



2017

读书报告

汇报人：赵卓丽 日期：2017-6-24

Antonie van Leeuwenhoek (2017) 110:429–436
DOI 10.1007/s10482-016-0798-y



CrossMark

SHORT COMMUNICATION

Characterization of a neutral recombinant xylanase from *Thermoactinospora rubra* YIM 77501^T

Yi-Rui Yin · Qing-Wen Hu · Wen-Dong Xian · Feng Zhang · En-Min Zhou ·
Hong Ming · Min Xiao · Xiao-Yang Zhi · Wen-Jun Li

热裂杆菌属菌株YIM 77501^T中性重组木聚糖酶的表达

Biotechnol Lett (2015) 37:857–862

DOI 10.1007/s10529-014-1742-8

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*

Yi-Rui Yin · Feng Zhang · Qing-Wen Hu ·
Wen-Dong Xian · Wael N. Hozzein · En-Min Zhou ·
Hong Ming · Guo-Xing Nie · Wen-Jun Li

Received: 7 October 2014 / Accepted: 24 November 2014 / Published online: 6 December 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

耐盐、耐热、耐碱新种耐盐双歧菌GH6内切葡聚糖酶的异源表达



01

Abstract

02

Introduction

03

Materials and methods

04

Results and Discussion

05

Conclusion



Abstract

Abstract A xylanase gene (*TrXyn10*) from *Thermoactinospora rubra* YIM 77501^T was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The amino acid sequence displayed 78% homology with *Microbispora mesophila* xylanase (WP_062413927.1). The recombinant xylanase (TrXyn10), with MW 46.1 kDa, could hydrolyse beechwood, birchwood and oat spelt xylan. Based on the sequence, enzymatic properties and tertiary structure of the protein, TrXyn10 belongs to glycoside hydrolase family 10 (GH10). The optimal pH and temperature for the recombinant enzyme were determined to be 7.0 and 55 °C, respectively. TrXyn10 was stable over a wide pH range, and it retained more than 45% of the total activity at pH 6.0–12.0 for 12 h.

In addition, the activity was greatly promoted, by approximately 200% of the initial activity, after incubation at pH 6.0 and 7.0 for 12 h. Based on enzymatic properties and product analysis, we showed that TrXyn10 is a neutral endoxylanase.

Keywords Acid tolerant · Alkali tolerant · *Thermoactinospora rubra* YIM 77501^T · Xylanase

菌种 : *Thermoactinospora rubra* YIM 77501^T

木聚糖酶

TrXyn10

46.1kDa

糖苷水解酶家族10(GH10)

纯化的重组中性内切木聚糖酶在55°C和pH 7.0下具有最佳活性。

Abstract A novel endoglucanase gene was cloned from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T, designated as *thcel6A* for being a member of glycoside hydrolase family 6. The gene was 1332 bp long and encoded a 443-amino-acid protein with a molecular mass of 45.9 kDa. The purified recombinant endoglucanase had optimal activity at 55 °C and pH 8.5. *Thcel6A* showed high hydrolytic activities at 25–55 °C and retained 58 % of initial activity after incubation at 90 °C for 1 h. It retained more than 80 %

of activity after incubation for 12 h at pH values from 4 to 12. *Thcel6A* displayed higher hydrolytic activities in 5–15 % NaCl (w/v) than at 0 % NaCl. Activity increased 2.5-fold after incubation with 20 % (w/v) NaCl at 37 °C for 10 min. These properties suggest that this novel endoglucanase has potential for specific industrial application.

Keywords Alkali-stable endoglucanase · Endoglucanase · Glycoside hydrolase (GH 6) · Halotolerant endoglucanase · *Thermobifida halotolerans* · Thermostable endoglucanase

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10529-014-1742-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

菌种 : *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T

内切葡聚糖酶

Thcel6A

耐热、耐碱、耐盐 : 25-55°C具高水解活性, 90°C孵育1h可保持58%活性; pH值4-12下孵育12h可保持80%以上活性; 在5-15%NaCl (w / v) 中显示比0%NaCl更高的水解活性。与20% (w / v)

45.9kDa 糖苷水解酶家族6(GH6)
NaCl孵育后, 活性增加2.5倍
纯化的重组内切葡聚糖酶在55 °C和pH 8.5下具有最佳活性。



02

Introduction

YIM 77501^T

木聚糖酶(EC 3.2.1.x)是一种半纤维素酶，其催化木聚糖中1,4-β-D-木糖苷键的内水解。木聚糖作为木聚糖酶的底物，是一种主要在植物细胞壁上的结构多糖，占地球上所有可再生有机碳的三分之一(Prade 1996)。基于蛋白质的序列，酶学性质和三维结构，具有木聚糖酶活性的酶属于糖苷水解酶(GH)家族5,7,8,10,11,18,26,30,43,51 (Collins *et al.*2005, <http://www.cazy.org/>)。

木聚糖酶

木聚糖酶在造纸，果实成熟，种子发芽，动物饲料制备和生物燃料生产中具有潜在的应用(Collins *et al.*2005; Kim *et al.*2011; Ziaie-Shirkolae *et al.*2008)。木聚糖酶由真菌，细菌，放线菌（包括嗜热性放线菌），酵母，海藻，原生动物，蜗牛，甲壳类动物，昆虫和种子等生物体产生 (Polizeli *et al.*2005)。

YIM 77501^T

近期对嗜热性放线菌的木聚糖酶的研究一般集中在**高温和极端pH**下的酶活性和稳定性，特别是对于来自*Thermobifida fusca*和*Thermobifida halotolerans*的热碱性木聚糖酶（Wang *et al.*2015; Zhang *et al.*2012; Zhao *et al.*2015）。

热裂杆菌属菌株YIM 77501^T是从中国西南部云南省腾冲国家火山地质公园收集的沙土样品中分离出的**好氧、革兰氏阳性、形成孢子的嗜热放线菌**（Zhou *et al.*2012）。

TrXyn10

在本研究中，首次获得了*Thermoactinospira rubra* YIM 77501^T的TrXyn10基因。TrXyn10属于糖苷水解酶家族10(GH10)。**克隆TrXyn10的基因并在大肠杆菌BL21 (DE3) 中异源表达**。纯化后，研究了TrXyn10的酶学性质。它的特性可能成为进一步研究和工业应用的理想选择。

YIM 90462^T

纤维素是植物细胞壁的主要成分，也是最丰富的可再生多糖，在循环材料和能量转移中起重要作用。内切葡聚糖酶（EC3.2.1.4）是纤维素分解初始阶段的关键酶，这是将木质纤维素植物材料生物处理成生物乙醇的重要步骤(Sun and Cheng 2002)。内切葡聚糖酶在纺织品中具有潜在的应用价值，适用于生物燃料，硫酸盐纸浆漂白及人类和动物食品的制备(Sun and Cheng 2002)。

纤维素酶

极端微生物用于分离能够承受苛刻条件（例如热稳定性，酸稳定性，碱稳定性和耐盐性）的新酶（Khandeparker *et al.* 2011）。寻找来自极端新物种的新型纤维素酶吸引了越来越多的关注。由于热酵母菌属具有**耐热性强**的多糖降解酶，可能成为重要的工业菌株（Dhawan and Kaur 2007; Yang *et al.* 2007）。

YIM 90462^T

耐盐双岐菌 *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T 是从中国西南部云南省的盐矿中分离的一种需氧、嗜热、耐盐的放线菌 (Yang *et al.* 2008)。它含有碱性热稳定GH9内切葡聚糖酶 (Zhang *et al.* 2011) 和耐热木聚糖酶 (Zhang *et al.* 2012)。

Thcel6A

本文报道了属于糖苷水解酶家族6 (GH6) 的 *T. halotolerans* YIM 90462^T 的耐盐碱性热稳定内切葡聚糖酶，并被命名为Thcel6A。本研究描述了Thcel6A的克隆，异源表达。该内切葡聚糖酶的耐盐、碱和耐热性质表明它可能对工业应用有帮助。



03

Materials and methods

菌株、质粒、培养基

重组质粒的构建

序列和结构分析

表达重组TrXyn10

酶检测

TrXyn10的表征

核苷酸序列登录号

菌种

构建表达质粒

重组Thcel6A的表达

酶活检测

温度、pH、盐度的影响

Thcel6A的底物特异性和动力学参数

水解产物的TCL分析

YIM 77501^T

YIM 90462^T

YIM 77501^T

菌种 : *T. rubra* YIM 77501^T(= DSM 45614^T = CCTCC AA2011014^T)

培养基 : ISP2

培养温度 : 50°C

大肠杆菌 : 用于DNA操作的DH5a、用于蛋白质表达的BL21(DE3)

质粒 (克隆载体和表达载体) : pEASY-Blunt E1质粒(TransGen Biotech , China)

YIM 77501^T

重组质粒的构建：

提取DNA： Ezup Bacteria DNA试剂盒(Sangon Biotech , China)

设计引物： 正向引物5'-ATG GCG TCA CCA GCC TTC G-3'

反向引物5'-TCA CAG GGC CAC CCG GAC CT-3'

PCR扩增TrXyn10： TransStar FastPfu Fly DNA聚合酶(TransGen Biotech , China)扩增完整ORF

连接： pEASY-Blunt E1载体(TransGen Biotech , China)

转化： 大肠杆菌DH5a , 阳性重组质粒命名为pEASY-Blunt E1-trxyn10

蛋白质序列比对： 使用Clustal X进行与TrXyn10 (从NCBI数据库检索) 密切相关蛋白质序列多重比对

系统发育分析： 使用MEGA 5软件构建NJ树、ML树

YIM 77501^T

序列和结构分析：

序列组装： Seqman Vector NTI Advance 10.0 (Invitrogen)；

DNA和蛋白质序列比对： BLASTx、 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)；

预测信号肽： SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)；

推导和分析氨基酸序列的结构： EXPASY工具 (<http://expasy.org/>)；

在线预测催化结构域的三级结构： Cellvibrio japonicus (PDB : 1US3) 内切- β -1,4-木聚糖酶

作为模板 (<http://www.robetta.org/register.jsp>)；

分析表面电荷： Deep View-Swiss-PdbViewer 4.1.0

YIM 77501^T

表达重组TrXyn10：

转化筛选阳性克隆：将pEASY-Blunt E1-trxyn10载体转化到大肠杆菌BL21(DE3)中，分离出阳性克隆用于TrXyn10表达；

复苏菌液：将转化子在含有100 µg/ml氨苄青霉素的LB培养基中于37°C，220 rpm培养过夜；

扩大培养：吸取2ml上述过夜培养菌液作为种子接种至100ml LB抗性液体培养基（含50µg/ml卡那霉素或含100µg/ml 氨苄青霉素）37°C，220rpm振荡培养，至OD≈0.6时，冰浴5min后加入IPTG至终浓度1mM，于25°C，220rpm振荡培养8h；

收获细胞：通过4000xg离心收获细胞并悬浮在20ml PBS缓冲液(pH8.0)中，重悬清洗菌体后再离心(4000×g)，最后重悬于20ml Buffer A(20mM NaH₂PO₄，0.3 M NaCl, 10mM Tris，pH 8.0)缓冲液中。

YIM 77501^T

表达重组TrXyn10：

蛋白表达：在冰浴下对菌悬液进行超声破碎，然后4°C下 12000×g离心30 min，取上清液过Ni²⁺亲和柱进行结合。将穿刺液重复上样两次后，使用20倍柱体积的Buffer A洗涤柱子，然后用10倍柱体积含20 mM咪唑的Buffer A继续洗涤柱子，最后使用含250 mM咪唑的 Buffer A洗脱标签蛋白。纯化的蛋白通过10% SDS-PAGE胶进行检测，蛋白使用卡马氏亮蓝 R-250进行染色。蛋白浓度通过小牛血清作为标准，使用蛋白定量试剂 (Sangon Biotech, China)进行测定；

木聚糖酶活性检测：通过酶谱技术测量。使用含有0.2% (w/v)山毛榉木聚糖的10% SDS-PAGE凝胶拆分样品。电泳后，将凝胶用含有2.5 (w/v) Triton X-100的200mM磷酸钠缓冲液(pH7.0)洗涤两次，持续30分钟，然后在200mM磷酸钠缓冲液中浸泡15分钟。然后，将凝胶在200mM磷酸钠缓冲液中于45°C温育1小时，并在0.2 (w/v)刚果红中于25°C下染色10分钟。刚果红用1M NaCl脱色，直到凝胶背景活性带清除为止。

YIM 77501^T

酶检测：

用山毛(Sigma)作为底物测定木聚糖酶活性。将含有1% (w/v)山毛榉木聚糖缓冲液(pH7.0)的反应混合物在55°C预温育，然后加入纯化酶。酶检测在55°C进行10分钟，并且使用木糖作为标准，通过3,5-二硝基水杨酸(DNS)测定还原糖的量。将酶活性的单位(IU)定义为在测定下能够从每分钟从木聚糖释放1 μ mol还原糖的酶的量条件。

YIM 77501^T

TrXyn10的表征：

在pH 7.0下测定木聚糖的最适温度.通过测量在45、55和65°C下温育10、20、30、40、50和60分钟后的酶的残留活性来测定热稳定性。

通过使用以下pH5.0至9.0的缓冲液：柠檬酸钠(pH5.0-6.0)，磷酸钠(pH6.5和7.5)，Tris-HCl(pH8.0和8.5)和甘氨酸NaOH(pH 9.0-12.0)研究了pH对TrXyn10的影响。通过在4°C预温育12小时，在可变pH值下测定pH稳定性，然后在标准测定条件下测量残留的酶活性。

YIM 77501^T

TrXyn10的表征：

通过应用适当的金属盐(1mM)和化学试剂(1% w/v)测试各种金属离子和化学物质对木聚糖酶活性的影响。酶抑制或活化程度对照样品以酶活性的百分比表示（不含额外的金属离子和化学试剂）。

通过比较榉木木聚糖的活性与桦木木聚糖，燕麦木聚糖，来自大麦的 β -(1,3; 1,4)葡聚糖，Avicel纤维素，CMC（羧甲基纤维素）和柑橘类水果果胶榉木木聚糖的活性来确定重组TrXyn10的底物特异性。

YIM 77501^T

TrXyn10的表征：

为了确定动力学参数，在最佳条件下以2-16mg/ml浓度的山毛榉木聚糖作为底物进行反应5分钟。

基于酶反应，使用Weaverville-Burk方程来计算动力学参数 K_m 和 V_m 。

TLC（薄层色谱）用于检测山毛榉木聚糖的水解。反应混合物由1%(w/v)山毛榉木聚糖和10g纯

化的酶在200mM磷酸钠缓冲液(pH7.0)中组成。标准是木糖(X1)，木二糖(X2)，木三糖(X3)，木

四糖(X4)和木五糖(X5)。将反应物在50°C下孵育1小时，然后在Merck Silica Gel 60F板上分析。

YIM 77501^T

核苷酸序列登录号：

来自*T.rubra* YIM 77501^T的木聚糖酶基因TrXyn10的核苷酸序列已经保藏在GenBank中。登录号为KT273992。

YIM 90462^T

菌种 : *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T (=KCTC16123^T = DSM 44631^T)

培养基 : ISP 4(10 % (w/v) NaCl)

培养温度 : 45°C

YIM 90462^T

构建表达质粒：

提取DNA

PCR扩增完整的Thce16A序列：

正向引物5'-AGC GGA TCC ATG TCC CCC AAA CCC AT-3'

反向引物5'-GTC AAG CTT GCC GGC GGT GCA GGT GAG-3'

双酶切：将PCR产物用BamHI和HindIII酶切并插入pET28a载体中；

连接：构建pET28a-Thce16A表达质粒。

YIM 90462^T

重组ThceI6A的表达：

转化：将重组质粒pET28a-ThceI6A转化到大肠杆菌BL21(DE3)中；

挑选阳性克隆：于5ml LB液体培养基(30 μ g/ ml卡那霉素)于37 $^{\circ}$ C摇床培养过夜；

扩大培养：将1ml培养物接种到100 μ LTB培养基中在37 $^{\circ}$ C和220rpm下孵育、

IPTG在中间生长点(OD₆₀₀和0.6)以1mM加入，然后在28 $^{\circ}$ C和220rpm下进一步温育6小时；

收获细胞：通过以4000xg离心并重新悬浮于50mM Tris / HCl缓冲液 (pH8) 中。

YIM 90462^T

酶活检测：将含有Tris/HCl缓冲液(pH8.5)的 0.5%(w/v)羧甲基纤维素(CMC) 的反应混合物在55°C预温育，然后加入纯化酶。在55°C下酶测定30分钟，通过3,5-二硝基水杨酸测定法测定释放的还原糖的量。

温度、pH和盐的影响：在50mM Tris/HCl缓冲液(pH8.5)中检查5至85°C的温度对纤维素酶活性的影响。为了评价热稳定性，将纤维素酶溶液(0.2ml)分别在70、80和90°C下保温2小时，如上所述测定残留活性。使用柠檬酸钠(pH3-6)，磷酸钠(pH6.5和7.5)，Tris/HCl(pH8-9)，研究pH对Thcel6A的影响；甘氨酸/NaOH(pH 9-12)。pH稳定性试验是通过将酶在4°C不同的缓冲液体系中预培养12小时进行，然后在最佳测定条件(55°C，pH8.5)下测定残留活性。通过标准方法使用含有高达30%(w/v)的NaCl的(0.5%，w/v)CMC底物研究了高盐度对酶活性的影响。对于耐盐活性，将Thcel6A在37°C下在10%，20%，30%NaCl中孵育，并且间隔地确定残留活性。

YIM 90462^T

纤维素酶Thcel6A的底物特异性和动力学参数：通过将CMC上的活性与燕麦皮质木聚糖滤纸，来自大麥的 β -葡聚糖和0.5%(w/v)的甲壳素进行比较来确定底物特异性。在最佳条件下测定动力学常数(K_m 和 V_{max})，CMC用作2-18mg/ml的底物。初始速度(V_0)通过在不同底物孵育5分钟后取样而测定浓度。基于酶反应，使用Lineweaver-Burk方程计算动力学参数 K_m 和 V_m 。

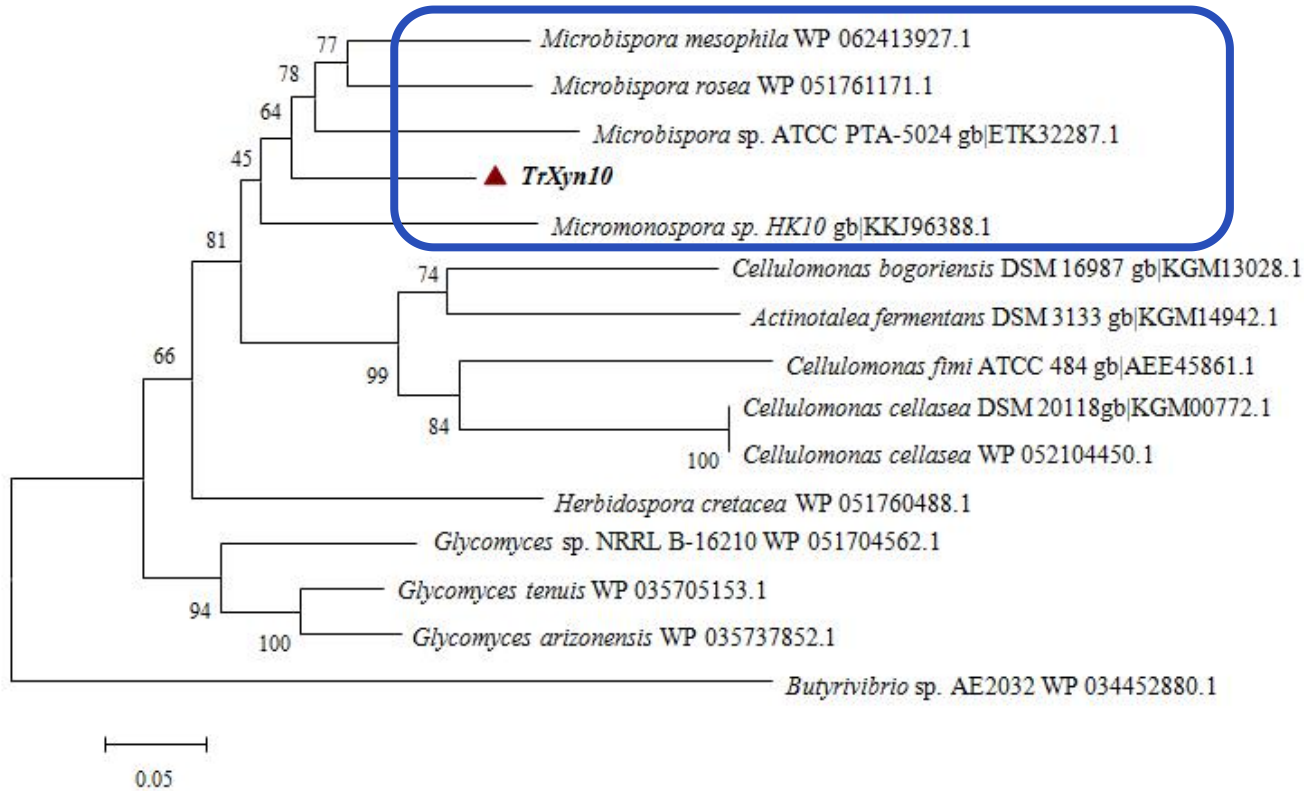
水解产物的TLC分析：使用硅胶60平板(Merck)，用1-丁醇/乙酸/水(2:1:1，以体积计)显影，通过TLC分析来自CMC的水解产物。糖通过在新鲜制备的5%(v/v) H_2SO_4 在乙醇中喷射平板后在120°C下加热10分钟来检测。



04

Results and Discussion

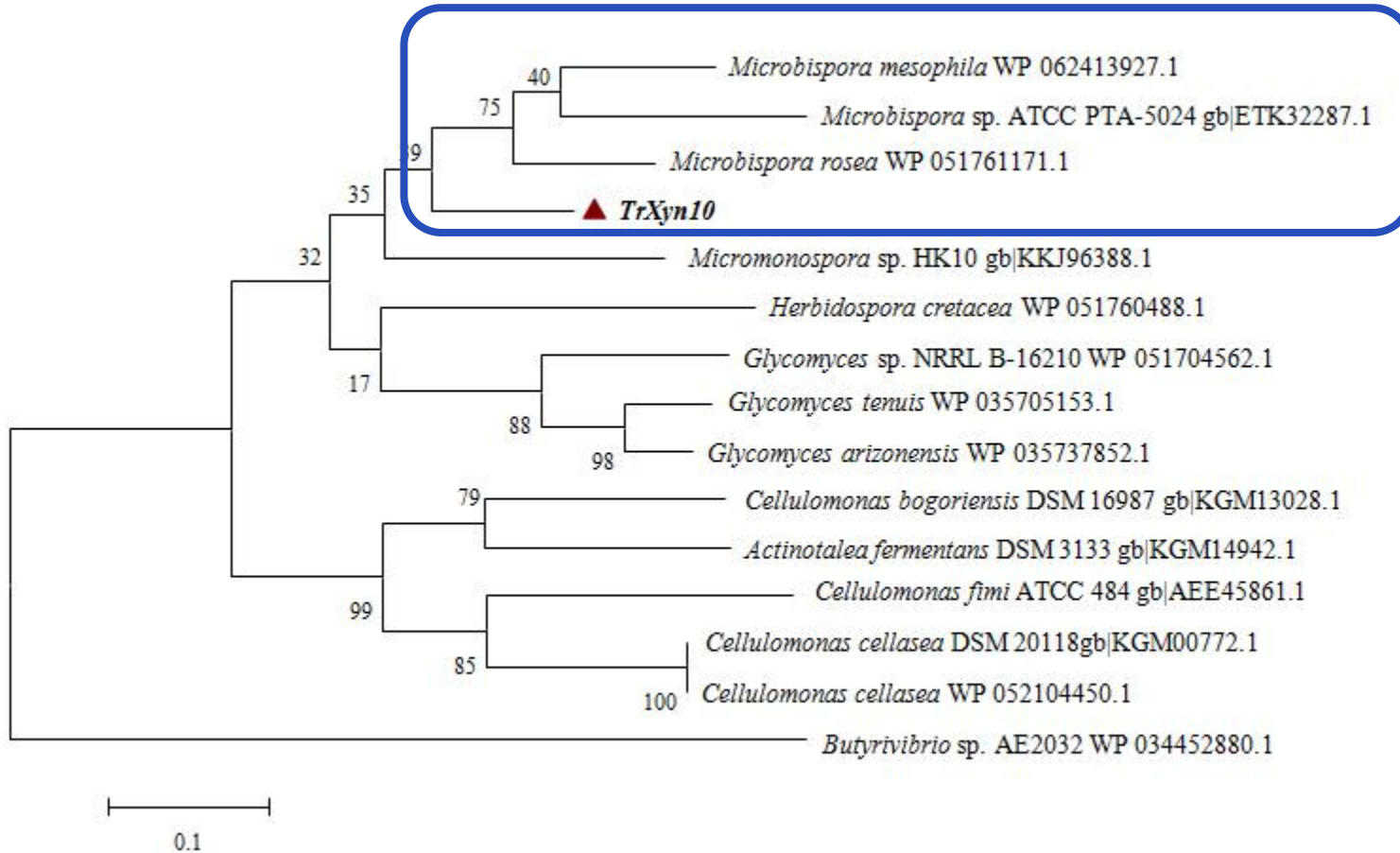
YIM 77501^T



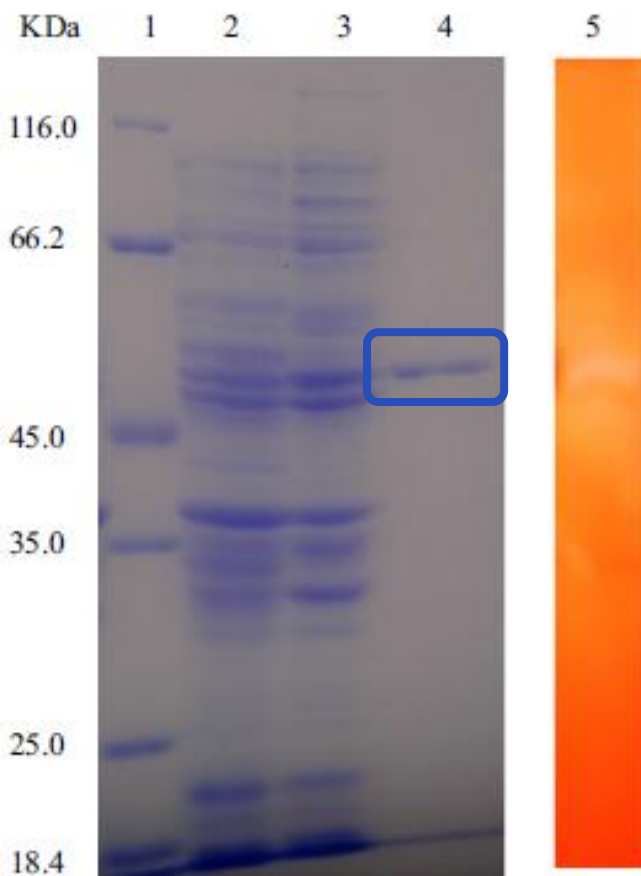
Neighbour-joining tree

扩增基因TrXyn10(1239bp)并克隆到pEASY-Blunt E1中以产生pEASYBlunt E1-trxyn10。该基因编码412个氨基酸的多肽，分子量为46.1kDa，理论等电点(pI)为5.05，无预测信号肽。TrXyn10的氨基酸序列与嗜双歧杆菌(*Microbispora mesophila*)的1,4-二磷酸酶(NCBI参考序列：WP_062413927.1)显示出最高的氨基酸序列同一性(78%)。

YIM 77501^T



系统发育分析表明，Trxyn10簇与来自嗜中性白念珠菌的微生物（*Microbispora sp.*）、ATCC PTA-5024、玫瑰花双歧杆菌的1,4-β-木聚糖酶聚为一簇。（图S1、S2）。目前无任何有关*M. mesophila*, *M. sp.* ATCC PTA-5024, *M. rosea* 1,4-聚糖醛酸酶的酶性质的报道。



YIM 77501^T

序列分析显示TrXyn10含有糖基水解酶家族10(GH10)的独特催化模块。该基因在大肠杆菌BL21(DE3)中表达，并且通过Ni-NTA亲和层析纯化具有N-末端His标签的重组蛋白。

SDS-PAGE分析表明，重组木聚糖酶蛋白的分子质量如预期。

Fig. 1 Analysis of the recombinant protein TrXyn10 on SDS-PAGE and zymogram analysis of xylanase activity. Lane 1, protein molecular weight marker (18.4 kDa to 116.0 kDa); lane 2, total protein in non-induced *E. coli* BL21/pEASY-Blunt E1-trxyn10; lane 3, total protein in IPTG-induced *E. coli* BL21/pEASY-Blunt E1-trxyn10; lane 4, purified TrXyn10; lane 5, zymogram of the purified enzyme. Xylanase activity was detected as a clear band against a red background

分析重组蛋白木聚糖酶活性的SDS-PAGE和酶谱分析。

泳道1：蛋白质分子量标记（18.4kDa-116.0kDa）；

泳道2：非诱导大肠杆菌BL21 / pEASY-Blunt E1-trxyn10中的总蛋白；

泳道3：IPTG诱导的大肠杆菌BL21 / pEASY-Blunt E1-trxyn10中的总蛋白；

泳道4：纯化TrXyn10；

泳道5：纯化酶的酶谱。木聚糖酶活性为被检测为对红色背景清晰的带。

YIM 77501^T

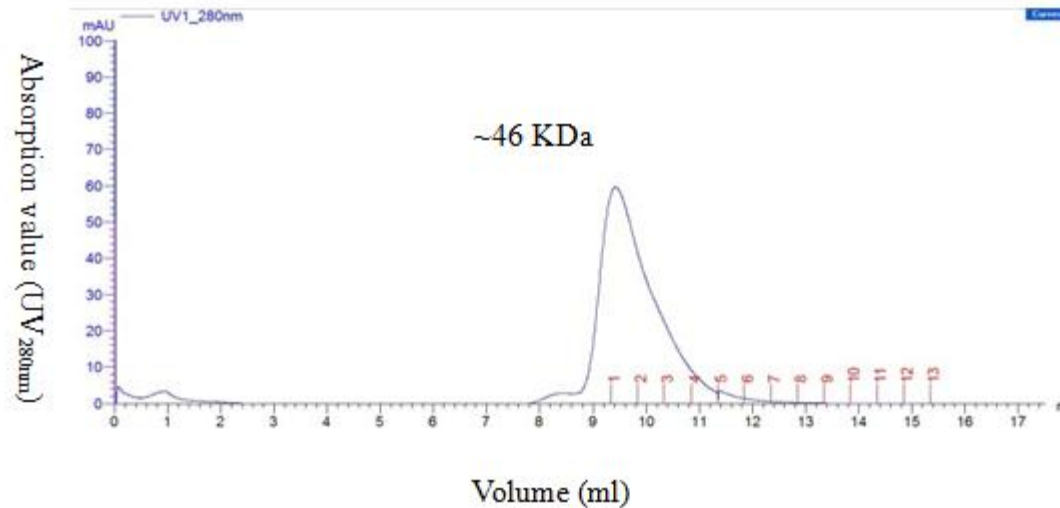


Fig. S3 TrXyn10 appears to form a monomer, as determined by size exclusion chromatography (Superdex-75).

亲和纯化的蛋白质在与通过尺寸排阻色谱法（图S3）测定的TrXyn10的分子量相同的分子量（46kDa）下仅显示一个峰，表明TrXyn10形成单体。

YIM 77501^T

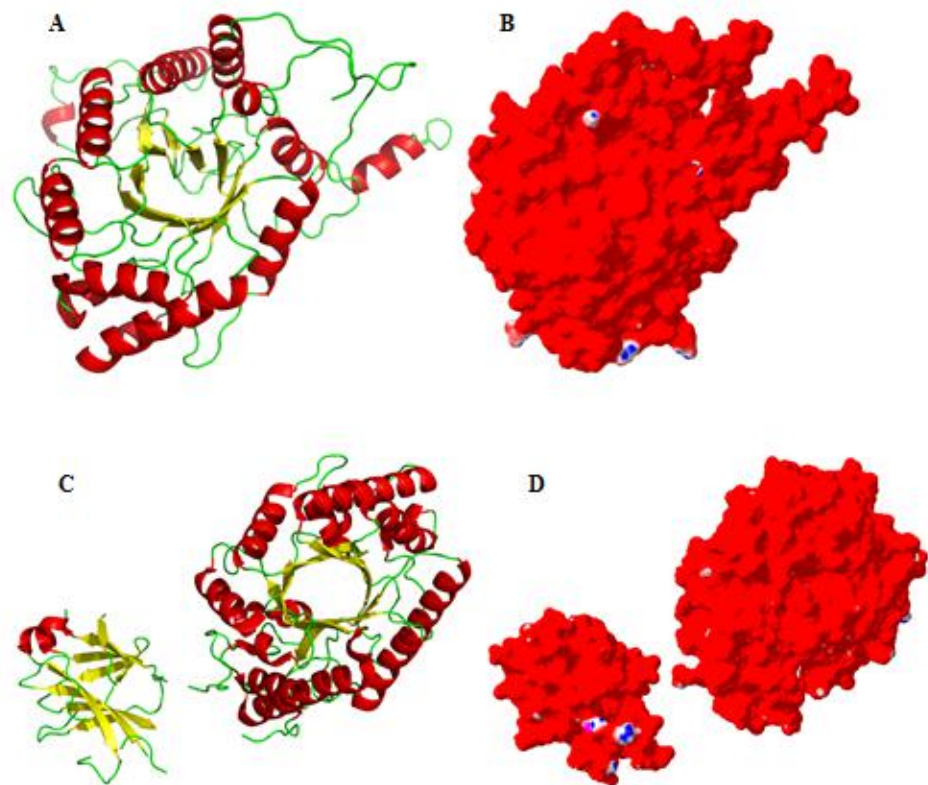


Fig. S4 The tertiary structures of TrXyn10 with the endo- β -1,4-xylanase from *Cellvibrio japonicus* (PDB: 1US3) as the template. **A** The tertiary structure of TrXyn10. **B** The tertiary structure of endo- β -1,4-xylanase from *Cellvibrio japonicus* (PDB: 1US3). **C** The charge distribution on the surface of TrXyn10. **D** The charge distribution on the surface of the endo- β -1,4-xylanase from *Cellvibrio japonicus* (PDB: 1US3). Positive charges are depicted in blue, and negative charges are depicted in red.

使用*C. japonicus* (PDB: 1US3)作为模板预测TrXyn10的内切 β -1,4-木聚糖酶的三级结构。

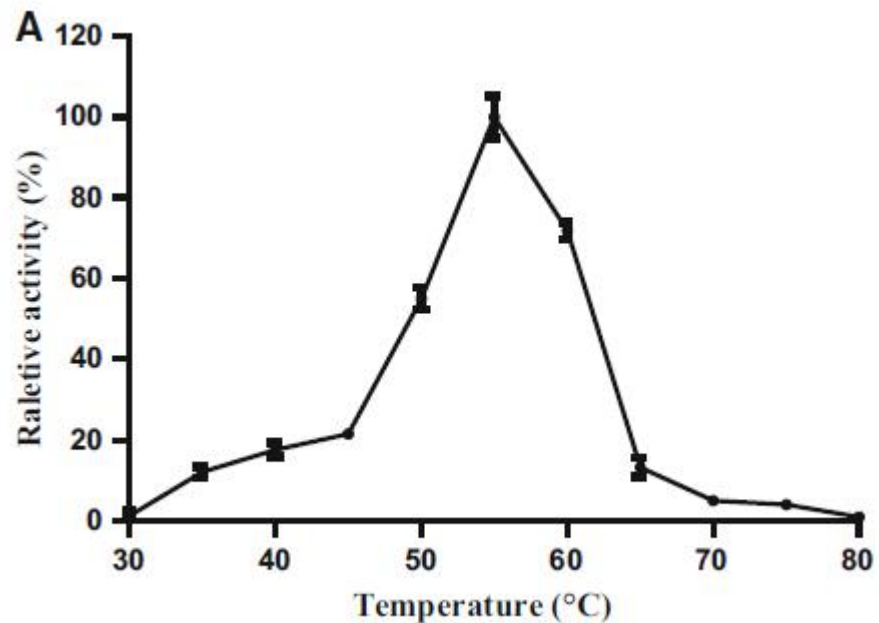
TrXyn10的三级结构类似于*C. japonicus* (PDB: 1US3) GH10家族结构域的endo β -1,4-木聚糖酶。像来自嗜热菌的其他木聚糖酶一样，这两种结构都有八倍的 $\beta\alpha$ -barrel结构。

表面电荷分析表明，大多数残留物带有负电荷。这与1US3 (4.80)和TrXyn10(5.05)低于7.0的理论值相符。

TrXyn10的三级结构与来自*Cellvibrio japonicus* (PDB: 1US3)的内切- β -1,4-木聚糖酶作为模板。**A** TrXyn10的三级结构。**B** *Cellvibrio japonicus*的内切- β -1,4-木聚糖酶的三级结构 (PDB: 1US3)。**C** TrXyn10表面电荷分布。**D** *Cellvibrio japonicus*的内切- β -1,4-木聚糖酶表面的电荷分布 (PDB: 1US3)。正电荷以蓝色表示，负电荷用红色表示。

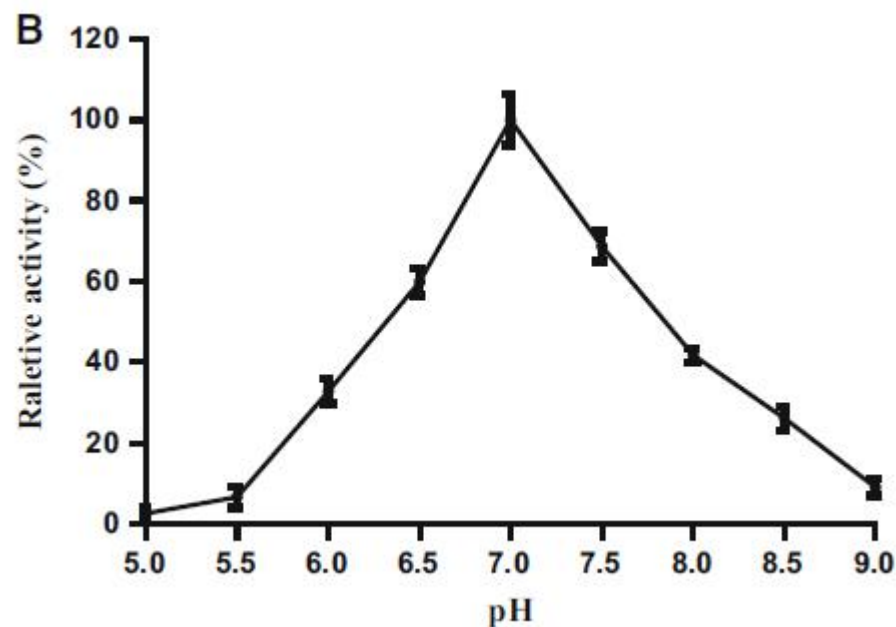
YIM 77501^T –TrXyn10 表征

a Temperature effect on the activity of TrXyn10.



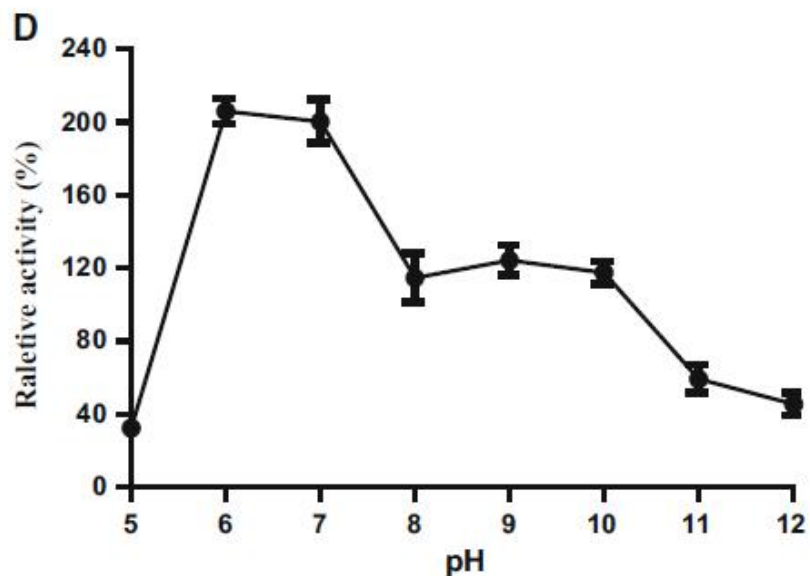
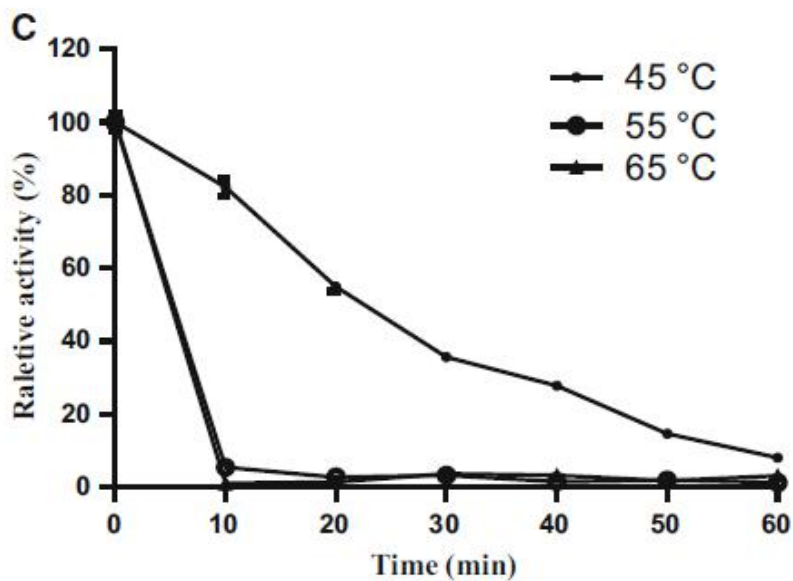
在55°C下观察到纯化的TrXyn10的最大活性，并且50-60°C显示出超过50%的活性，30-40°C的小于20%的活性。

b pH effect on the activity of TrXyn10.



TrXyn10的最佳pH为7.0，显示出从pH 6.5-8.0具40%以上的活性。

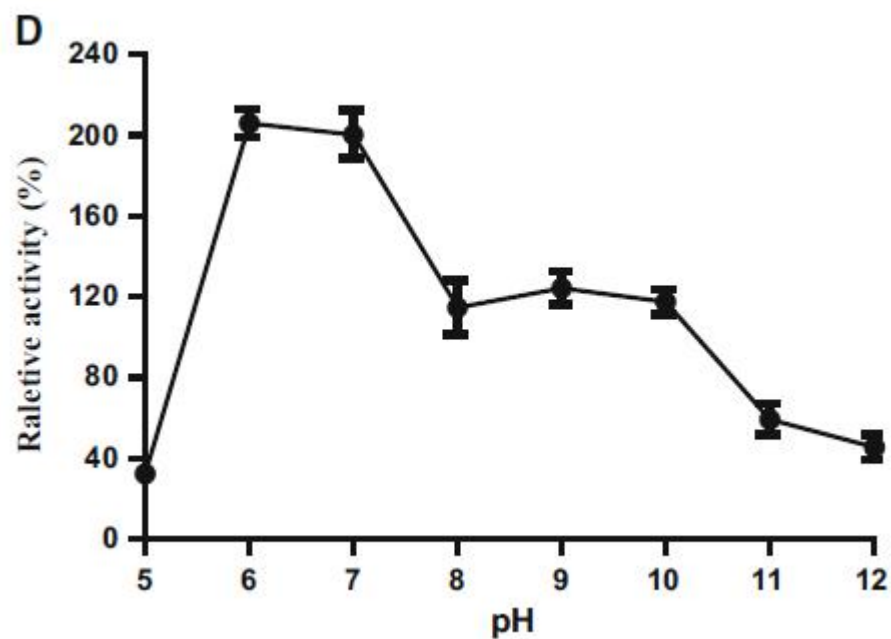
YIM 77501^T –TrXyn10 表征



c 不同温度(45,55和65°C)处理10,20,30,40,50和60分钟对稳定性的影响。 d pH对稳定性的影响。 pH稳定性试验通过在不同缓冲液体系中在4°C预温育12小时进行，然后在最佳测定条件(55°C，pH 7.0)下测定残留活性。

TrXyn10在45°C保留20%的初始活性的50%以上，但在55或65°C孵育10分钟时完全丧失活性。TrXyn10在45°C的半衰期(T_{1/2})为21分钟。从35-65°C，pH 5.5-9.0检测到TrXyn10的木聚糖酶活性；这意味着TrXyn10可能在菌株YIM 77501^T生长温度(28-60°C)和pH(6.0-8.0)(Zhou *et al.* 2012)中起作用。

YIM 77501^T –TrXyn10 表征



d pH对稳定性的影响。pH稳定性试验通过在不同缓冲液体系中在4°C预温育12小时进行，然后在最佳测定条件(55°C，pH 7.0)下测定残留活性。

pH稳定性结果表明：TrXyn10在pH 6.0-10.0稳定，保持了初始活性的110%，而在pH 5.0和12.0时，分别保持32%和45%（图2d）。在pH 6.0和7.0温育12小时后，活性大大提高（约为初始活性的约200%）。在工业过程中，酸或碱预处理广泛用于木聚糖底物制剂中，因此TrXyn10的酸碱稳定性是实际使用的基本信息。

YIM 77501^T –TrXyn10 表征

Table S1 Effects of metal ions and reagents on the activity of TrXyn10

Metal ions or chemical agents	Concentration	Relative activity (%)
No addition	0	100±1.9
Mn ²⁺	1 mM	68±1.9
Ag ⁺	1 mM	147±2.4
Ni ²⁺	1 mM	103±2.3
Cu ²⁺	1 mM	66±3.2
Ba ²⁺	1 mM	100±2.5
Na ⁺	1 mM	100±2.1
Al ³⁺	1 mM	78±3.2
K ⁺	1 mM	92±2.4
Zn ²⁺	1 mM	96±2.2
Li ⁺	1 mM	114±3.4
Co ²⁺	1 mM	105±3.5
Ca ²⁺	1 mM	4±1.3
Pb ²⁺	1 mM	2±0.5
Mg ²⁺	1 mM	2±0.8
Fe ³⁺	1 mM	90±2.2
Cd ²⁺	1 mM	71±3.5
SDS	1%	2±0.8
β-mercaptoethanol	1%	59±2.7
Triton X-100	1%	125±3.4
DMSO	1%	105±2.2
EDTA	1%	109±3.5
Towen80	1%	78±2
NaN ₃	1%	51±1.6
Urea	1%	72±3.5
PMSF	1 mM	78.5±2.8
NBS	1 mM	1±0.3

100% = 4.4 U/mg protein.

各种离子和螯合剂对TrXyn10有不同的影响。Pb²⁺，Mg²⁺和Ca²⁺离子抑制最多的酶活性，而Cu²⁺和Mn²⁺使酶活性降低34%和32%。Fe³⁺，K⁺，Cd³⁺和Al³⁺显示对酶活性的轻微抑制作用。在Na⁺，Ba²⁺存在下没有观察到显著的差异，Ni²⁺和Co²⁺，Li⁺和Ag⁺是酶促因子。然而，对于一些糖苷水解酶，在存在Li⁺和Ag⁺时酶活性降低 (Yin *et al.* 2015)。研究表明，Mg²⁺和Ca²⁺是木聚糖酶的启动子 (Zhang *et al.* 2008)；然而，在本研究中，超过96%的酶活性被Mg²⁺和Ca²⁺抑制。

YIM 77501^T –TrXyn10 表征

Table S1 Effects of metal ions and reagents on the activity of TrXyn10

Metal ions or chemical agents	Concentration	Relative activity (%)
No addition	0	100±1.9
Mn ²⁺	1 mM	68±1.9
Ag ⁺	1 mM	147±2.4
Ni ²⁺	1 mM	103±2.3
Cu ²⁺	1 mM	66±3.2
Ba ²⁺	1 mM	100±2.5
Na ⁺	1 mM	100±2.1
Al ³⁺	1 mM	78±3.2
K ⁺	1 mM	92±2.4
Zn ²⁺	1 mM	96±2.2
Li ⁺	1 mM	114±3.4
Co ²⁺	1 mM	105±3.5
Ca ²⁺	1 mM	4±1.3
Pb ²⁺	1 mM	2±0.5
Mg ²⁺	1 mM	2±0.8
Fe ²⁺	1 mM	90±2.2
Cd ²⁺	1 mM	71±3.5
SDS	1%	2±0.8
β-mercaptoethanol	1%	59±2.7
Triton X-100	1%	125±3.4
DMSO	1%	105±2.2
EDTA	1%	109±3.5
Towen80	1%	78±2
NaN ₃	1%	51±1.6
Urea	1%	72±3.5
PMSF	1 mM	78.5±2.8
NBS	1 mM	1±0.3

100% = 4.4 U/mg protein.

在测试的调节剂中，SDS抑制了最多的酶活性，而β-巯基乙醇和NaN₃分别降低了40%和50%的酶活性。Towen80，尿素和DMSO显示出极少或没有抑制酶活性。Triton X-100和EDTA是酶促因子。研究表明，Triton X-100和EDTA是一些木聚糖酶的抑制剂（Zhang *et al.* 2007, 2010）。而本研究中，Triton X-100和EDTA分别提高了25%和10%的酶活性。这表明木聚糖酶可能具有不同的催化机制，TrXyn10不是金属酶。PMSF（苯基甲磺酰氟）显示对酶活性略有抑制。在反应混合物中存在1mM NBS（N-溴代琥珀酰亚胺）几乎完全抑制酶的活性。这表明一些Ser和Trp残基可能是催化重要的氨基酸。

YIM 77501^T –TrXyn10 表征

Table 1 Substrate specificities of TrXyn10

Substrates	Relative activity (%)
Beechwood xylan	100 ± 2
Birchwood xylan	43 ± 2.2
Oatspelt xylan	158 ± 3.5
β-(1,3; 1,4)-glucan	0
Avicel cellulose	0
CMC	0
Citrus fruits pectin	0

All substrates were tested at 1% (w/v). 100% = 4.4 U/mg protein

重组TrXyn10可利用山毛榉，燕麦和桦木水解木聚糖，但不能降解β-（1,3; 1,4）葡聚糖，Avicel纤维素，CMC和柑橘类果实果胶。因此，TrXyn10是特定的木聚糖酶

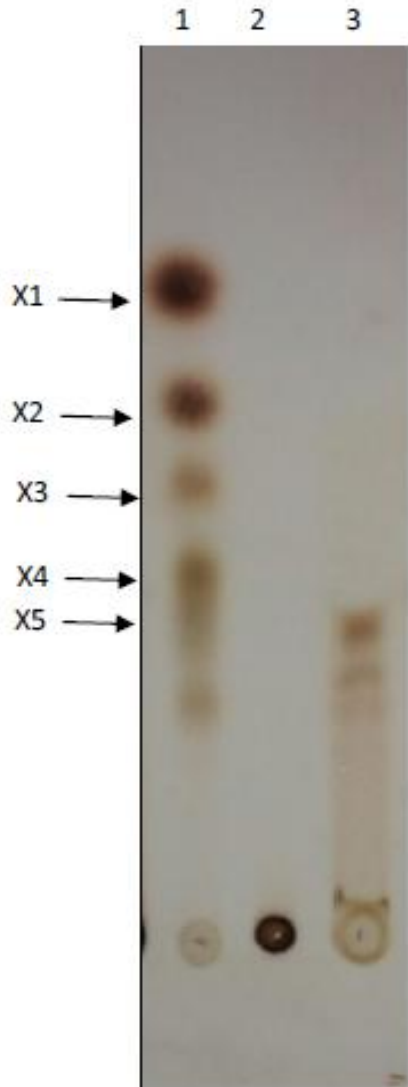
YIM 77501^T –TrXyn10 表征

Table 2 Kinetic parameters of TrXyn10

Parameters	Values
Substrate	Beechwood xylan
Optimal temperature	55 °C
Optimal pH	7.0
Specific activity	4.4 U/mg
K _m	47.7 mg/ml
V _{max}	29.6 μmol/min/mg
Molecular mass	46.1 kDa
K _{cat}	22.8 s ⁻¹

酶的动力学参数表明：TrXyn10的K_m值高达47.7 mg/ml，表明对底物的亲和力和低。一些研究表明，CBM的功能是增加不溶性底物表面的酶浓度（Shi *et al.* 2013）。序列和三级结构分析显示TrXyn10仅含有糖苷水解酶家族10的催化结构域，没有任何CBM。

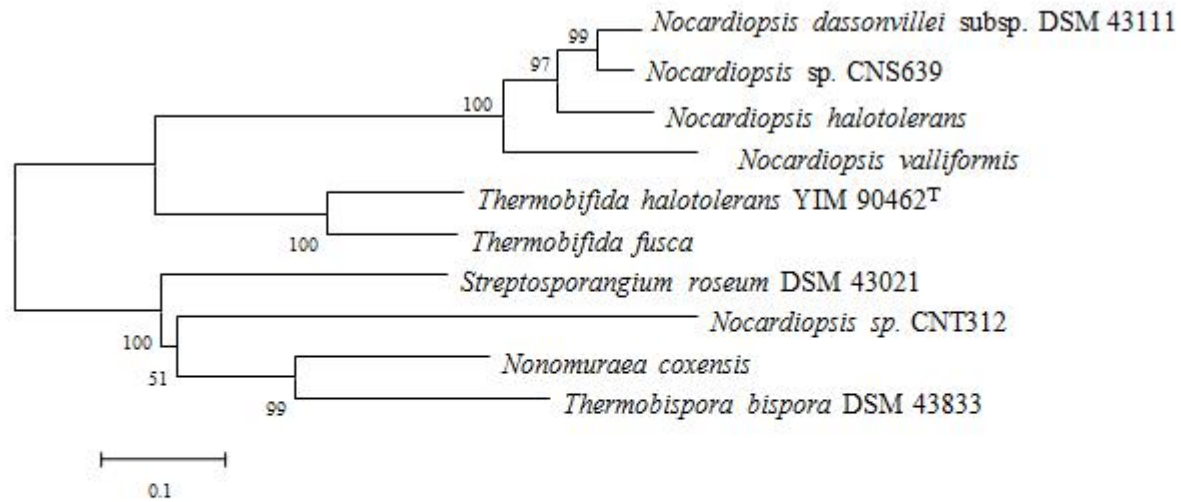
YIM 77501^T –TCL分析



标准是木糖(X1)，木二糖(X2)，木三糖(X3)，木四糖(X4)和木五糖(X5)。

由TrXyn10产生的山毛榉木聚糖的水解产物。如图3所示，在50°C 孵育1小时后，山毛榉木聚糖的主要产物是低聚木糖。这些结果表明 TrXyn10沿着木聚糖链随机切割，显示出内在型作用模式。

YIM 90462^T -Thcel6A的克隆、表达和纯化



Supplementary Fig. 1 Neighbor-joining tree of *ThCel6A* to other GH6 cellulases constructed using the amino acid sequences of them. Bootstrap values(n=1,000 replicates) are percentages in calculation.

克隆的DNA片段显示出来自*Thermobifida fusca* TM51的内切葡聚糖酶的最高氨基酸序列同一性(81%)。

YIM 90462^T -Thcel6A的克隆、表达和纯化

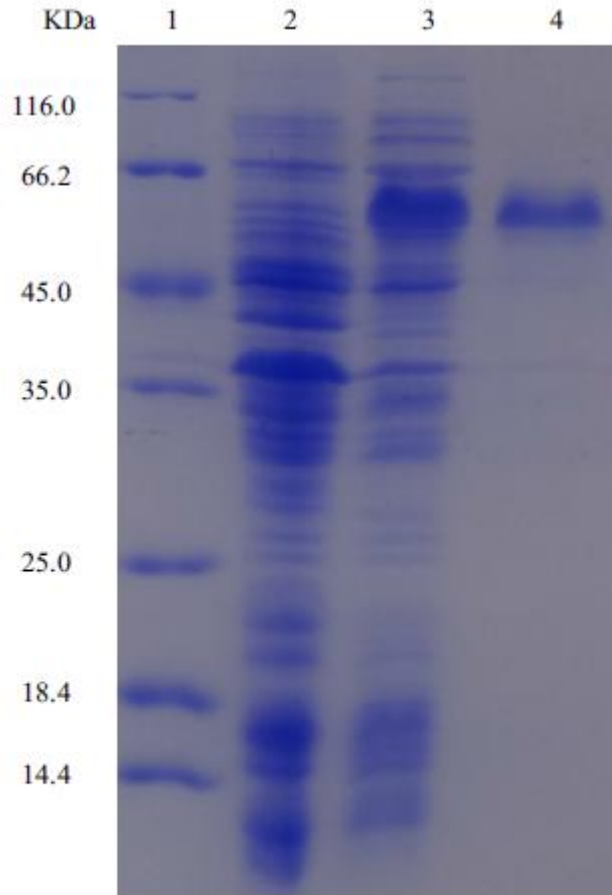
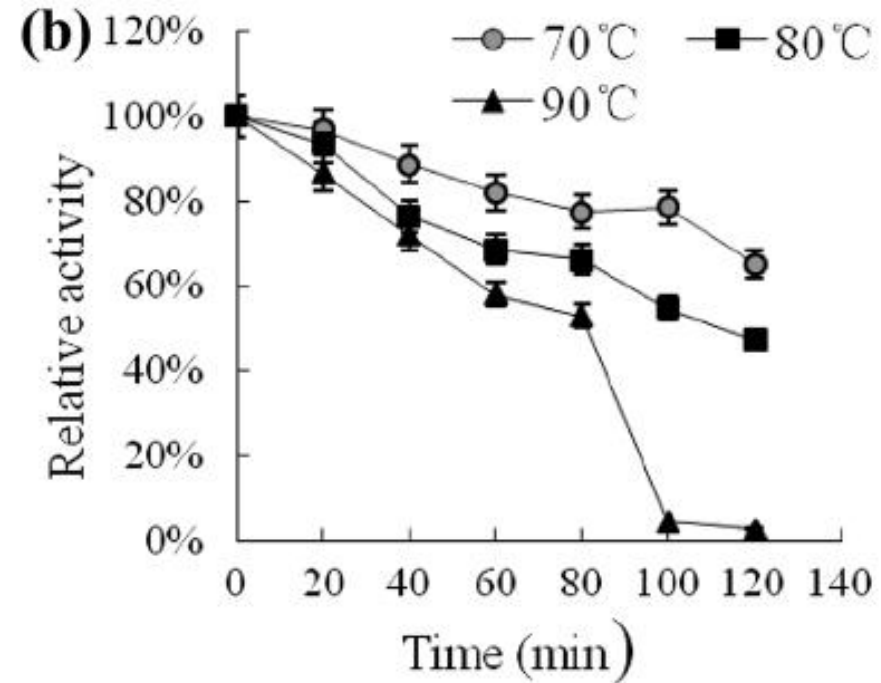
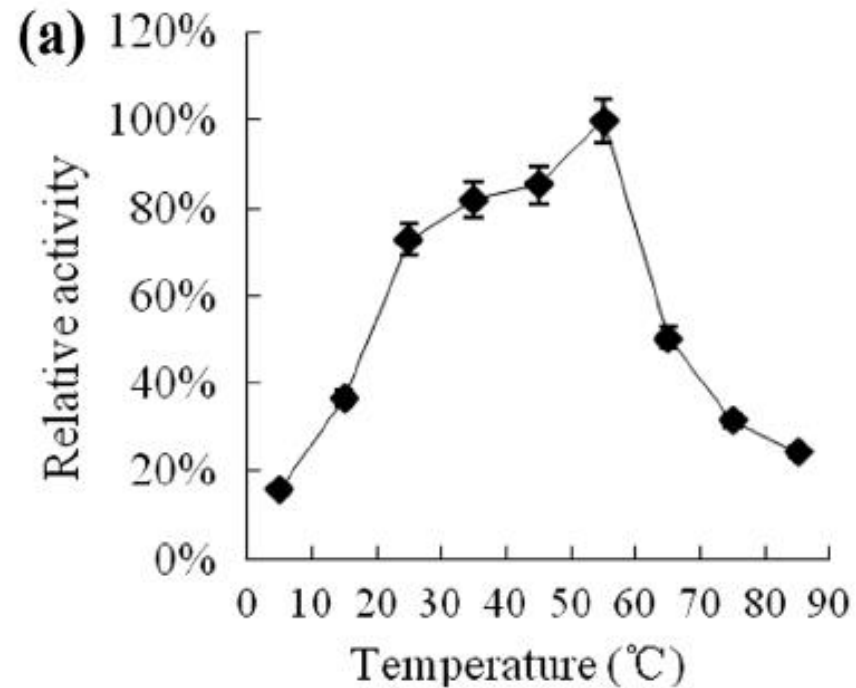


Fig. 1 Analysis of the recombinant protein Thcel6A on SDS-PAGE. *Lane 1*, protein weight marker (116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 kDa); *lane 2*, total protein in non-induced *E. coli* BL21/pET28a-Thcel6A; *lane 3*, total protein in IPTG-induced *E. coli* BL21/pET28a-Thcel6A; *lane 4*, purified ThCel6A

预测成熟蛋白质由443个氨基酸组成，分子量为45.9kDa，计算出的pI为4.31。

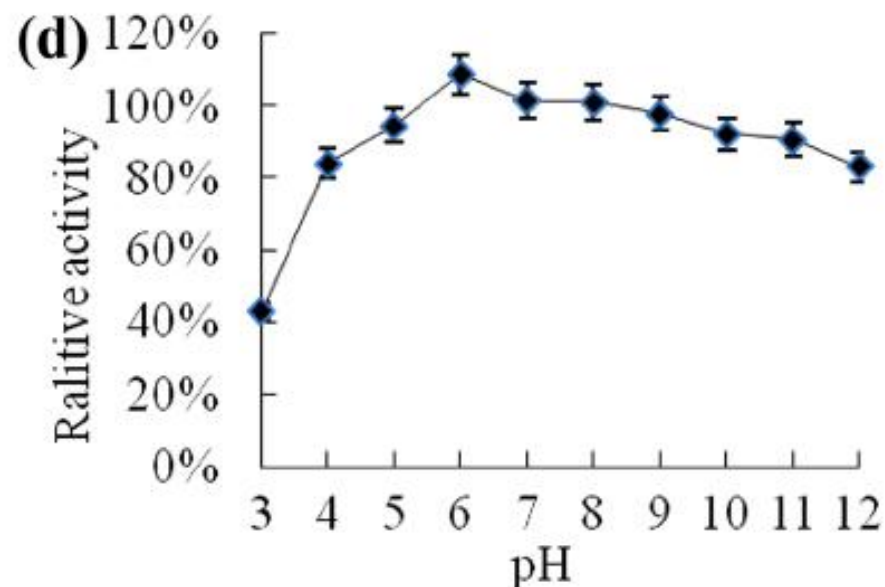
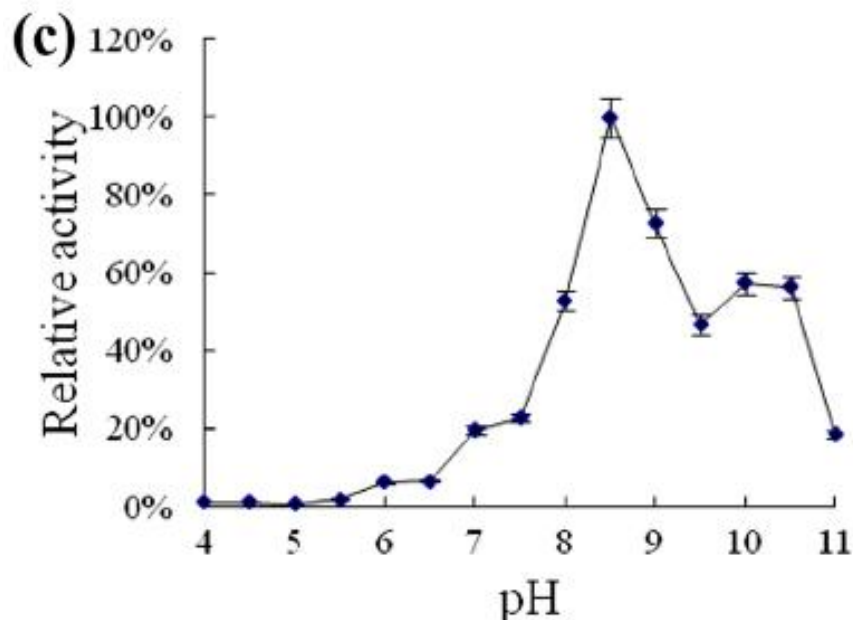
SDS-PAGE分析表明其分子量重组内切葡聚糖酶蛋白与理论值高度一致。

YIM 90462^T - 温度影响



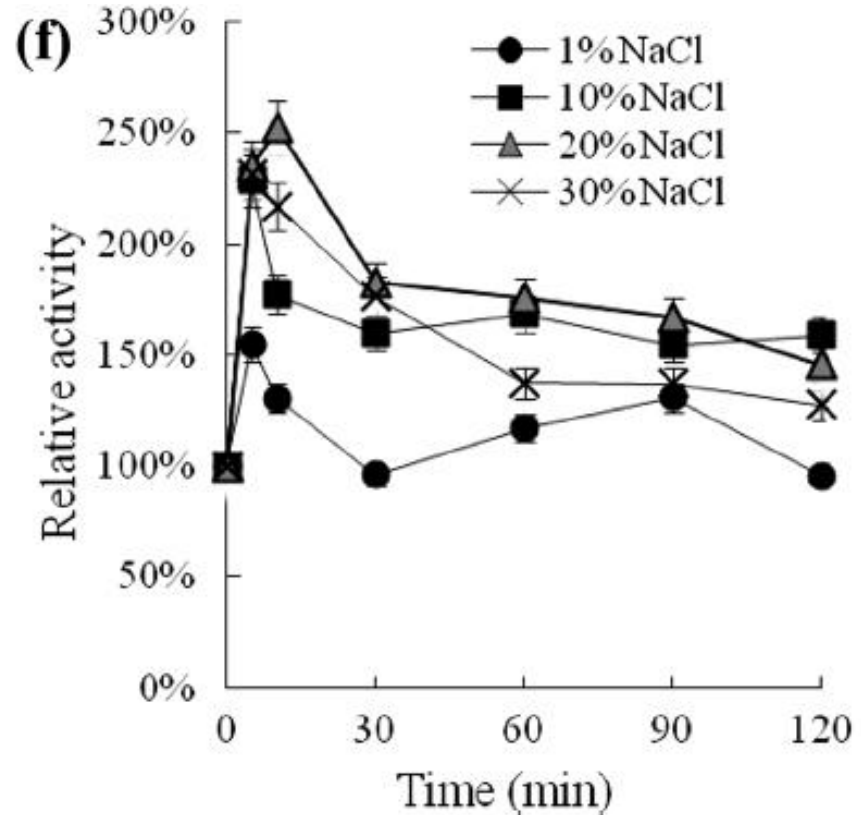
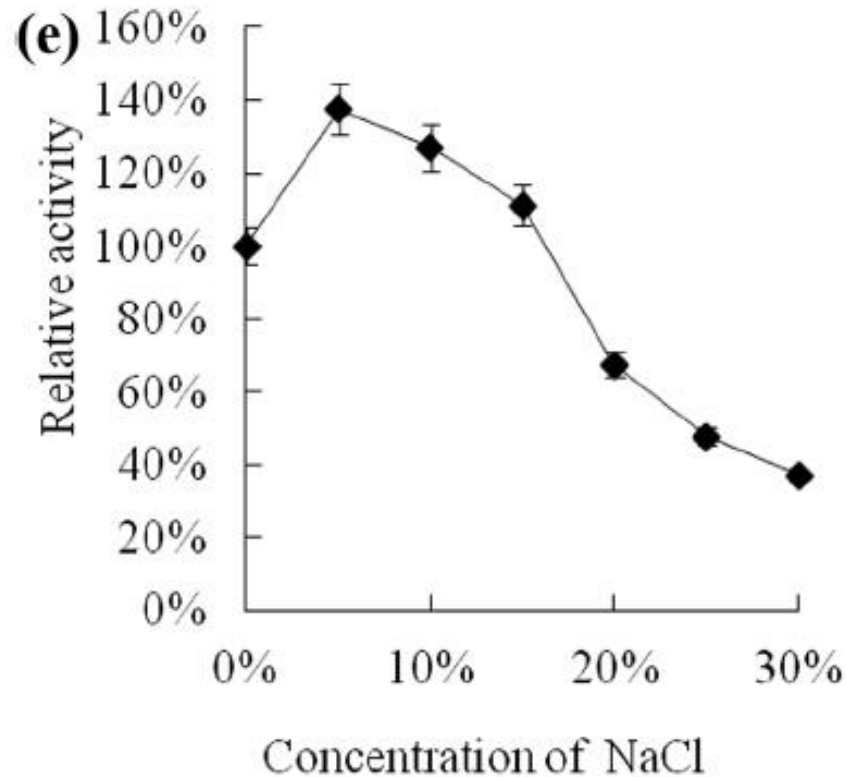
纯化的Thcel6A的最大活性为55°C。在25-55°C其显示高水解活性(70%)，并且在90°C孵育1小时后保留其初始活性的近60%。

YIM 90462^T - pH影响



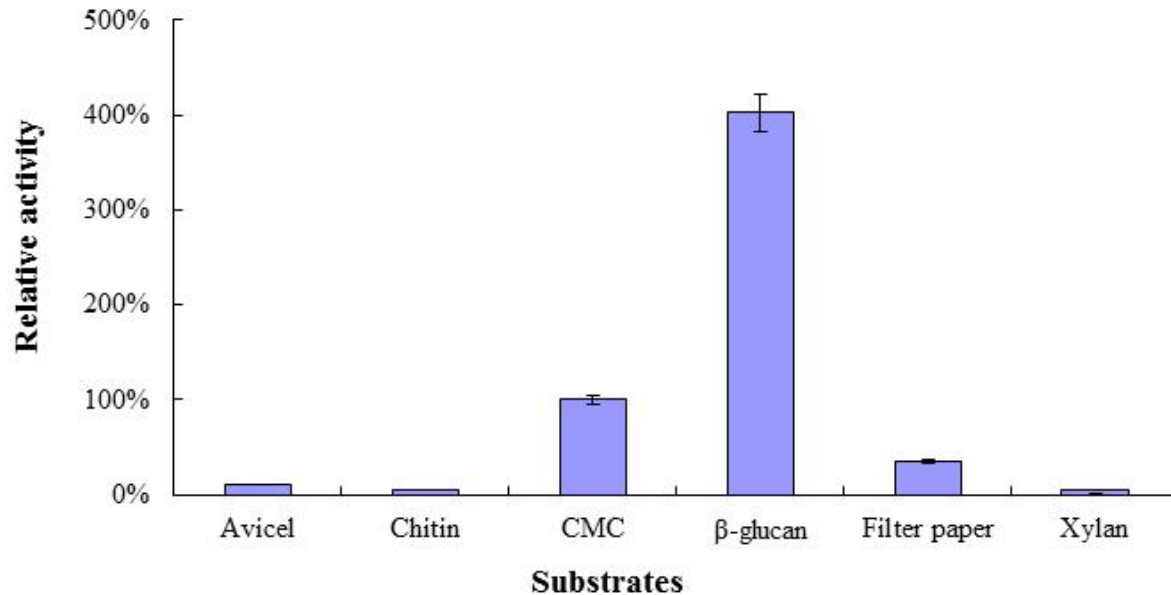
从BL21 (DE3) 纯化的Thc16A显示出从pH7.0到11.0的活性，在用0.5%CMC作为底物的30分钟酶测定中，在pH8.5(55°C) 检测到最佳值。在pH 4.0-12.0孵育12 h后检测到超过80%的残留活性。其功能条件与*T. halotolerans* YIM 90462T(20-50°C , pH 6-9)的培养条件相似(Yang *et al.*2008)。

YIM 90462^T - NaCl 影响



纯化的Thce16A的最大活性为5%(w/v)NaCl，并在0-20%NaCl显示出高水解活性(60%)。与20%NaCl孵育10分钟后，酶活性增加到252%，用10或30%NaCl洗涤5分钟孵育后增加到200%。

YIM 90462^T – 底物特异性



Supplementary Fig. 2 Substrate specificity of ThCel6A.

该酶显示对具有 β -1,4-葡聚糖键的底物的最高活性，例如CMC（活性为100%）和来自大麦的 β -葡聚糖（402%）。对微晶纤维素（<11%）和滤纸（36%）有较低的活性。该酶不能利用燕麦和几丁质为底物水解木聚糖。

Thcel6A代表GH6的经典内切葡聚糖酶。Thcel6A对CMC的 K_m 为80mg/ml， V_m 为312 μ M/mg。与其他内切葡聚糖相比，Thcel6A的 K_m 和 V_m 值高于来自枯草芽孢杆菌的新型内切葡聚糖酶(Zafar *et al.* 2014)。这表明Thcel6A具有较低的亲和力，但CMC的催化效率较高。

YIM 90462^T – 水解产物分析

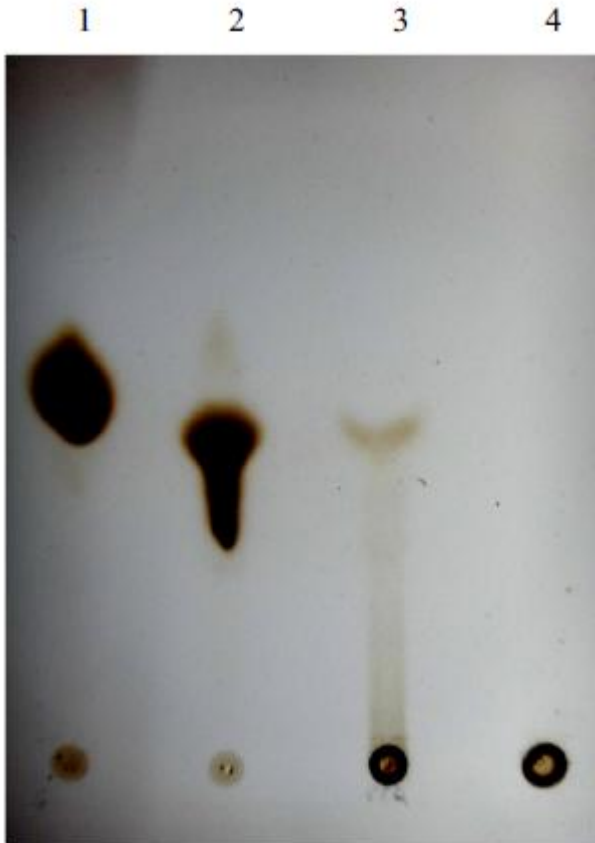


Fig. 3 Thin-layer chromatography showing the hydrolysis products obtained by the action of ThCel6A on CMC. Lane 1, Glucose; lane 2, cellobiose; lane 3, contains the reaction mix with ThCel6A; lane 4, contains the reaction mix without ThCel6A. All reactions were performed under standard conditions for 24 h

通过TLC分析了Thcel6A的CMC水解产物。在55°C孵育24小时后，CMC的主要酶产物为纤维二糖和寡糖。这些结果表明，Thcel6A随着沿着大肠杆菌寡糖链而切断，显示了内和外糖酵解作用模式。



Conclusion

YIM 77501^T

在本研究中，克隆了来自*T. rubra* YIM 77501^T的木聚糖酶TrXyn10基因，并在大肠杆菌BL21 (DE3) 中异源表达。据我们所知，这是关于从*T. rubra*鉴定的木聚糖酶的第一份报告。基于酶的性质和产品分析表明，TrXyn10是一种中性的木聚糖酶。

YIM 90462^T

我们克隆并表征了来自*T. halotolerans* YIM 90462^T的endo-1,4-葡聚糖酶。该酶是耐热，耐盐和碱稳定的。它在碱性条件下和NaCl存在下表现出良好的活性。在高浓度NaCl预处理后酶活性增加，这表明这种新型内切葡聚糖酶具有特定工业应用的潜力，并且作为研究关于蛋白质功能及渗透压的蛋白模型。



2017

敬请大家批评指正！