杨行, 张文姣, 闫协民, 等. 嗜热拟青霉耐热阿拉伯木聚糖酶的异源表达及其对麦芽糖化的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 189−196. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100013

YANG Hang, ZHANG Wenjiao, YAN Xiemin, et al. Heterologous Expression of a Thermostable Arabinoxylan Specific Xylanase from *Paecilomyces thermophila* and Its Application in Malt Mashing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 189−196. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100013

· 生物工程 ·

嗜热拟青霉耐热阿拉伯木聚糖酶的异源表达及其对麦芽糖化的影响

杨　行[1], 张文姣[2], 闫协民[1], 赵　伟[3], 江正强[2], 闫巧娟[1,*], 杨绍青[2,*]

（1.中国农业大学工学院, 北京 100083;
2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;
3.山东福洋生物科技股份有限公司, 山东德州 253199）

摘　要: 目的：发掘耐热木聚糖酶并探究其在麦芽糖化中的应用潜力。方法：克隆嗜热拟青霉（*Paecilomyces thermophila*）J18 木聚糖酶（*PtXynA*）基因，将其在黑曲霉中进行异源表达，在 5 L 发酵罐中采用液体深层发酵制备重组酶（PtXynA），进一步探究酶的酶学性质，最后评价重组酶在麦芽糖化中的应用效果。结果：重组菌经液体深层发酵 96 h 后，木聚糖酶的酶活力达到 904.0 U/mL，蛋白含量为 1.4 mg/mL。重组酶在 pH7.0 和 70 ℃ 下表现出最高酶活力，在 pH5.5~9.0 和 75 ℃ 以下保持稳定。PtXynA 显示出严格的底物特异性，对小麦阿拉伯木聚糖（1993.2 U/mg）的比酶活力最高，其次为燕麦木聚糖（1782.5 U/mg）、桦木木聚糖（1552.0 U/mg）和桦木木聚糖（1238.7 U/mg）。在麦芽糖化过程中添加木聚糖酶（200 U/g 麦芽），麦芽汁的过滤时间和黏度分别降低了 43.9% 和 10.8%。结论：PyXynA 具有优良的酶学特性，在啤酒糖化过程中显示出较大应用潜力。

关键词: 嗜热拟青霉, 异源表达, 嗜热木聚糖酶, 阿拉伯木聚糖酶, 麦芽糖化
中图分类号: Q814.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0189−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100013
本文网刊:

Heterologous Expression of a Thermostable Arabinoxylan Specific Xylanase from *Paecilomyces thermophila* and Its Application in Malt Mashing

YANG Hang[1], ZHANG Wenjiao[2], YAN Xiemin[1], ZHAO Wei[3], JIANG Zhengqiang[2], YAN Qiaojuan[1,*], YANG Shaoqing[2,*]

（1.College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
3.Shandong Fuyang Bio-tech. Co., Ltd., Dezhou 253199, China）

Abstract: Objective: This study aimed to identify thermostable xylanase suitable for mash malting. Methods: A xylanase encoding gene (*PtXynA*) from *Paecilomyces thermophila* J18 was cloned and heterologously expressed in *Aspergillus niger*. A submerged fermentation in a 5 L fermentor was performed for the production of the recombinant enzyme (PtXynA). The enzymatic properties of PtXynA were characterized and its application potential in mash malting was further evaluated. Results: A maximum extracellular xylanase activity of 904.0 U/mL with a protein content of 1.4 mg/mL was obtained after 96 h of fermentation. PyXynA was most active at pH7.0 and 70 ℃, respectively, and it was stable within the pH range of

收稿日期: 2024−10−08
基金项目: 国家重点研究计划（2022YFC2104900）。
作者简介: 杨行（1998−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: bs20223070639@cau.edu.cn。
*** 通信作者:** 闫巧娟（1971−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物质利用, E-mail: yanqj@cau.edu.cn。
杨绍青（1980−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶与发酵工程, E-mail: ysq@cau.edu.cn。

5.5~9.0 and at temperatures below 75 ℃. The enzyme displayed strict substrate specificity towards various xylans, with the highest specific activity towards wheat arabinoxylan (1993.2 U/mg), followed by oat spelt xylan (1782.5 U/mg), beechwood xylan (1552.0 U/mg) and birchwood xylan (1238.7 U/mg). The addition of PtXynA in mash (200 U/g malt) reduced the filtration time and viscosity of malt by 43.9% and 10.8%, respectively. Conclusion: The excellent properties may enable PyXynA great application potential in beer industry.

Key words: *Paecilomyces thermophila*; heterologous expression; thermophilic xylanase; arabinoxylanase; mash malting

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)是一类木聚糖水解酶,能够催化水解木聚糖分子内部的 β-1,4-糖苷键,释放出低聚木糖(Xylooligosaccharides, XOS)和木糖[1]。基于氨基酸序列相似性,木聚糖酶可以划分为不同的糖苷水解酶(Glycoside hydrolase, GH)家族,包括 GH 5、8、10、11 和 30,其中来源于 GH 11 家族的木聚糖酶研究的最多和最为深入[2]。木聚糖酶可广泛应用于 XOS 生产、面制品、烘焙食品、酿酒及果汁澄清等众多食品领域[3]。微生物是木聚糖酶的主要来源,但是天然微生物产木聚糖酶产量一般偏低,生产成本相对较高,无法满足工业化生产的需要[3]。采用生物工程技术异源表达是提高木聚糖酶产量的重要途径之一[4]。黑曲霉(*Aspergillus niger*)是最常用的丝状真菌表达宿主,已被美国食品与药品监管局(FDA)定义为 GRAS(Generally recognized as safe),同时,黑曲霉还具有 pH(2.0~11.0)和温度(10~50 ℃)稳定性好、环境适应性强等优点[5−6]。然而,由于其遗传背景复杂,目前在黑曲霉中成功表达的木聚糖酶种类仍然十分有限,且酶活力普遍较低[5,7−8]。

麦芽糖化是啤酒酿造过程中的一个重要工序[9]。阿拉伯木聚糖是麦芽中主要的非淀粉多糖之一,在麦芽糖化过程中会导致麦芽汁的黏度过高,引起滤膜堵塞,从而影响啤酒的颜色和外观[9−10]。因此,降低麦芽汁中阿拉伯木聚糖的含量或降低其分子量(降低黏度),对于提高啤酒的生产效率和质量具有重要的意义。阿拉伯木聚糖酶能够特异性水解阿拉伯木聚糖,将其降解为低黏度小分子或低聚糖,在麦芽糖化中具有潜在的应用价值[11]。通常,在啤酒糖化工艺中,麦芽汁需要在 70 ℃ 下保温 1 h 确保糖化完全,因此对木聚糖酶的热稳定性要求较高[9−11]。目前,虽然已有部分阿拉伯木聚糖酶的研究报道,但是高活力耐热型阿拉伯木聚糖酶的报道相对较少,如毛壳霉(*Chaetomium* sp.)[11]、樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea*)和嗜热拟青霉(*Paecilomyces thermophila*)木聚糖酶等[12]。因此,继续发掘具有高阿拉伯木聚糖酶活力的耐热木聚糖酶,对于提升麦芽糖化的效率具有重要的意义。

在实验室前期研究中,筛选得到一株丝状真菌——嗜热拟青霉 J18,从中发掘了一种耐热木聚糖酶(PtXynA)并成功将其在毕赤酵母中进行了异源表达[13−14]。为推进该酶在食品工业生产中的实际应用,本研究进一步构建了食品安全级黑曲霉表达系统,将该木聚糖酶基因在黑曲霉中进行了异源表达,探究了重组酶的酶学性质,并评价了该酶在麦芽糖化中的应用效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

嗜热拟青霉 J18　保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC, AS 3.6885);黑曲霉 GA(ΔglaA)　由本实验室构建并保存;桦木木聚糖、桦木木聚糖、燕麦木聚糖、小麦阿拉伯木聚糖、羧甲基纤维素(CMC)、大麦葡聚糖、刺槐豆胶、可溶性淀粉　美国 Sigma 公司;潮霉素(hygB)　北京百瑞极生物科技有限公司;几丁质　上海源叶生物科技有限公司;淡色艾尔大麦芽　憨酒匠酿酒坊;玉米淀粉水解物　实验室自制(利用加热煮沸的蒸馏水充分糊化淀粉,加入高温淀粉酶水解至液体呈蛋清状);除了特殊说明外,本实验所用其他化学试剂均为分析纯。

BGT-8 糖化仪　杭州博日科技有限公司;HAAKE 落球式粘度计　美国 Thermo Fisher Scientific;PCR 仪　美国 BIO-RAD 公司;QSFF 强阴离子交换柱　美国 Mettler Toledo。

1.2 实验方法

1.2.1　黑曲霉培养及表达载体构建　以嗜热拟青霉 J18 基因组 DNA 为模板,利用特异性引物 *PtxynA*F 和 *PtxynA*R(表 1)扩增得到木聚糖酶基因 *PtXynA*。扩增条件为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 20 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 25 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 5 min。采用 CzapekDox 培养基培养黑曲霉,培养基中添加 200 μg/mL 的潮霉素作为 hygB 标记物。使用吉布森组装法将目的片段连接到 Blunt-Pgla-pryG 表达质粒上,构建由 Pgla-PtxynA-TrpC 异源蛋白表达盒和 PgpdA-pryG-Tgla 抗性标签表达盒组成的表达载体。吉布森组装反应体系为 1μL PtxynA,4μL Blunt-Pgla-pryG 和 5μL 2×NEBuilder Mix,孵育温度和时间分别为 50 ℃ 和 15 min。将构

表 1　使用的所有引物的序列

Table 1　Sequences of all primers used

引物	序列
*PtxynA*F	TCGTCTGCACAGGGTTGGCATTCCCGACAGGGAATACTACGGA
*PtxynA*R	TGATTTCAGTAACGTTAAGTTTAGCCGACGTCAGCGACG
*TrpC*R	GTTACTATTGTATACCCATCTTAGT
RV-M	GAGCGGATAACAATTTCACAC
YZ-Pgla-F	CTGAAGTGCTTCCTCCCTTTTAGACGC
YZ-Pgla-R	TGGACAAATGAACGTATCTTATCGAGATCCT

建的表达载体 Blunt-pryG-PtxynA 转化至克隆宿主 *E. coli* DH5α，采用菌落 PCR 验证阳性大肠杆菌转化子，验证引物为 *TrpC*R 和 *RV-M*（表 1）。从测序结果正确的转化子中提取质粒并进行双酶切，400 μL 酶切体系为：350 μL 重组质粒，40 μL Cutsmart buffer，5 μL XhoI 和 5 μL NotI，37 ℃酶切过夜，最后将酶切后的质粒醇沉回收。

1.2.2　木聚糖酶基因 *PtXynA* 在黑曲霉中的异源表达　原生质体制备：在 30 ℃ 下利用 DPY 培养基培养黑曲霉菌株，培养 3 d 后抽滤去除培养基收集菌体。取适量菌体加入裂解液，裂解 2~3 h。镜检观察直至大部分菌丝裂解形成原生质体。

原生质体纯化：裂解的原生质体离心（3000×g，5 min），收集沉淀，加入 20 mL STC 缓冲液洗涤原生质体，重悬后于 4 ℃ 离心 15 min。重复一次后加入 0.6 mL STC 重悬备用。

原生质体 PEG 介导转化：分别设置对照组、试验组和再生组。对照组：160 μL 原生质体+100 μL STC+60 μL PEG。试验组：160 μL 原生质体+100 μL 线性化质粒+60 μL PEG。再生组：160 μL 原生质体+100 μL STC+60 μL PEG。不同试验组混匀后分别冰水浴 30 min。每组加入 1 mL 的 PEG 于室温下静置 25 min。

倾注培养：将 3 mL STC 和 6 mL 蔗糖 CD 高渗软琼脂于离心管中混匀。将对照组、试验组和再生组分别转移至离心管中，并向试验组和对照组中加入终浓度为 300 μg/mL 的 hygB。混匀后倒入蔗糖 CD 高渗平板，涂布均匀后于 30 ℃ 培养 3~4 d。

转化子鉴定：对在 CD 高渗平板上生长的转化子设计验证引物 *YZ-Pgla*-F 和 *YZ-Pgla*-R（表 1）。对基因型测序正确的转化子进行摇瓶发酵，于 34 ℃、200 r/min 下培养 144 h。离心（10000 r/min，10 min）取上清液测定木聚糖酶活力。

1.2.3　黑曲霉液体深层发酵产酶及重组酶纯化　选取摇瓶发酵木聚糖酶活力最高的转化子进行液体深层发酵。吸取 300 μL 菌液于 300 mL DPY 培养基中，34 ℃、200 r/min 培养 4 d。

将 300 mL 种子液接种到装有 2.7 L 黑曲霉发酵培养基的 5 L 发酵罐中。发酵过程中培养温度控制 34 ℃，用氨水和磷酸调节培养基 pH5.5，通过调节转速和空气流量控制溶氧大于 20%，同时保持罐压 0.04 MPa。在发酵 0~60 h 内保持转速 300 r/min，60 h 后将转速提高至 500 r/min 并维持至木聚糖酶活力增长停滞。采用间歇式流加方式补料，每 24 h 补料 200 mL 玉米淀粉水解物（500 g/L）。每 12 h 吸取发酵液样品，10000×g 离心 3 min，测定菌体湿重及上清液的酶活力和蛋白浓度。菌体湿重为 1 mL 粗酶液离心后沉淀的重量（实验结果换算成 g/L）。

发酵结束后离心（10000×g，10 min）收集上清液即为粗酶液。将粗酶液透析后上样于用 20 mmol/L pH7.0 MOPS 缓冲液平衡的 Q-Sepharose FF 层析柱。首先用 6 倍柱体积的 20 mmol/L pH7.0 MOPS 缓冲液洗脱未结合和吸附不牢固的蛋白，然后用 0~500 mmol/L 的 NaCl（含 20 mmol/L pH7.0 MOPS 缓冲液）溶液线性洗脱，测定各收集部分的酶活力，采用 SDS-PAGE 法检测具有酶活性组分的纯度。整个纯化过程中缓冲液流速为 1 mL/min。

1.2.4　木聚糖酶酶活力和蛋白浓度测定　木聚糖酶的酶活力采用 DNS 法测定[15]。在 900 μL（1%，w/v）桦木木聚糖底物溶液（用 50 mmol/L pH7.0 MOPS 缓冲液配制）中加入 100 μL 适当稀释后酶液（用 50 mmol/L pH7.0 MOPS 缓冲液），70 ℃ 下反应 10 min。反应结束后立即加入 1 mL DNS 试剂终止反应，沸水加热 15 min 显色，最后加入 1 mL 40% 酒石酸钾钠溶液，冷却后在 540 nm 下测定吸光值。木聚糖酶的酶活力定义为在以上反应条件下每分钟反应生成 1 μmol 还原糖（以木糖作为标准计算）所需要的酶量为 1 个酶活力单位。比酶活力的定义为 1 mg 蛋白所具有的酶活力。

蛋白浓度的测定：参照 Lowry 法测定[16]，以牛血清蛋白作为标准蛋白。

1.2.5　PtXynA 的酶学特性及底物特异性　最适 pH 测定：在 70 ℃，50 mmol/L 不同 pH 缓冲液（柠檬酸盐缓冲液：pH3.0~6.0；乙酸钠缓冲液：pH4.0~6.0；MES 缓冲液：pH5.5~6.5；MOPS 缓冲液：pH6.5~7.5；PB 缓冲液：pH6.0~8.0；Tris-HCl 缓冲液：pH7.0~9.0；CHES 缓冲液：pH9.0~11.0）中测定 PtXynA 纯酶的酶活力，以最高酶活力为 100%，计算不同 pH 下的相对酶活力。

最适温度测定：在不同温度下（40~90 ℃，每 5 ℃ 为一个梯度）测定 PtXynA 的酶活力，以最高酶活力为 100%，计算不同温度下的相对酶活力。

pH 稳定性测定：将纯化后的 PtXynA 用不同 pH 缓冲液（柠檬酸盐缓冲液：pH3.0~6.0；乙酸钠缓冲液：pH4.0~6.0；MES 缓冲液：pH5.5~6.5；MOPS 缓冲液：pH6.5~7.5；PB 缓冲液：pH6.0~8.0；Tris-HCl 缓冲液：pH7.0~9.0；CHES 缓冲液：pH9.0~11.0）稀释，在 70 ℃ 水浴中保温 30 min 后按照 1.2.4 测定残余酶活力，以未经处理酶液的酶活力为 100%。

温度稳定性测定：将纯酶用 50 mmol/L pH7.0 的 MOPS 缓冲液适当稀释，在不同温度下（40~80 ℃，每 5 ℃ 为一个梯度）孵育 30 min，然后于冰水浴中保温 30 min 后按照 1.2.4 测定残余酶活力。半衰期的测定：将纯酶液用 50 mmol/L pH7.0 的 MOPS 缓冲液适当稀释后置于 70~80 ℃ 水浴中保温 4 h，分别于 15、30、60、120、180 和 240 min 定时取样，冷却至室温后在最适条件下测定残余酶活力。以未经处理酶液的酶活力为 100%，计算残余酶活力所占百分比。以时间为横坐标，Ln（相对酶活力）为纵坐标。

底物特异性：用 50 mmol/L pH7.0 的 MOPS 缓

冲液配制不同种类的聚糖类底物(1%, w/v), 按照 1.2.4 测定酶活力, 以 PtXynA 对桦木木聚糖的酶活力为 100%, 分别计算 PtXynA 对各种底物的相对酶活力。测定的聚糖类底物包括桦木木聚糖、桦木木聚糖、燕麦木聚糖、小麦阿拉伯木聚糖、羧甲基纤维素(CMC)、大麦葡聚糖、刺槐豆胶、可溶性淀粉和几丁质。

1.2.6 PtXynA 三维结构分析 采用 Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/)建立 PtXynA 的三维立体结构。利用蛋白数据库(PDB; http://www.rcsb.org/)下载木聚糖酶 EnXyn11A(PDB2vgd)的结构信息。使用 Pymol 软件(http://www.pymol.org)将 PtXynA 和 EnXyn11A 结构叠加, 分析底物结合位点和结构特征。

1.2.7 PtXynA 在麦芽糖化中的应用 麦芽糖化参照前期研究方法[11]进行。在每个糖化杯中添加 50 g 麦芽细粉、纯酶 PtXynA(125、150、175、200、225 和 250 U/g)和 200 mL 预热至 45 ℃ 的蒸馏水, 45 ℃ 保温 30 min。然后以每分钟 1 ℃ 的速率升温至 70 ℃, 再往糖化杯中加入 100 mL 已预热至 70 ℃ 的蒸馏水并在 70 ℃ 下保温 1 h。糖化结束后迅速将麦芽汁冷却至室温, 用蒸馏水将醪液补重至 450.0 g, 然后用中速滤纸过滤, 参照刘学强等[9]的方法测定过滤速度和滤液黏度。其中黏度(η)、黏度降低百分比($\Delta\eta$)和过滤时间减少百分比($\Delta\tau$)分别由以下公式计算得到。

$$\eta = K\times(\rho_1-\rho_2)\times t \quad 式(1)$$

$$\Delta\eta = (\eta_{对照}-\eta)/\eta_{对照} \quad 式(2)$$

$$\Delta\tau = (\tau_{对照}-\tau)/\tau_{对照} \quad 式(3)$$

式中: K 为黏度计模量(10.06 μPa·s·cm^3/g·s), $\rho1$ 为落球密度(2.221 g/cm^3), $\rho2$ 为麦芽汁在 20 ℃ 下的密度(g/cm^3), t 为落球时间(s), $\eta_{对照}$为不添加木聚糖酶组的黏度, $\tau_{对照}$为不添加木聚糖酶组的过滤时间(s)。

1.3 数据处理

数据处理和图片绘制均采用 Origin 8.0 进行, 数据均取 3 次实验的平均值。显著性分析使用 SPSS 26.0 对数据进行 Duncan 多重比较, 显著性水平确定为 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 表达载体构建及黑曲霉异源表达

以嗜热拟青霉的 cDNA 为模板, 通过特异性引物 *PtxynA*F 和 *PtxynA*R 成功扩增出 *PtxynA* 基因序列。扩增得到的序列通过吉布森组装成功连接到表达质粒上, 得到表达载体 Blunt-pryG-PtxynA (图 1a)。*PtXynA* 基因全长为 678 bp, 编码 226 个氨基酸。对在 CD 高渗平板上生长的转化子设计验证引物, 菌落 PCR 结果显示成功从转化子中提取得到木聚糖酶基因(*PtXynA*)(图 1b)。对测序正确的转化子发酵 6 d 后, 上清液中木聚糖酶活力最高为 168 U/mL(图 2)。挑选木聚糖酶活力最高的转化子用于后续液体深层发酵。

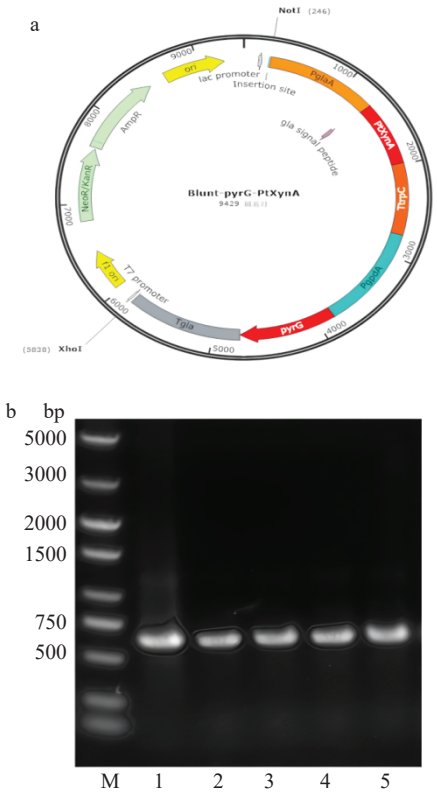


图 1 PtXynA 的表达载体图谱(a)和阳性转化子 PCR 扩增产物(b)

Fig.1 Expression vector map of PtXynA (a) and PCR amplification products of positive transformants (b)

注: M: 标品; 1~5: 部分 PtXynA 阳性转化子扩增产物。

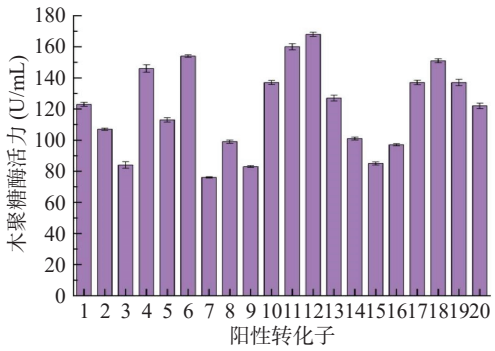


图 2 不同转化子发酵上清液木聚糖酶活力

Fig.2 Xylanase activity in the supernatant of fermentation of different transformants

2.2 黑曲霉液体深层发酵产酶及重组酶纯化

液体发酵 96 h 时, 发酵上清液中木聚糖酶活力最高, 达到 904.0 U/mL, 此时蛋白浓度为 1.4 mg/mL (图 3)。PtXynA 经 QSFF 强阴离子交换层析柱纯化后得到电泳级纯酶(图 4), 酶活力回收率为 81%。该酶在电泳图上显示为一条清晰条带, 分子量约为 24.6 kDa(图 4)。PtXynA 纯酶的比酶活力提高到 1254 U/mg。

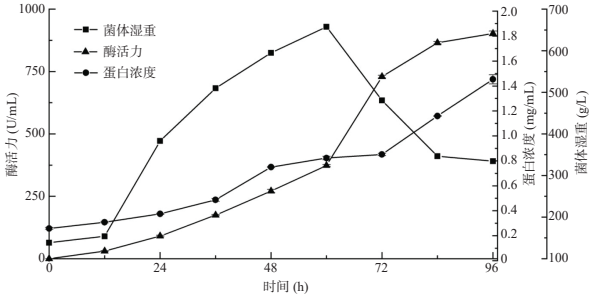


图 3　重组黑曲霉液体深层发酵产 PtXynA 发酵过程

Fig.3　Fermentation process of PtXynA produced by liquid deep fermentation of recombinant *A. niger*

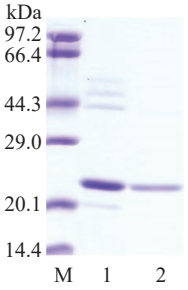


图 4　木聚糖酶 PtXynA 纯化电泳分析

Fig.4　SDS-PAGE analysis of proteins during the purification process of PtXynA

注：泳道 M：低分子量标准蛋白；泳道 1：粗酶液；泳道 2：纯酶液。

目前，已经有许多木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中实现了异源表达[4]。黑曲霉作为一种食品安全的丝状真菌，也常被用作异源表达宿主[15]。然而，由于其遗传背景的复杂性，目前在黑曲霉中成功表达的木聚糖酶种类仍然十分有限[7–8]。PtXynA 在 5 L 发酵罐中经 96 h 深层发酵后，木聚糖酶活力达到 904 U/mL，这一产量高于其他部分丝状真菌表达的木聚糖酶，如来源于葡萄穗菌（*Stachybotrys chartarum*）的木聚糖酶在黑曲霉中异源表达，比酶活力为 392 U/mg[8]。Decelle 等[7] 将来源于黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chyrsoporium*）的三个木聚糖酶基因在黑曲霉中表达，酶活力分别为 0.47、1.22 和 3.17 U/mL。此外，PtXynA 的发酵酶活力也高于部分在毕赤酵母中表达的木聚糖酶，如来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）的木聚糖酶 XynA（33.7 U/mL）[17] 和来源于镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）Fo47 的木聚糖酶 FXYL（779.64 U/mL）[18]。

2.3　PtXynA 的酶学特性

PtXynA 的最适 pH 和最适温度分别为 pH7.0（MOPS 缓冲液）（图 5a）和 70 ℃（图 5b）。该酶在 pH5.5~9.0 范围内保持稳定，不同 pH 缓冲液处理 30 min 后残余酶活力基本上>80%（图 5c）。该酶在≤75 ℃ 下保持稳定，保温 30 min 后酶活力>80%（图 5d）。PtXynA 在 70、75 和 80 ℃ 下的半衰期分别为 211、72 和 39 min（图 5e）。

优良的酶学性质是木聚糖酶能否工业化应用的前提。PtXynA 在 pH5.5~9.0 范围内保持稳定，这一稳定范围比多数其他来源木聚糖酶要宽，如瘤胃宏基因组（*Rumen metagenome*，pH4.0~7.0）[6]、北方炭疽菌（*Colletotrichum boninense*，pH4.0~6.0）[19] 以及链霉菌 T7（*Streptomyces* sp. T7，pH5.0~8.0）木聚糖酶[20]。较宽的 pH 稳定性范围使 PtXynA 能够更好地应对反应体系中 pH 的波动，提高其应用适应范围。热稳定性是影响木聚糖酶工业应用的另一个重要因素[21]。较高的耐热温度不仅有利于提高酶催化

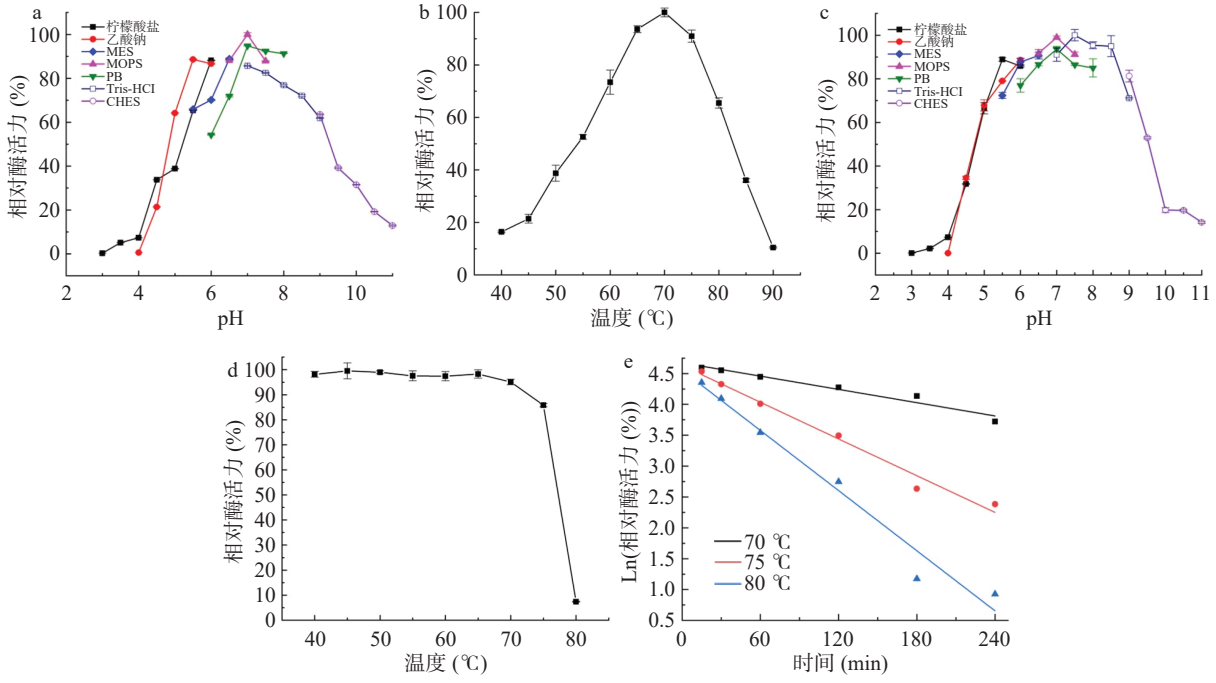


图 5　PtXynA 的最适 pH（a）、最适温度（b）、pH 稳定性（c）、温度稳定性（d）及半衰期（e）

Fig.5　Optimal pH (a), optimal temperature (b), pH stability (c), thermal stability (d) and thermal denaturing half-lives (e) of PtXynA

反应速度，提高生产效率，而且还可有效避免反应过程中杂菌的污染。此外，某些应用场景更是需要耐热性优良的特异性木聚糖酶，例如麦芽糖化和烘焙食品加工中[21−23]。研究表明，相同的基因在不同表达系统中展现的酶学性质有所差异[24−25]，这可能是由于不同表达宿主会进行不同的蛋白修饰，如糖基化[26]。PtXynA 在黑曲霉中表达展现出更好的热稳定性，在≤75 ℃ 时保持稳定，70 ℃ 下的半衰期达到 211 min（图 5）。这一特性显著优于目前已报道的多数青霉属木聚糖酶，如变异拟青霉（*P. variotii*）木聚糖酶在 60 ℃ 下保持稳定[27]，同属于变异拟青霉 ATHUM 8891 的木聚糖酶在 65 ℃ 下保持稳定[28]，铜绿拟青霉（*P. aerugineus*）木聚糖酶在 55 ℃ 下保持稳定[26]。但 PtXynA 的热稳定性仍然低于其他几种极端嗜热菌来源木聚糖酶，如海栖热袍菌（*Thermotoga maritima*）耐热木聚糖酶 TmXyn10B（90 ℃ 下保持稳定）等[29]。

2.4 PtXynA 底物特异性

PtXynA 表现出严格的木聚糖底物特异性，其中对小麦阿拉伯木聚糖的比酶活力最高（1993.2 U/mg），其他依次为燕麦木聚糖（1782.5 U/mg）、桦木木聚糖（1552.0 U/mg）和桦木木聚糖（1238.7 U/mg）。该酶对其他测试的非木聚糖类底物没有显示出水解活性（表 2）。

表 2 PtXynA 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of PtXynA

底物	比酶活力（U/mg）	相对酶活力（%）
桦木木聚糖	1552.0±75	100
桦木木聚糖	1238.7±36	80
燕麦木聚糖	1782.5±19	115
小麦阿拉伯木聚糖	1993.2±44	128

注：PtXynA对CMC、大麦葡聚糖、刺槐豆胶、可溶性淀粉和几丁质没有水解活性。

阿拉伯木聚糖由于在其分子骨架上存在大量阿拉伯糖基侧链，通常会阻碍普通木聚糖酶对其主链分子的水解，导致水解效率降低。本研究中的木聚糖酶 PtXynA 对小麦阿拉伯木聚糖具有较高的比酶活力。目前仅有少数木聚糖酶对阿拉伯木聚糖表现出较高的水解活性，例如毛壳霉木聚糖酶 CsXynAop（1850 U/mg）[11]、镰刀菌属 21（*Fusarium* sp.）木聚糖酶（456 U/mg）[30] 和海栖热袍菌木聚糖酶（1565 U/mg）[9]。PtXynA 对小麦阿拉伯木聚糖的高水解活性，使其在麦芽糖化、面包等富含阿拉伯木聚糖的食品生产中具有重要的应用潜力。

2.5 PtXynA 的结构分析

PtXynA 的三维结构呈现右手半握状，由两个 β-折叠片和一个 α 螺旋组成，是典型的 GH 11 家族木聚糖酶结构[2]。其催化凹槽是 β-折叠片层部分扭曲从而在空间结构一侧形成的裂缝。两个位于催化凹槽内部的谷氨酸残基（Glu98 和 Glu190）是该酶催化活性的关键氨基酸（图 6a）。

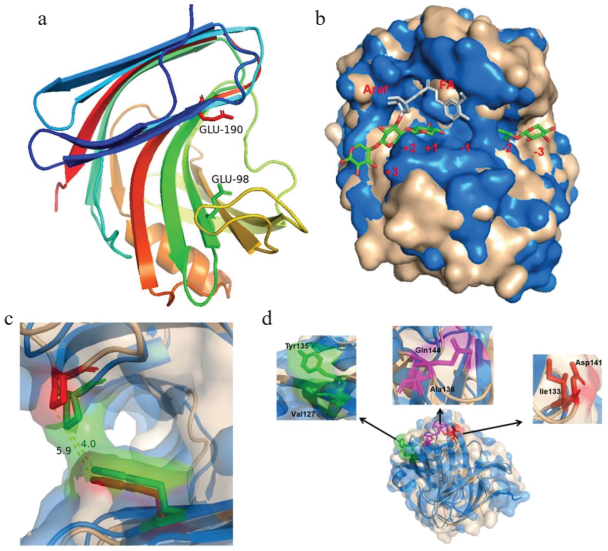


图 6 PtXynA 的三维结构模拟图

Fig.6 Simulation of three-dimensional structure of PtXynA

注：a：PtXynA 三维结构，两个催化氨基酸呈现棒状；b：PtXynA（金色）和 EnXyn11A（蓝色）的结构叠加；c：PtXynA 和 EnXyn11A 催化中心高度的比较；d：PtXynA 和 EnXyn11A 催化区域氨基酸变化比较。

为了揭示 PtXynA 高阿拉伯木聚糖底物特异性的内在机制，将其结构与典型的 GH 11 家族木聚糖酶 EnXyn11A 的底物复合物结构（PDB 2vgd.1）[31] 进行了叠加分析。通过比较发现，PtXynA 与其他 GH11 家族木聚糖酶的底物结合位点上存在显著差异：PtXynA 的底物结合位点可以容纳 6 个木糖单位（图 6b），而其他大多数已报道 GH 11 家族木聚糖酶的底物结合位点一般仅可容纳 5 个木糖单位[31]。比较催化中心的高度和氨基酸序列发现，PtXynA（5.9 Å）的催化区高度明显高于 EnXyn11A（4.0 Å）[32]（图 6c），更高的催化区域可能更有利于酶与带有侧链的木聚糖结合，进而赋予 PtXynA 更高的阿拉伯木聚糖催化活力。通过二者催化区域附近的氨基酸比较，可以发现 EnXyn11A 的三个疏水氨基酸（Val127、Ala136 和 IIe133）对应于 PtXynA 的两个亲水氨基酸（Gln144 和 Asp141）和一个疏水氨基酸（Tyr135）（图 6d）。木聚糖酶催化区内亲水氨基酸与酶催化活性高低密切相关[33]。如 Boonyapakron 等[34] 对木聚糖酶 X11 进行了随机突变，发现 71 位疏水性苯丙氨酸（Phe）突变为亲水性苏氨酸（Thr）后，突变酶酶活力相较野生型提高了 15.9 倍。

2.6 PtXynA 在麦芽糖化中的应用效果评价

在模拟糖化条件下，PtXynA 添加量在 200 U/g 麦芽时，麦芽汁的过滤时间降到最低，相比对照下降了 43.9%，同时黏度下降了 10.8%，之后随着加酶量的继续提高，麦芽汁过滤时间和黏度没有出现明显提高（表 3）。

阿拉伯木聚糖是大麦胚乳细胞壁的主要成分，其较高的含量和较大的分子量会造成麦芽汁黏度升高，进而造成啤酒浑浊和颜色暗沉等不良影响[9−10]。

表 3　PtXynA 在麦芽糖化工艺中对麦芽汁过滤时间和黏度的影响

Table 3　Effect of PtXynA on the filtration time and viscosity of wort in the malting process

PtXynA添加量（U/g麦芽）	过滤时间（s）	过滤时间减少百分比（%）	黏度（cP）	黏度降低百分比（%）
CK	2678.1±29.5^{f}	–	1.721±0.010^{d}	–
125	1797.7±44.4^{d}	32.9±1.6^{d}	1.638±0.006^{c}	4.8±0.4^{e}
150	1646.3±23.1^{c}	36.5±0.8^{c}	1.600±0.022^{bc}	7.0±1.3^{d}
175	1558.8±15.9^{b}	40.6±0.6^{b}	1.555±0.009^{ab}	9.6±0.5^{c}
200	1503.6±20.0^{a}	43.9±0.7^{a}	1.534±0.002^{a}	10.8±0.2^{a}
225	1708.2±12.9^{cd}	36.2±0.5^{bc}	1.546±0.004^{ab}	10.2±0.2^{b}
250	2232.7±72.3^{e}	16.6±2.7^{e}	1.555±0.005^{ab}	9.7±0.3^{bc}

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

研究表明，麦汁中阿拉伯木聚糖的浓度可达到 β-葡聚糖浓度的 5 倍[35]。在糖化过程中添加木聚糖酶对大麦麦芽中的阿拉伯木聚糖进行部分降解，可以显著提高麦芽汁的过滤性能[36]。目前，已有一些木聚糖酶已被应用于麦芽糖化过程中。由于具有较高的小麦阿拉伯木聚糖水解活性，PtXynA 在提高麦芽汁过滤效率方面要明显优于其他同类报道，如来自粘褶菌（*G. trabeum*）[37]、嗜松青霉 C1（*P. pinophilum* C1）[38]和赤霉病菌属 Xz-8（*Achaetomium* sp. Xz-8）[39] 的木聚糖酶应用于麦芽糖化过程中，分别使麦芽汁过滤时间提高了 31.3%、26.7% 和 20.2%。在降低麦芽汁黏度的效果上，PtXynA 也同样优于多数已报道耐热木聚糖酶，如毛壳霉 CQ31（8.6%）[11]、海栖热袍菌（8.7%）[9] 和嗜松青霉木聚糖酶（9.8%）[38]。因此，PtXynA 在麦芽糖化过程中具有较大的应用潜力。

3　结论

本研究利用原生质体转化法成功将嗜热拟青霉耐热木聚糖酶基因 *PtXynA* 在黑曲霉中进行了异源表达。得到的重组酶为一种耐热型阿拉伯木聚糖酶，该酶的最适 pH 和温度分别为 pH7.0 和 70 ℃，且在 pH5.5~9.0 和 75 ℃ 以下保持稳定。该酶表现出严格的木聚糖底物特异性，其中对小麦阿拉伯木聚糖显示出最高比酶活力（1993.2 U/mg）。结构叠加分析显示，PtXynA 具有更多的底物结合位点和更高的催化凹槽。将 PtXynA 应用于麦芽糖化工艺，当 PtXynA 的添加量为 200 U/g 时应用效果最好，麦芽汁过滤时间（43.9%）和麦芽汁黏度（10.8%）均显著降低（P<0.05），表明 PtXynA 在啤酒工业中具有重要的应用潜力。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］ GAUTÉRIO G V, HÜBNER T, Da ROSA RIBEIRO T, et al. Xylooligosaccharide production with low xylose release using crude xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Effect of the enzymatic hydrolysis parameters[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(2): 862−881.

［2］ MENDONÇA M, BARROCA M, COLLINS T. Endo-1, 4-β-xylanase-containing glycoside hydrolase families: Characteristics, singularities and similarities[J]. Biotechnology Advances, 2023, 65: 108148.

［3］ MADHAVAN A, ARUN K, SINDHU R, et al. Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization[J]. Bioresource Technology, 2022, 344: 126209.

［4］ ALOKIKA, SINGH B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21): 8763−8784.

［5］ WANG Shounan, XUE Yibin, ZHANG Peng, et al. CRISPR/Cas9 system-mediated multi-copy expression of an alkaline serine protease in *Aspergillus niger* for the production of XOD-inhibitory peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(41): 15194−15203.

［6］ TANG Longzhang, LEI Xiaowen, OUYANG Kehui, et al. A glycosyl hydrolase 30 family xylanase from the rumen metagenome and its effects on *in vitro* ruminal fermentation of wheat straw[J]. Animals, 2023, 14(1): 118.

［7］ DECELLE B, TSANG A, STORMS R K. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-beta-xylanases[J]. Current Genetics, 2004, 46(3): 166−175.

［8］ 王红霞, 王华明, 张大龙, 等. 葡萄穗霉木聚糖酶 XYA6205 在黑曲霉中的表达及酶学特性分析[J]. 生物技术通报, 2013, 29(2): 130−134. ［WANG Hongxia, WANG Huaming, ZHANG Dalong, et al. Heterologous expression and characterization of xylanase XYA6205 from *Stachybotrys chartarum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 29(2): 130−134.］

［9］ 刘学强, 江正强, 余静, 等. 海栖热袍菌木聚糖酶 B 的分子改造、高效表达及其在啤酒中的应用[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 66−73. ［LIU Xueqiang, JIANG Zhengqiang, YU Jing, et al. High-level expression of an engineered thermostable xylanase B from *Thermotoga maritima* and its application in beer brewing[J]. Food Science, 2022, 43(6): 66−73.］

［10］ MANGAN D, CORNAGGIA C, LIADOVA A, et al. Development of an automatable method for the measurement of endo-1, 4-β-xylanase activity in barley malt and initial investigation into the relationship between endo-1, 4-β-xylanase activity and wort viscosity[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 84: 90−94.

［11］ YU Jing, LIU Xueqiang, GUAN Leying, et al. High–level expression and enzymatic properties of a novel thermostable xylanase with high Arabinoxylan degradation ability from *Chaetomium* sp. suitable for beer mashing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 223−232.

［12］ BASOTRA N, JOSHI S, SATYANARAYANA T, et al. Expression of catalytically efficient xylanases from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* for synergistically enhancing hydrolysis of lignocellulosics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 185−192.

［13］ ZHANG Min, JIANG Zhengqiang, YANG Shaoqing, et al. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant xylanase[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(2): 688−695.

［14］ FAN Guangsen, KATROLIA P, JIA Huiyong, et al. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus

Paecilomyces thermophila in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(11): 2043−2048.
[15] LIU Xueqiang, YAN Qiaojuan, XUE Yibin, et al. Biochemical characterization of a novel glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Chaetomium* sp. suitable for bread making[J]. Process Biochemistry, 2022, 117: 1−9.
[16] LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265−275.
[17] 舒玉凤, 严鹤松, 魏凯峯, 等. 嗜热脂肪地芽孢杆菌木聚糖酶 XynA 的异源表达、酶学表征及低聚木糖的抗氧化性研究[J]. 饲料研究, 2024, 47(17): 109−114. [SHU Yufeng, YAN Hesong, WEI Kaifeng, et al. Heterologous expression and characterization of xylanase XynA from *Geobacillus stearothermophilus* and antioxidant activity of xylo-oligosaccharides[J]. Feed Research, 2024, 47(17): 109−114.]
[18] 张亚萍, 赵凤光, 刘纯, 等. 镰刀菌 Fo47 来源木聚糖酶的异源表达、酶学性质及其对全麦面包品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(11): 35−41. [ZHANG Yaping, ZHAO Fengguang, LIU Chun, et al. Xylanase from *Fusarium oxysporum* Fo47: Expression, characterization and application in whole-wheat bread making[J]. Food Research and Development, 2022, 43(11): 35−41.]
[19] FLORES A C, KIMIKO KADOWAKI M, Da CONCEIÇÃO SILVA J L, et al. Enzymatic potential of endophytic fungi: Xylanase production by *Colletotrichum boninense* from sugarcane biomass[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2023, 54(4): 2705−2718.
[20] LI Yumei, ZHANG Xinxin, LU Chunwen, et al. Identification and characterization of a novel endo-*β*-1, 4-xylanase from *Streptomyces* sp. T7 and its application in xylo-oligosaccharide production[J]. Molecules, 2022, 27(8): 2516.
[21] KUMAR V, DANGI A K, SHUKLA P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications[J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(3): 226−235.
[22] 何若男, 刘思师, 陈雅欣, 等. 嗜热木聚糖酶的研究与优化进展[J]. 精细与专用化学品, 2023, 31(8): 16−24. [HE Ruonan, LIU Sishi, CHEN Yaxin, et al. Progress in the research and optimization of thermophilic xylanase[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2023, 31(8): 16−24.]
[23] 杨行, 马俊文, 李延啸, 等. 毛壳霉木聚糖酶 B(CsXyn11B)的分泌表达及其在面包中的应用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(4): 108−113. [YANG Hang, MA Junwen, LI Yanxiao, et al. Secretion expression of xylanase B(CsXyn11B) from *Chaetomium* sp. and its application in bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(4): 108−113.]
[24] KATROLIA P, YAN Q J, ZHANG P, et al. Gene cloning and enzymatic characterization of an alkali-tolerant endo-1, 4-*β*-mannanase from *Rhizomucor miehei*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(2): 394−401.
[25] LI Yanxiao, YI Ping, LIU Jun, et al. High-level expression of an engineered *β*-mannanase (m*Rm*Man5A) in *Pichia pastoris* for manno-oligosaccharide production using steam explosion pretreated palm kernel cake[J]. Bioresource Technology, 2018, 256: 30−37.
[26] LIU Xueqiang, YANG Shaoqing, MA Junwen, et al. Efficient production of acetylated xylooligosaccharides from Hawthorn kernels by a xylanase from *Paecilomyces aerugineus*[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 158: 112962.
[27] ABDELLA A, RAMADAN S, HAMOUDA R A, et al. *Paecilomyces variotii* xylanase production, purification and characterization with antioxidant xylo-oligosaccharides production[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 16468.
[28] GALANOPOULOU A P, HAIMALA I, GEORGIADOU D N, et al. Characterization of the highly efficient acid-stable xylanase and *β*-xylosidase system from the fungus *Byssochlamys spectabilis* ATHUM 8891 (*Paecilomyces variotii* ATHUM 8891)[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(6): 430.
[29] WANG Yawei, WANG Jing, ZHANG Zhongqiang, et al. High-temperature behavior of hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase XYN10B after designed and evolved mutations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(5−6): 2017−2027.
[30] LI Chanjuan, KUMAR A, LUO Xuan, et al. Highly alkalistable and cellulase-free xylanases from *Fusarium* sp. 21 and their application in clarification of orange juice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 572−580.
[31] POLLET A, DELCOUR J A, COURTIN C M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2010, 30(3): 176−191.
[32] VARDAKOU M, DUMON C, MURRAY J W, et al. Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 375(5): 1293−1305.
[33] NORDVANG R T, NYFFENEGGER C, HOLCK J, et al. It all starts with a sandwich: Identification of sialidases with trans-glycosylation activity[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158434.
[34] BOONYAPAKRON K, CHITNUMSUB P, KANOKRATANA P, et al. Enhancement of catalytic performance of a metagenome-derived thermophilic oligosaccharide-specific xylanase by binding module removal and random mutagenesis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 131(1): 13−19.
[35] SUN Junyong, XU Feng, LU Jian. A glycoside hydrolase family 62 A-L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* and its applicable potential during mashing[J]. Foods, 2020, 9(3): 356.
[36] LI Yin, LU Jian, GU Guoxian, et al. Studies on water-extractable arabinoxylans during malting and brewing[J]. Food Chemistry, 2005, 93(1): 33−38.
[37] WANG Xiaoyu, LUO Huiying, YU Wangning, et al. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry[J]. Food Chemistry, 2016, 199: 516−523.
[38] CAI Hongying, SHI Pengjun, BAI Yingguo, et al. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(12): 2341−2346.
[39] ZHAO Liang, MENG Kun, SHI Pengjun, et al. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(12): 1879−1885.