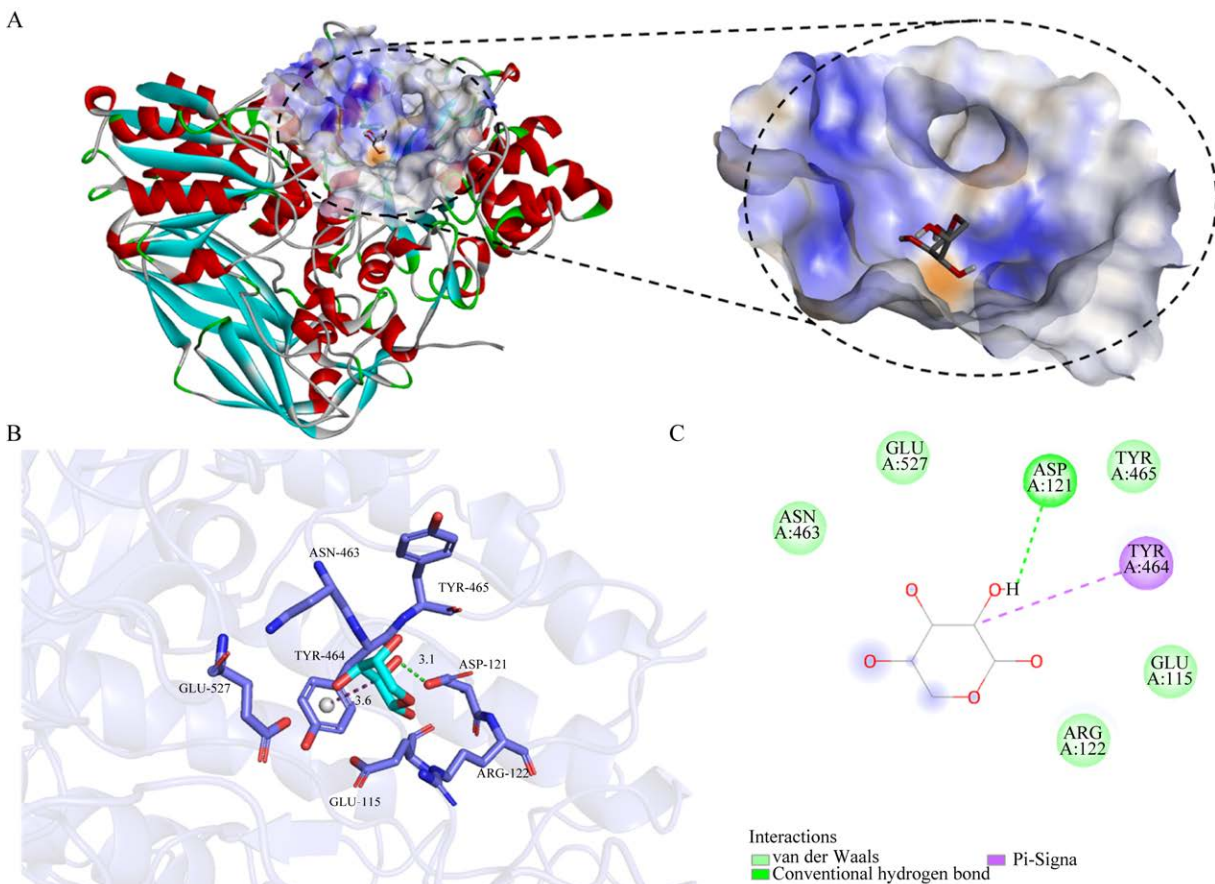


图 1 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的分子对接效果图(A)和相互作用力图(B、C)

Figure 1 The docking effect diagram (A) and interaction force diagram (B, C) of β -xylosidase *An-xyl* and xylose.

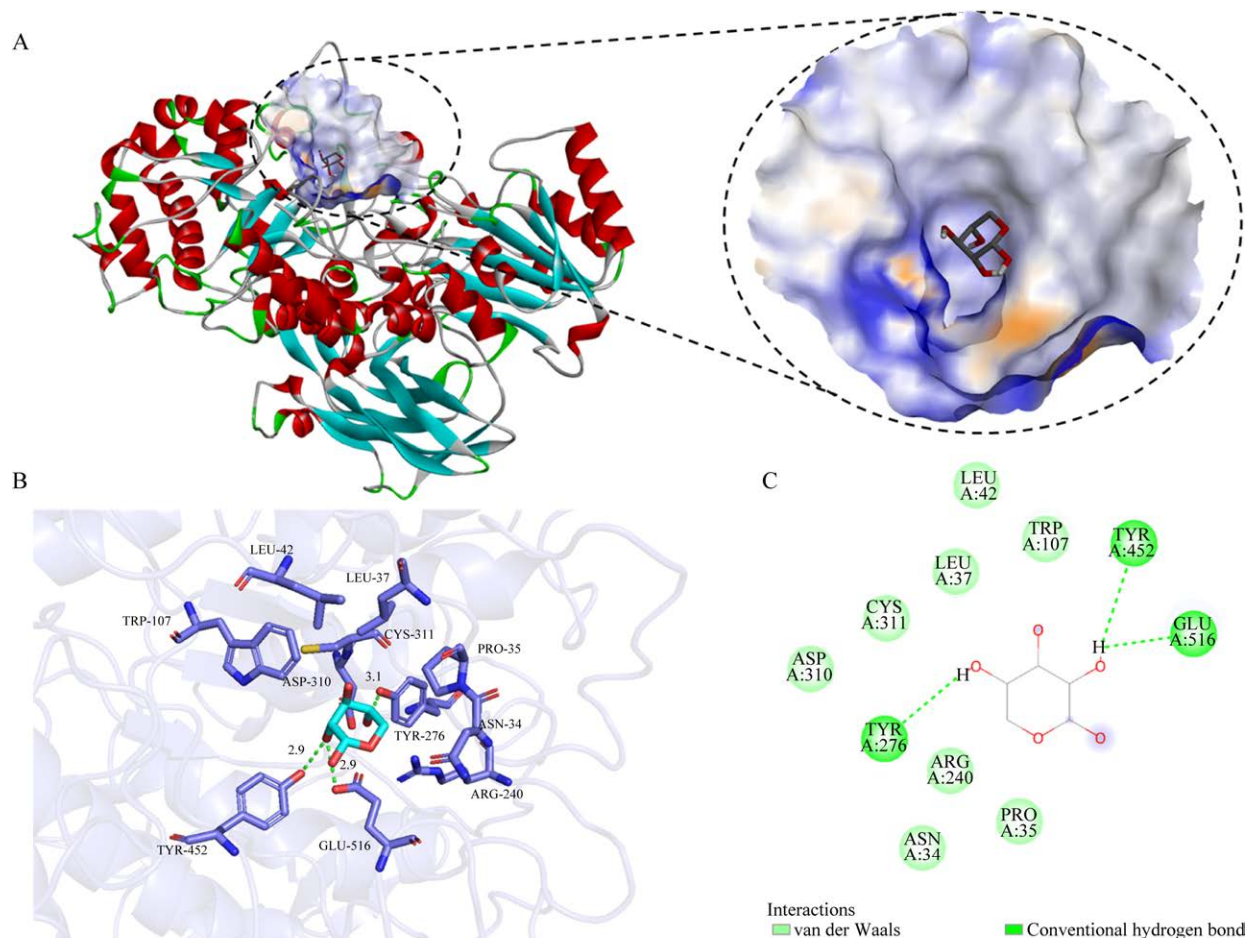


图2 β -木糖苷酶 *xylA* 与木糖的分子对接效果图(A)和相互作用力图(B、C)

Figure 2 The docking effect diagram (A) and interaction force diagram (B, C) of β -xylosidase *xylA* and xylose.

2.2 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的诱导表达、纯化及质谱鉴定

通过毕赤酵母异源表达 β -木糖苷酶 *An-xyl* 并进行分离纯化, SDS-PAGE 分析结果如图 4A 所示, 条带单一, 大小在 120–150 kDa 之间, 比理论值 87.313 kDa 大, 可能是毕赤酵母表达系统对重组 β -木糖苷酶糖基化修饰造成。由 SDS-PAGE 中切出相应条带, 进行胰蛋白酶水解后, 使用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 鉴定分

析, 数据分析结果如图 4B 所示, 结果表明, 表达纯化得到的重组蛋白为 *A. niger* 木糖苷酶 *An-xyl*。

2.3 木糖对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的影响

测定 β -木糖苷酶 *An-xyl* 在不同浓度(0–500 mmol/L)木糖存在时的酶活力, 结果如图 5 所示, 低浓度(<50 mmol/L)的木糖存在时对酶活力有促进作用, 随着浓度进一步升高, 开始产生抑制作用, 当存在 400 mmol/L 和 450 mmol/L 的木糖时, 分别能保持约 58.3% 和 47.5% 的酶活力,

计算木糖抑制常数 K_i 为 433.2 mmol/L。

2.4 β -木糖苷酶 *An-xyI* 的底物偏好性和动力学参数

如表 1 所示, β -木糖苷酶 *An-xyI* 对 *pNPX* 有水解活性, 同时对 *pNPG* 也有一定的水解活性, 但相对酶活力仅为 8.7%, 对 *pNPGal*、*pNPM* 和 *pNPA* 等人工底物无水解活性。 β -木糖苷酶 *An-xyI* 对山毛榉木木聚糖、玉米芯木聚糖和甘蔗渣木聚糖等天然聚糖类底物具有轻微活性(相对酶活力低于 0.5%)。在不同浓度的底物 *pNPX* (1–10 mmol/L) 溶液中, 测定 β -木糖苷酶 *An-xyI* 的酶活力, 计算酶促反应参数 K_m 值和 V_{max} 值分别为

3.6 mmol/L 和 10 000 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。

2.5 温度和 pH 对 β -木糖苷酶 *An-xyI* 酶活力的影响

测定了 β -木糖苷酶 *An-xyI* 在 40–80 °C 条件下的酶活力(图 6A), 其在 40–80 °C 范围内均有活性, 最适反应温度为 65 °C, 在 70 °C 时仍有 90% 以上的酶活力。在 65 °C 处理 300 min 后, 残余酶活力约为 61% (图 6B)。在 pH 2.0–10.0 条件下, 随着 pH 值的升高, β -木糖苷酶 *An-xyI* 酶活力呈现先上升后下降的趋势, 最适 pH 为 4.0 (图 6C), 在较宽的 pH 范围内(pH 2.0–8.0)的缓冲液中处理 24 h 后仍保持约 80% 的酶活力(图 6D)。

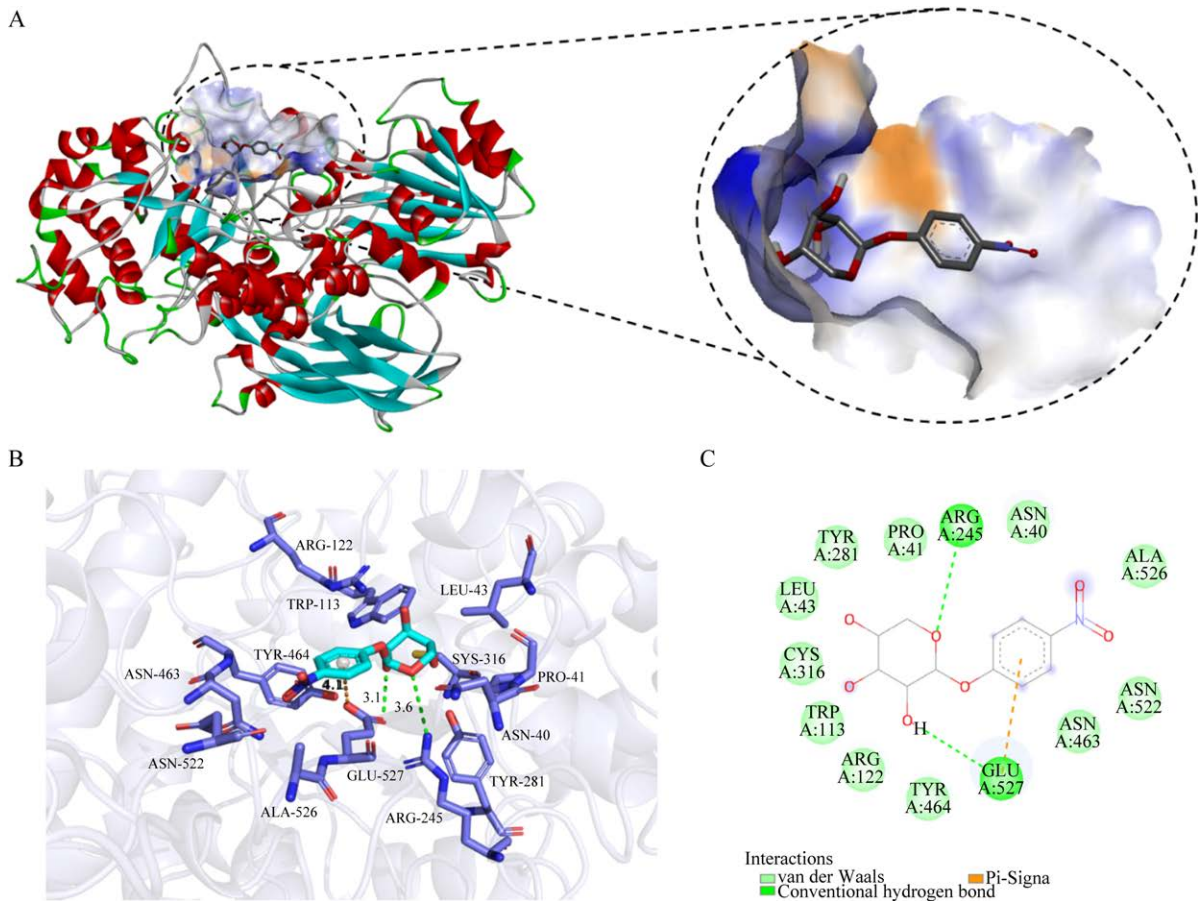


图 3 β -木糖苷酶 *An-xyI* 与 *pNPX* 的分子对接效果图(A)和相互作用力图(B、C)

Figure 3 The docking effect diagram (A) and interaction force diagram (B, C) of β -xylosidase *An-xyI* and *pNPX*.

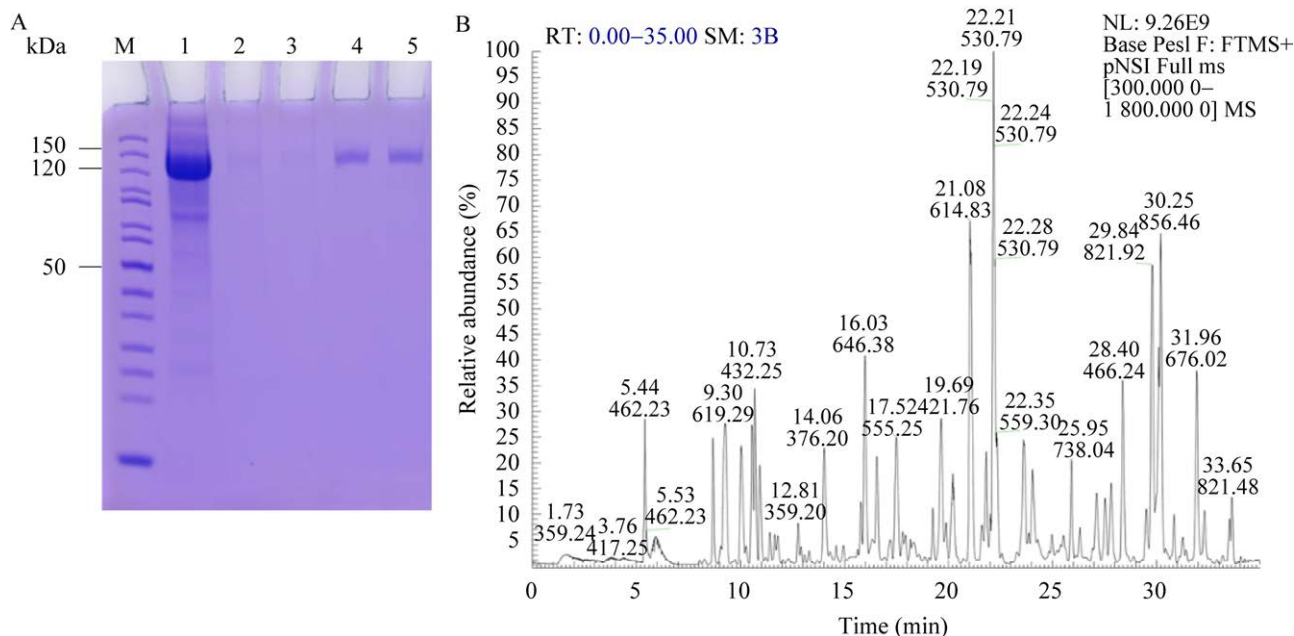


图4 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的 SDS-PAGE 分析(A)和 LC-MS/MS 鉴定结果(B) A: β -木糖苷酶 *An-xyl* 的 SDS-PAGE 分析. M: Protein marker; 1: 粗酶液; 2-5: 凝胶过滤层析收集蛋白样品

Figure 4 SDS-PAGE analysis (A) and LC-MS/MS identification (B) of β -xylosidase *An-xyl*. A: SDS-PAGE analysis of β -xylosidase *An-xyl*. M: Protein marker; 1: Crude enzyme; 2-5: Protein samples were collected by gel filtration chromatography.

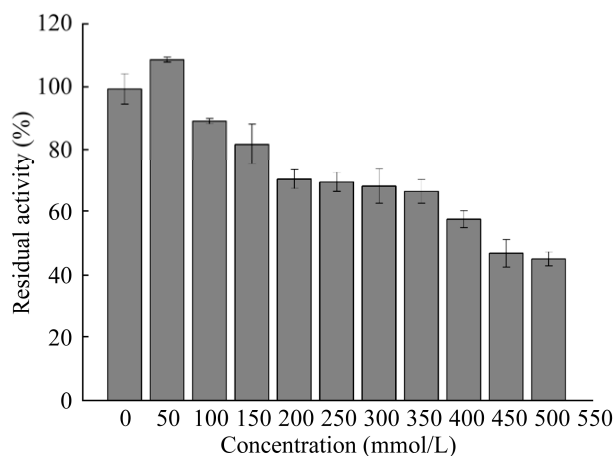


图5 木糖对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 酶活力的影响
Figure 5 Effect of xylose on the activity of β -xylosidase *An-xyl*.

2.6 抑制剂和表面活性剂对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的影响

测定 β -木糖苷酶 *An-xyl* 在不同的抑制剂和

表面活性剂处理 24 h 后的残余酶活力, 结果如图 7 所示, 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 CTAB 都对酶活力有较强的抑制作用, 残余酶活力分别为 41.5% 和 31.9%; 1 mmol/L SDS、1% Tween-20 和 1% Tween-80 对酶活力仅有轻微抑制作用, 但

表 1 β -木糖苷酶 *An-xyl* 底物偏好性

Table 1 Substrate specificity of β -xylosidase *An-xyl*

Substrate type	Specific activity of <i>An-xyl</i> (IU/mL)	Relative activity of <i>An-xyl</i> (%)
<i>p</i> NPG	3.0	8.7
<i>p</i> NPGal	ND	ND
<i>p</i> NPM	ND	ND
<i>p</i> NPX	34.2	100.0
<i>p</i> NPA	ND	ND
Corn cob xylan	<0.1	<0.5
Bagasse xylan	<0.1	<0.5
Beech wood xylan	<0.1	<0.5

ND: No enzyme activity was detected.

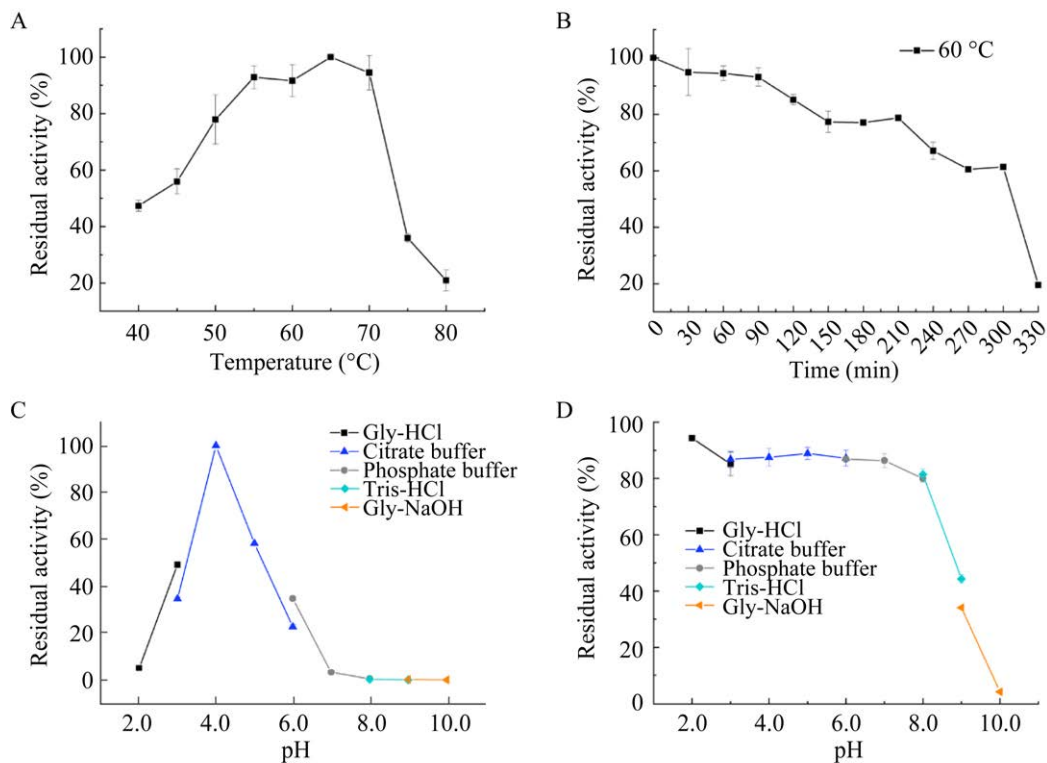


图 6 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的最适温度(A)、65 °C 温度稳定性(B)、最适 pH (C)、pH 稳定性(D)

Figure 6 The optimum temperature (A), 65 °C temperature stability (B), optimum pH (C), pH stability (D) of β -xylosidase *An-xyl*.

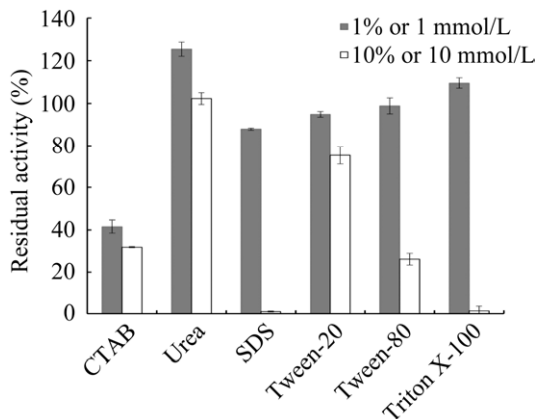


图 7 抑制剂及表面活性剂对 β -木糖苷酶 *An-xyl* 酶活力的影响

Figure 7 Effect of inhibitors and detergents on activity of β -xylosidase *An-xyl*.

三者对酶活力的抑制作用随浓度增加而增强,尤其是 10 mmol/L 的 SDS 几乎能完全抑制酶活力; 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的尿素对酶活力有不同

程度的促进作用,相对酶活力分别为 125.4%和 102.4%; 1% Triton X-100 能轻微促进酶活,但 10% Triton X-100 却几乎完全抑制了酶活力。

2.7 木糖苷酶 *An-xyl* 和纤维素酶对茶梗木质纤维素的降解

测定纤维素酶和 β -木糖苷酶 *An-xyl* 降解茶梗中木质纤维素产生的还原糖含量,结果如图 8 所示,样品中只添加纤维素酶,反应 2 h 后,检测到还原糖的含量为 511.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,反应 4 h 后,还原糖的含量上升至 613.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$;只添加 β -木糖苷酶 *An-xyl* 时,反应 2 h 和 4 h 后,还原糖含量仅为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$;当添加 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和纤维素酶反应时,反应 2 h 和 4 h 还原糖的含量为 610.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 849.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与只添加纤维素酶相比,还原糖含量分别提高了 19.3%和 38.6%。

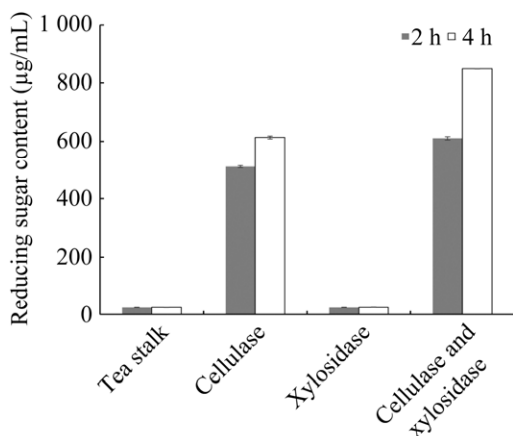


图 8 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与纤维素酶对茶梗木质纤维素的降解

Figure 8 Degradation of lignocellulose in tea stem by β -xylosidase *An-xyl* and cellulase.

3 讨论与结论

β -木糖苷酶水解底物时,作为产物之一的木糖在达到一定浓度时被认为是该酶的一种强抑制剂。本研究通过分子对接对比分析了在有茶梗诱导条件下,差异表达的 β -木糖苷酶 *An-xyl* 和低木糖耐受的 β -木糖苷酶 *xylA* 与木糖的亲性和,推测 β -木糖苷酶 *An-xyl* 具有较高的木糖耐受性,实验证明分析正确, β -木糖苷酶 *An-xyl* 的木糖耐受能力优于 β -木糖苷酶 *xylA*。 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的耐受规律呈现为先促进后抑制,低浓度木糖对酶活力有一定的促进作用,木糖浓度为 50 mmol/L 时, β -木糖苷酶 *An-xyl* 酶活力提高 9.24%。有报道表明不同微生物来源的 β -木糖苷酶对木糖也具有相似的耐受规律,如来源于热泉热孢菌(*Thermotoga thermarum*) DSM 5069 和黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的 β -木糖苷酶的酶活力随着反应环境中的木糖浓度的增加也呈现为先增加后降低的趋势^[10,18]。

Li 等^[17]基于 β -木糖苷酶 Xln-DT 野生型及多个突变点的酶学性质与分子对接结果,探究了木糖影响 β -木糖苷酶 Xln-DT 的关键位点和作用机

制,提出具有木糖耐受性的 β -木糖苷酶可能是由于木糖与酶的结合位点不在活性部位,而结合在底物通道的中间或入口处,从而表现出对木糖的高耐受性。进一步分析 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与木糖的对接构象及相互作用力,其中 Tyr464 侧链连接的苯环呈现极性,苯环 π 键的电子云易与木糖分子 2 号位取代基 σ 键的电子云重叠,形成 pi-sigma 相互作用,木糖分子受 pi-sigma 作用的影响靠近 Tyr464,极性氨基酸 Asp121 与木糖分子形成的氢键进一步将木糖分子的 2 号位“固定”在口袋表面区域, Glu115、Arg122、Asn463、Tyr465 和 Glu527 与木糖分子间有“半包围状”的范德华力作用,从而使木糖分子更倾向于靠近活性口袋表面区域,远离酶的活性口袋入口(图 1)。相对而言,木糖分子在 β -木糖苷酶 *xylA* 的对接位置处于酶的活性口袋内,接近底物结合区域,并且木糖与关键氨基酸之间形成了更强的相互作用力(图 2)。其中,芳香族氨基酸 Tyr276 和 Tyr452 侧链的羟基呈现较强的极性,能被酸化,易与木糖分子形成氢键。酸性带电荷的 Glu516 侧链上的羧基基团呈现电负性,更易从木糖分子上的羟基抓取氢原子结合形成氢键,最终体现在氨基酸以极化的方式促进木糖分子与酶结合。Tyr276、Tyr452 和 Glu516 形成的 3 组氢键使木糖分子结合在活性口袋内,这可能是 β -木糖苷酶 *xylA* 低木糖耐受性的原因。因此, β -木糖苷酶 *An-xyl* 呈现木糖高耐受性的特征可能与木糖倾向结合在活性口袋表面,不易进入活性口袋内相关。而底物 *p*NPX 与 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的对接位置在活性口袋入口处, *p*NPX 的对接位置更接近活性口袋,与氨基酸间相互作用力较高,更有利于 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与 *p*NPX 催化反应的进行(图 3)。

真菌来源的 β -木糖苷酶属于 GH3、GH43 和 GH54 家族,本文报道的 β -木糖苷酶 *An-xyl*

属于 GH3 家族, 表 2 对比了已表征不同来源的 GH3 家族 β -木糖苷酶的木糖耐受性, 大部分 β -木糖苷酶的木糖抑制常数 K_i 值低于 10 mmol/L, 耐受木糖的能力较差。木糖耐受能力最高的是 *T. thermarum* DSM 5069 来源的 β -木糖苷酶 Tth xynB3, 糖抑制常数 K_i 值高达 1 000 mmol/L, 该酶最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–7.0 之间保持 70% 以上的酶活力, 不适用于强酸或碱性环境下的生产应用^[10]。 β -木糖苷酶 *An-xyl* 木糖抑制常数 K_i 值为 433.2 mmol/L, 高于大部分已表征不同来源的 β -木糖苷酶, 具有高木糖耐受性的特点。 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的最适 pH 为 4.0, 且在酸性环境下具有良好的 pH 稳定性, 在酸性条件下具有较好的应用优势。

工业过程中使用的酶通常需要较好的热稳定性, β -木糖苷酶 *An-xyl* 最适反应温度为

65 °C, 与大多数曲霉属来源的 β -木糖苷酶的最适温度相似^[9,19-20], 并在 70 °C 条件下仍保持 90% 以上的酶活力。在 65 °C 处理 240 min 后, 残余酶活力大于 61% (图 5), 与巴西曲霉(*Aspergillus brasiliensis*)^[21]、*A. niger* ASKU28^[22]和 *A. niger* GS1^[23]来源的 β -木糖苷酶相比, 热稳定性更高; 此外该酶的 K_m 值与特异腐质霉(*Humicola insolens*)^[5]、*P. chrysosporium*^[18]和纤维化纤维菌(*Cellulosimicrobium cellulans* sp.)^[24]来源的 β -木糖苷酶相比更低, 表明与底物的亲和力更高。

目前, 茶梗可作为原料提取茶氨酸、茶多糖和茶多酚等活性成分, 或者是用于制作家居用品、工艺品等, 但实际应用并不理想, 大部分茶梗仍被直接丢弃^[25]。作为茶叶加工过程的副产物, 茶梗也是一种来源丰富的可再生木质纤维素原料, 开发其新的利用方向, 有助于提高茶叶副

表 2 不同来源的 GH3 家族 β -木糖苷酶的木糖耐受性比较

Table 2 Comparison of xylose tolerance of β -xylosidase of GH3 family from different sources

Sources	K_i of xylose (mmol/L)	Reference
<i>T. emersonii</i> (β XTE)	1.3	[12]
<i>Trichoderma reesei</i>	1.4	[26]
<i>Neurospora crassa</i>	1.7	[27]
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	1.7	[28]
<i>T. reesei</i> (β XTR)	2.4	[12]
<i>A. oryzae</i> KBN616 (<i>xylA</i>)	2.7	[16]
<i>Aspergillus japonicus</i>	2.9	[26]
<i>Colletotrichum graminicola</i>	3.3	[29]
<i>A. niger</i> ATCC 10864	3.3	[30]
<i>A. niger</i> van Tieghem (DSM 22593)	7.5	[19]
<i>Aspergillus awamori</i> X-100	7.7	[31]
<i>A. niger</i> ATCC 90196	8.3	[32]
<i>A. niger</i> NW147 (<i>xlnD I</i>)	9.8	[33]
<i>A. niger</i> NW147 (<i>xlnD II</i>)	13.2	[33]
<i>Dictyoglomus turgidum</i> Dt- <i>xyl3</i>	20.0	[34]
<i>H. insolens</i> Y1	29.0	[35]
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	40.0	[36]
<i>Leifsonia</i> sp. ZF2019	150.1	[37]
<i>A. niger</i> (<i>An-xyl</i>)	433.2	This study
<i>T. thermarum</i> DSM 5069 Tth xynB3	1 000.0	[10]

产物的经济效益,减少环境污染。将 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与纤维素酶协同使用,水解茶梗中木质纤维素,反应 2 h 和 4 h 还原糖含量分别提高了 19.3%和 38.6%,有效地提升了水解效率。考虑到 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的热稳定性,长时间水解会引起酶活力降低甚至失活,不利于研究其协同作用,因此未对茶梗进行长时间的水解。后续将结合 β -木糖苷酶 *An-xyl* 与纤维素酶协同水解过程中葡萄糖与木糖的变化规律,进一步优化协同水解反应条件和酶的添加形式。此外将利用蛋白质工程手段提高 β -木糖苷酶 *An-xyl* 的热稳定性,进一步提高该酶的应用价值。

目前,除挖掘新酶或改造现有酶资源外,设计并优化参与特定木质纤维素降解的酶混合物,促进不同酶之间的协同水解作用,是提高水解效率、降低酶成本的另一条可行途径^[38-39]。Huang 等^[40]使用木聚糖酶、 β -木糖苷酶和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶协同作用,更高效地水解了木质纤维素中的复合木聚糖。Boyce 等^[19]在商用纤维素酶和半纤维素酶水解预处理的秸秆时,使用 β -木糖苷酶协同水解,反应 6 h 后,生成的木糖量增加了 6.8 倍。Zhang 等^[41]从栓状青霉(*Penicillium piceum*) W6 胞外蛋白纯化出一种 β -木糖苷酶 PpBXL,与纤维素酶和半纤维素酶的有着很好的协同水解作用,提高了碱预处理后玉米秸秆和玉米芯水解的葡萄糖与木糖产量。在木质纤维素原料转化利用过程中,应充分考虑不同来源原料成分含量的差异,为提高茶梗木质纤维素的利用率,还需进一步研究其他水解酶类在茶梗木质纤维素降解的作用。综上所述,本研究中木糖苷酶 *An-xyl* 能协同水解茶梗中木质纤维素,具有高木糖耐受性,在茶梗木质纤维素水解利用方面有应用潜力。

REFERENCES

- [1] TAHA M, FODA M, SHAHSAVARI E, ABURTO-MEDINA A, ADETUTU E, BALL A. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 38: 190-197.
- [2] SUN Y, CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1): 1-11.
- [3] VASIĆ K, KNEZ Ž, LEITGEB M. Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(3): 753.
- [4] 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.
- [5] YANG X, SHI P, HUANG H, LUO H, WANG Y, ZHANG W, YAO B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan[J]. *Food Chemistry*, 2014, 148: 381-387.
- [6] MALGAS S, MAFA MS, MKABAYI L, PLETSCHE BI. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(12): 187.
- [7] ZHANG J, VIKARI L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 286-291.
- [8] BENASSI VM, de LUCAS RC, JORGE JA, del POLIZELI M. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming β -xylosidase and Arabinanase production[J]. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 2015, 45(4): 1459-1467.
- [9] PATEL H, KUMAR AK, SHAH A. Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family β -xylosidase/ β -glucosidase from *Aspergillus niger* ADH-11[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 1260-1269.
- [10] SHI H, LI X, GU HX, ZHANG Y, HUANG YJ, WANG LL, WANG F. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant

- β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Thermotoga thermarum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 27.
- [11] ROHMAN A, DIJKSTRA BW, PUSPANINGSIH NNT. β -xylosidases: structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5524.
- [12] RASMUSSEN LE, SØRENSEN HR, VIND J, VIKSØ-NIELSEN A. Mode of action and properties of the β -xylosidases from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(5): 869-876.
- [13] 苏团. 茶梗碎料板工艺及甲醛释放量控制机理的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2012.
- SU T. Study on the technology of tea stalk particleboard and the control mechanism of formaldehyde emission[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2012 (in Chinese).
- [14] ZHANG YY, LI YL, LI MY, XU M, YUE JQ. Preparation of carboxymethyl cellulose from tea stalk and its use as a paper-strengthening agent[J]. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 2019, 34(3): 310-317.
- [15] 张良桢. 茶梗发酵黑曲霉胞外酶液对速溶乌龙茶粉的风味影响及蛋白质组学研究[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2018.
- ZHANG LZ. Effect of extracellular enzymes of *Aspergillus niger* fermented by tea stem on flavor of instant oolong tea powder and protein genomics study[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2018 (in Chinese).
- [16] KIRIKYALI N, WOOD J, CONNERTON IF. Characterisation of a recombinant β -xylosidase (xylA) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*[J]. *AMB Express*, 2014, 4(1): 1-7.
- [17] LI Q, TONG XY, JIANG YP, LI DD, ZHAO LG. Improvements in xylose stability and thermal stability of GH39 β -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum* by site-directed mutagenesis and insights into its xylose tolerance mechanism[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 151: 109921.
- [18] NGUYEN DUC H, THAYUMANAVAN P, KWON TH, PARK SM. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(2): 152-159.
- [19] BOYCE A, WALSH G. Purification and characterisation of a thermostable β -xylosidase from *Aspergillus niger* van tieghem of potential application in lignocellulosic bioethanol production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(3): 712-730.
- [20] CHOENGPANYA K, ARTHORNTHURASUK S, WATTANA-AMORN P, HUANG WT, PLENGMUANKHAE W, LI YK, KONGSAEREE PT. Cloning, expression and characterization of β -xylosidase from *Aspergillus niger* ASKU28[J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 115: 132-140.
- [21] PEDERSEN M, LAURITZEN HK, FRISVAD JC, MEYER AS. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(5): 743-748.
- [22] BHALLA A, BISCHOFF KM, SANI RK. Highly thermostable GH39 β -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF₁[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1): 1-10.
- [23] DÍAZ-MALVÁEZ FI, GARCÍA-ALMENDÁREZ BE, HERNÁNDEZ-ARANA A, AMARO-REYES A, REGALADO-GONZÁLEZ C. Isolation and properties of β -xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(7): 1018-1024.
- [24] YUAN Y, HU YB, ZHANG H, LENG JY, LI F, ZHAO XS, GAO J, ZHOU YF. Characterization of a recombinant multifunctional glycoside hydrolase family 3 β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase/ β -glucosidase from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 131: 65-72.
- [25] 王伟伟, 张建勇, 陈琳, 江和源. 茶梗的综合利用研究进展[J]. *茶叶通讯*, 2020, 47(1): 20-24.
- WANG WW, ZHANG JY, CHEN L, JIANG HY. Research process on comprehensive utilization of tea stalks[J]. *Tea Communication*, 2020, 47(1): 20-24 (in Chinese).
- [26] SEMENOVA MV, DRACHEVSKAYA MI, SINITSYNA OA, GUSAKOV AV, SINITSYN AP. Isolation and properties of extracellular β -xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, 74(9): 1002-1008.
- [27] KIRIKYALI N, CONNERTON IF. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa* β -xylosidase in *Pichia pastoris*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 57: 63-68.

- [28] NIETO-DOMÍNGUEZ M, de EUGENIO LI, BARRIUSO J, PRIETO A, FERNÁNDEZ de TORO B, CANALES-MAYORDOMO Á, MARTÍNEZ MJ. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3 β -xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: an enzyme displaying regioselective transxylosylation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(18): 6380-6392.
- [29] de CARVALHO DR, CARLI S, MELEIRO LP, ROSA JC, de OLIVEIRA AHC, JORGE JA, FURRIEL RPM. A halotolerant bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: purification and biochemical characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 741-750.
- [30] SELIG MJ, KNOSHAUG EP, DECKER SR, BAKER JO, HIMMEL ME, ADNEY WS. Heterologous expression of *Aspergillus niger* β -D-xylosidase (XlnD): characterization on lignocellulosic substrates[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 146(1): 57-68.
- [31] ENEYSKAYA EV, IVANEN DR, BOBROV KS, ISAEVA-IVANOVA LS, SHABALIN KA, SAVEL'EV AN, GOLUBEV AM, KULMINSKAYA AA. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 457(2): 225-234.
- [32] la GRANGE DC, PRETORIUS IS, CLAEYSSSENS M, van ZYL WH. Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* beta-xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (xyn2) genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5512-5519.
- [33] van PEIJ NNME, BRINKMANN J, VRŠANSKÁ M, VISSER J, de GRAAFF LH. β -xylosidase activity, encoded by xlnD, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 245(1): 164-173.
- [34] LI Q, JIANG YJ, TONG XY, PEI JJ, XIAO W, WANG ZZ, ZHAO LG. Cloning and characterization of the β -xylosidase from *Dictyoglomus turgidum* for high efficient biotransformation of 10-deacetyl-7-xylositaxol[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94: 103357.
- [35] XIA W, SHI PJ, XU XX, QIAN LC, CUI Y, XIA MJ, YAO B. High level expression of a novel family 3 neutral β -xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117578.
- [36] PINPHANICHAKARN P, TANGSAKUL T, THONGNUMWON T, TALAWANICH Y, THAMCHAIPENET A. Purification and characterization of β -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(7): 727-733.
- [37] 何易, 焦镕虎, 王晨曦, 王茜, 许光治. *Leifsonia* sp. ZF2019 中一种新型耐木糖 β -木糖苷酶的表达与特征[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1452-1463.
- HE Y, JIAO RH, WANG CX, WANG X, XU GZ. Expression and characterization of a novel xylose-tolerant β -xylosidase from *Leifsonia* sp. ZF2019[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1452-1463 (in Chinese).
- [38] HARRIS PV, XU F, KREEL NE, KANG C, FUKUYAMA S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 19: 162-170.
- [39] LOPES AM, FERREIRA FILHO EX, MOREIRA LRS. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(3): 632-645.
- [40] HUANG D, LIU J, QIYF, YANG KX, XU YY, FENG L. Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, β -xylosidases, and an α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6023-6037.
- [41] ZHANG ZK, GE MY, GUO Q, JIANG Y, JIA WD, GAO L, HU JH. Ultrahigh-throughput screening of high- β -xylosidase-producing *Penicillium piceum* and investigation of the novel β -xylosidase characteristics[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2022, 8(4): 325.

(本文责编 郝丽芳)