

阴沟肠杆菌 GX-3 的 β -木糖苷酶的酶学性质及木糖耐受性分子改造

唐林^{1#}, 刘庆^{1#}, 黄金群¹, 廖桂东², 余晓婷¹, 黄申申², 杜丽琴^{1,2*}

1 广西大学 生命科学与技术学院, 广西微生物资源开发与利用技术创新中心, 广西 南宁

2 非粮生物质能技术全国重点实验室, 广西 南宁

唐林, 刘庆, 黄金群, 廖桂东, 余晓婷, 黄申申, 杜丽琴. 阴沟肠杆菌 GX-3 的 β -木糖苷酶的酶学性质及木糖耐受性分子改造[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3291-3308.

TANG Lin, LIU Qing, HUANG Jinqun, LIAO Guidong, YU Xiaoting, HUANG Shenshen, DU Liqin. Characterization and molecular engineering of a β -xylosidase from *Enterobacter cloacae* GX-3[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(7): 3291-3308.

摘要:【目的】克隆表达来自阴沟肠杆菌 GX-3 中注释为糖苷水解酶家族 3 的 β -木糖苷酶, 并深入探究其酶学特性。针对该酶木糖耐受性较低的问题, 对相关氨基酸残基进行分子改造以提高其木糖耐受性。【方法】根据阴沟肠杆菌 GX-3 基因组中注释为糖苷水解酶家族 3 的 β -木糖苷酶序列设计引物, 通过 PCR 扩增目的基因, 以 pQE30 为载体构建重组质粒, 将其转化至大肠杆菌 M15 中进行诱导表达, 采用镍亲和层析法纯化重组酶, 研究重组酶的酶学性质, 并对木糖耐受性相关的氨基酸残基进行定点突变。【结果】从阴沟肠杆菌 GX-3 中成功克隆出属于糖苷水解酶家族 3 的 β -木糖苷酶基因, 并实现了在大肠杆菌中的异源表达。底物特异性分析表明, 重组酶 EXYL 是一种多功能酶, 具有 β -木糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 3 种酶活性。重组酶的最适底物为对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*NPX), 其最适 pH 和温度分别为 5.5 和 45 °C, K_m 和 V_{max} 值分别为 (0.73 ± 0.06) mmol/L 和 (130.00 ± 6.85) μ mol/(mg·min), 木糖的抑制常数 K_i 值为 (51.95 ± 2.36) mmol/L。当重组酶 EXYL 作用于木寡糖(X3-X5)时, 主要产物为木糖和木二糖, 产量各约占 50%。对 EXYL 木糖耐受性相关的氨基酸位点进行定点突变, 获得正向突变体 W138C 和 W138A, 突变酶 W138C 和 W138A 的木糖耐受性分别提高了 2.38 倍和 1.83 倍。【结论】本研究为探究 β -木糖苷酶的多功能酶活性提供了参考, 也为增强 GH3 家族 β -木

资助项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2024GXNSFAA010123); 广西壮族自治区创新驱动发展专项资金(桂科 AA24206048-2); 非粮生物质能技术全国重点实验室开放课题(SK-L-NFBET-2026-02)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2024GXNSFAA010123), the Innovation-driven Development Special Funds of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Guike AA24206048-2), and the Open Project of the State Key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology (SKL-NFBET-2026-02).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

Received: 2026-01-15; Accepted: 2026-02-11; Published online: 2026-02-28

糖苷酶的木糖耐受性提供了新的思路。

关键词：阴沟肠杆菌 GX-3； β -木糖苷酶；木糖耐受性；分子改造

Characterization and molecular engineering of a β -xylosidase from *Enterobacter cloacae* GX-3

TANG Lin^{1#}, LIU Qing^{1#}, HUANG Jinqun¹, LIAO Guidong², YU Xiaoting¹, HUANG Shenshen², DU Liqin^{1,2*}

1 Guangxi Technology Innovation Center for Microbial Resources Development and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

2 State Key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology, Nanning, Guangxi, China

Abstract: [Objective] To clone and express a gene encoding the β -xylosidase from *Enterobacter cloacae* GX-3, a putative member of the glycoside hydrolase family 3, systematically characterize the recombinant enzyme, and improve the xylose tolerance by molecular engineering of key amino acid residues involved in xylose binding. **[Methods]** On the basis of the whole-genome sequencing data of *E. cloacae* GX-3, primers were designed to amplify the β -xylosidase gene annotated as GH3. The target gene was amplified by PCR and cloned into the pQE30 expression vector, and the resulting recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* M15 for induced expression. The recombinant enzyme was purified by nickel-affinity chromatography, and its enzymatic properties were studied. Site-directed mutagenesis was conducted on amino acid residues associated with xylose tolerance. **[Results]** The β -xylosidase gene belonging to the GH3 family was successfully cloned from *E. cloacae* GX-3 and heterologously expressed in *E. coli* M15. Substrate specificity analysis revealed that the recombinant enzyme EXYL was a multifunctional enzyme exhibiting β -xylosidase, β -glucosidase, and α -L-arabinofuranosidase activities. EXYL showed the optimal performance with the substrate of *p*NPX and at pH 5.5 and 45 °C. The K_m and V_{max} values of this enzyme were (0.73±0.06) mmol/L and (130.00±6.85) μ mol/(mg·min), respectively. The inhibition constant (K_i) for xylose was (51.95±2.36) mmol/L. When EXYL acted on xylooligosaccharides (X3–X5), the main products were xylose and xylobiose, each accounting for approximately 50% of the yield. Site-directed mutagenesis of xylose tolerance-related residues yielded positive mutants W138C and W138A, which showed 2.38-fold and 1.83-fold improvements in xylose tolerance, respectively. **[Conclusion]** This study provides insights into the multifunctional activities of β -xylosidases and offers new strategies for enhancing the xylose tolerance of β -xylosidases in the GH3 family.

Keywords: *Enterobacter cloacae* GX-3; β -xylosidase; xylose tolerance; molecular engineering

木质纤维素的降解利用对于发展可持续性能源具有重要意义^[1]。纤维素和半纤维素约占木

质纤维素成分的 2/3，二者可分别通过酶法生成葡萄糖和木糖，再经发酵处理生产生物乙醇^[2]。

木聚糖作为半纤维素的主要成分之一, 约占植物细胞壁半纤维素的 30%^[3]。木聚糖由 β -D-吡喃木糖通过 β -1,4-木糖苷键形成主链, 并带有阿拉伯糖、半乳糖、乙酸、阿魏酸、葡萄糖醛酸、对香豆酸等侧链基团, 因此要彻底降解木聚糖需要多种酶的协同作用^[3-4]。其中, 降解木聚糖的 2 个关键酶为内切木聚糖酶(endo- β -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8)和 β -木糖苷酶(β -xylosidase, EC 3.2.1.37), 木聚糖先由内切木聚糖酶水解成低聚木寡糖及少量木糖, 再由 β -木糖苷酶以外切的形式从非还原性末端催化水解低聚木寡糖的木糖苷键, 从而释放木糖, 减少终产物对 β -内切木聚糖酶的抑制作用^[5]。可见, β -木糖苷酶在木聚糖降解中发挥着重要作用。

据报道, 糖苷水解酶家族 3 (glycoside hydrolase family 3, GH3)中的 β -木糖苷酶多表现出双功能乃至多功能活性^[6-9]。这一特性意味着单个酶能催化不同反应, 从而极大地提升了其在木聚糖降解中的催化效率和应用潜力。例如, Tong 等^[6]从变肿网状球菌(*Dictyoglomus turgidum*)克隆出 β -木糖苷酶基因, 并在大肠杆菌中表达, 获得的 Dt-2286 具有 β -木糖苷酶、 α -阿拉伯糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性。Shi 等^[7]在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达了来源于嗜热细菌热泉热袍菌(*Thermotoga thermarum*) DSM 5069 的 β -木糖苷酶基因 *Tth xynB3*, 该酶表现出 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶活性。Xia 等^[9]从嗜热真菌特异腐质霉(*Humicola insolens*) Y1 中获得 β -木糖苷酶基因, 并在毕赤酵母中过表达, 获得的重组酶 XYL3A 同时表现出 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶活性。Patel 等^[8]从黑曲霉(*Aspergillus niger*) ADH-11 中获得 GH3 家族的 β -木糖苷酶, 该酶是兼具 β -葡萄糖苷酶活性的双功能 β -木糖苷酶。Zhou 等^[10]表征了来自牦牛瘤胃宏基因组 GH3 家族的 β -木糖苷酶基因, 在大肠杆菌中表达的重组酶 RuBGX1 兼具 β -木糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性, β -木糖苷酶的双功能或多功能活性表明其具有将木聚糖或纤维寡糖降

解生产木糖、阿拉伯糖和葡萄糖的应用潜力。

在碳水化合物酶数据库(carbohydrate-active enzymes database, CAZy, <http://www.cazy.org/>)中检索 β -木糖苷酶的分类号[EC 3.2.1.37], 可检索出 14 个糖苷水解酶家族, 分别是 GH1、GH10、GH11、GH116、GH120、GH2、GH3、GH30、GH39、GH5、GH51、GH52、GH54 和 GH43。 β -木糖苷酶根据不同的催化机制分为保留型和反向型, 反向型即异头碳构型发生整体反转, 除来自 GH43 家族的属于反向型外, 其余均属于保留型^[3]。其中有些 β -木糖苷酶可能对水解人工合成底物有活性, 但尚未被证实对天然底物同样具有催化作用。已被证明能水解天然底物的 β -木糖苷酶主要存在于 GH 家族 3、5、30、39、43、51、52 和 120 中^[11]。除了降解木聚糖外, 一些 β -木糖苷酶可以去除天然活性物质或其类似物中的木糖基, 产生的物质具有抗癌、抗氧化以及抗炎活性^[12-17]。 β -木糖苷酶所具备的转木糖基功能能够以醇类、糖类或其他物质作为受体, 生成烷基木糖、低聚木糖和其他木糖基化合物等具有抗菌、抗氧化活性的化学物质^[18-19]。因此, β -木糖苷酶在生物质能源、医药、食品、化妆品、饲料、环保等领域具有广泛的应用前景^[20]。

β -木糖苷酶在水解过程中常常受到木糖、葡萄糖、阿拉伯糖等单糖产物的抑制作用^[11]。已报道的大多数来源于真菌或细菌的 β -木糖苷酶木糖耐受性较差^[6]。例如, 来源于真菌哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)的 β -木糖苷酶在仅有 2 mmol/L 木糖存在的情况下酶活力完全丧失^[21]。纯化后的 Dt-2286 在 100 mmol/L 木糖存在时相对酶活力为 63%^[6]。黑曲霉 ADH-11 中的 β -木糖苷酶在仅有 12 mmol/L 木糖的条件下保留 50.52% 的酶活力^[8]。目前有报道通过定点突变提高木糖耐受性。Li 等^[22]通过 I-TASSER 和 PyMOL 构建蛋白质活性口袋同源模型并进行预测, 找到 2 个假定的与木糖耐受相关的位点, 获得的突变体 Xln-DT-284ASP 和 Xln-DT-284ALA 表现出较高

的木糖耐受性, 与野生型 Xln-DT 相比提高了 9%–35%。Jordan 等^[23]对反刍月形单胞菌中的 β -D-木糖苷酶/ α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶双功能酶进行 Trp145 位点的定点饱和突变以提高酶对木糖的耐受性。黑曲霉中 GH3 家族的 β -木糖苷酶 Trp262 也已通过定点突变的方式表明其对糖类物质的固定具有重要作用^[24]。

本研究从经过全基因组测序的阴沟肠杆菌 GX-3 中克隆出注释为糖苷水解酶家族(GH3)的 β -木糖苷酶基因, 并在大肠杆菌中克隆表达。探究重组酶的酶学性质及水解木寡糖的能力, 同时通过序列比对及同源建模分析对重组酶木糖耐受相关氨基酸进行定点突变, 以提高重组酶的木糖耐受性, 并利用 Discovery Studio 和 PyMOL 可视化分析底物对接结果和蛋白质活性口袋。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) GX-3 已完成全基因组测序, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue 购自 TaKaRa 公司, *E. coli* M15/pREP4、质粒 pQE30 购自 Qiagen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

Dpn I、DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 等, TaKaRa 公司; DNA 质粒小量提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒, BioFlux 公司; IPTG, Gibco 公司; Ni-NTA 介质, Qiagen 公司; 咪唑, Amresco 公司; 各种对硝基苯基底物, Sigma-Aldrich 公司; 木糖及木寡糖, 大连中科格莱克生物科技有限公司; SDS、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、四甲基乙二胺和过硫酸铵, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 仪, Biometra 公司; 分光光度计,

Bekman 公司; 高效液相色谱分析仪, Agilent 公司。

1.3 阴沟肠杆菌 GX-3 中 β -木糖苷酶基因的克隆与表达

根据阴沟肠杆菌 GX-3 全基因组测序结果, 找到一个注释为糖苷水解酶家族 3 的基因。首先在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库的 BLASTx 程序中进行基因序列比对, 分析该基因编码的蛋白质结构组成(<https://smart.embl.de/>), 使用 AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>)对蛋白质进行从头建模, 并进行结构比对。使用 Expasy (<https://www.expasy.org/>)分析蛋白质理化性质并预测分子量。

根据分析结果设计引物扩增 β -木糖苷酶基因 *exyl*。上游引物为 F-*Bgl* II (5'-CTGAGATCTACTGCAATCTATAAGGACGCGGGAC-3'), 下游引物为 R-*Hind* III (5'-ACTAAGCTTCTACGCGTGCTGAACCTGACAGGTG-3')。将纯化后的 PCR 产物进行双酶切处理(使用 *Bgl* II 和 *Hind* III), pQE30 克隆载体使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切处理。用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化到 *E. coli* XL1-Blue 宿主细胞, 送华大基因公司测序验证。将成功构建的重组质粒命名为 pQE-*exyl*。

将质粒 pQE-*exyl* 转化至 *E. coli* M15 中表达, 接种重组菌株至 LB 培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 卡那青霉素), 当菌液 OD_{600} 达到 0.4–0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 继续培养 10 h 后收集菌体, 超声破碎细胞后采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化重组酶 EXYL。对纯酶 EXYL 进行 SDS-PAGE 分析^[25]。

1.4 重组酶 EXYL 酶学性质的测定

β -木糖苷酶活力单位(U)的定义: 以对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*NPX)为底物, 1 U 是指在酶的最适条件下, 每分钟水解 *p*NPX 产生 1 μ mol *p*NP 的酶量。

酶活力测定方法: 将 116 μL 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液与 14 μL 25 mmol/L *p*NPX 混匀, 再加入 10 μL 能够使反应液的 OD_{410} 吸光值在 *p*NP 标准曲线范围内的稀释倍数的纯酶液。反应时间为 15 min, 加入 70 μL 0.4 mol/L Na_2CO_3 终止反应。取 200 μL 反应液, 在酶标仪中读取 OD_{410} 的吸光值。

1.4.1 重组酶 EXYL 的底物特异性测定

测定 EXYL 对人工底物的水解能力, 纯化后的 EXYL 分别以 2.5 mmol/L 的对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*NPG)、*p*NPX、对硝基苯基- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(*p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside, *p*NPA)、4-甲基伞形酮基- β -D-葡萄糖苷酸(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, MUG)、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *p*NP-galac)、对硝基苯基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide, N-acetyl-*p*NPG)、邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *o*NPG)、对硝基苯基- β -D-纤维二糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside, *p*NPC)为底物, 测定酶活力。其中以 MUG 为底物时其反应产物需在紫外灯下检测。

1.4.2 重组酶 EXYL 的最适条件及稳定性测定

将重组酶分别置于由 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸配制的不同 pH 缓冲液中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下测定酶活力, 以最高的酶活力为 100%, 计算其他 pH 下的相对酶活力, 确定重组酶最适 pH。在最适 pH 条件下, 测定重组酶在 30–60 $^{\circ}\text{C}$ 下的酶活力, 以最高的酶活力为 100%, 以此计算其他温度的相对活力, 确定重组酶最适温度。

将酶液置于 pH 4.5–9.0 的缓冲液中, 放置 12 h。在最适反应条件下测定酶活力, 以未处理的酶液的酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 确定重组酶 pH 稳定性。将重组酶置于 30–65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 1 h。在最适条件下测定酶活力, 以未

经处理的酶活力为 100%, 以此计算其他温度处理后的相对酶活力, 由此可得该酶的热稳定性。

1.4.3 重组酶 EXYL 的 K_m 和 V_{max} 的测定

在最适反应条件下, 以 0.1–10 mmol/L *p*NPX 为底物测定 EXYL 的酶活力, 以此计算 K_m 和 V_{max} , 每组浓度设 3 个平行实验。

1.4.4 金属离子及醇类化合物对重组酶 EXYL 酶活力的影响

在最适反应条件下, 以不添加金属离子的反应体系作为空白对照, 测定终浓度为 5 mmol/L 的 K^+ 、 Ag^+ 、 Li^+ 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等不同金属离子存在下的相对酶活力, 以确定各金属离子对酶活力的影响。

在最适反应条件下, 以 2.5 mmol/L *p*NPX 为底物, 测定甲醇、乙醇、1,2-丙二醇、异丙醇、丁醇在 5%–25% 浓度范围内对 EXYL 酶活力的影响, 以未加醇类试剂为空白对照, 计算对应的相对酶活力。

1.4.5 重组酶 EXYL 的木糖耐受性和木糖抑制常数 K_i 值

EXYL 在最适条件下以 2.5 mmol/L *p*NPX 为底物, 以不加木糖的反应作为对照, 分别加入 50–500 mmol/L 木糖, 测定酶活力, 计算其相对酶活力, 以此探究木糖对 EXYL 酶活力的影响。根据参考文献[26]中方法, 分别在 0、200、400 mmol/L 3 个木糖浓度下, 以 0.1–0.8 mmol/L 的 *p*NPX 为底物, 测定 EXYL 的酶活力。采用 GraphPad Prism 10.6 软件里的 Competitive inhibition 方法对结果进行分析。

1.4.6 重组酶 EXYL 对木寡糖的水解产物分析

结合 EXYL 的热稳定性和 pH 稳定性, 水解木寡糖(X2–X5)的反应 pH 为 6.0, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。反应总体积是 700 μL , 加入 70 μL 的 1% 的木寡糖, 加入 0.5 U 的 EXYL, 用 pH 为 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液补足至 700 μL 。分别在反

应 30 min 和 12 h 后, 置于沸水浴 10 min 终止反应, 进行高效液相色谱 HPLC 测定。

高效液相色谱条件如下: 仪器为 Agilent 1100 Series 色谱仪; 检测器为 Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器; 色谱柱为 Alltima Amino (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈:水=74:26; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 28 $^{\circ}$ C。

1.5 重组酶 EXYL 的木糖耐受性分子改造

GH3 家族的 β -木糖苷酶氨基酸序列中的一个或者多个色氨酸位点对于糖类物质的固定具有重要作用^[23-24]。根据 GH3 家族序列比对结果找到保守区的色氨酸。将其突变成与色氨酸残基侧链存在一定差异但是性质相近的氨基酸, 期望影响酶与木糖结合的亲和性, 得到木糖耐受性提高的突变酶。以重组质粒 pQE-exyl 为模板, 设计引物反向 PCR 获得突变子: W138L、W138C、W138A、W138H、W138N、W138F。各突变体的诱导表达纯化按照 1.3 节中方法完成, 突变体的酶学性质按照 1.4.2 节中相应的方法来测定。其中, 突变体的木糖抑制常数 K_i 值按照 1.4.5 节中的方法测定。

EXYL 和突变酶通过在 SWISS-MODEL 在线网站上以来自海热袍菌(*Thermotoga maritima*) MSB8 的 β -木糖苷酶(SMID: 7zdy)为同源建模模板(序列一致性为 43%), 获得 EXYL 和突变酶的蛋白质三维结构, 使用 Autodock Vina 分别对木糖进行半柔性对接。木糖与 EXYL 进行分子对接时, 对接盒子大小为 40×40×40 $\text{\AA}^3$, 对接盒子中心为(27.094, 14.495, 87.735); 木糖与 W138C 分子对接时对接盒子大小为 40×40×40 $\text{\AA}^3$, 对接盒子中心为(29.652, 11.252, 87.418)。使用 PyMOL 3.0 和 Discovery Studio 2025 进行可视化分析。

1.6 基因的核苷酸序列号

将来自阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) GX-3 的基因 *exyl* 的核苷酸序列上传到 GenBank 数据库中, 得到基因的序列号为 PX754653。

2 结果与讨论

2.1 阴沟肠杆菌 GX-3 中 β -木糖苷酶基因的克隆表达

首先找到阴沟肠杆菌 GX-3 中注释为糖苷水解酶家族 3 的核苷酸序列的开放阅读框(open reading frame, ORF), ORF 全长 2 376 bp, 编码 791 个氨基酸。根据 BLASTx 序列比对分析, 结果显示该基因与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)中 glycoside hydrolase family 3 N-terminal domain-containing protein 的序列一致性(identities)为 99% (786/791), 相似性(positives)为 99% (790/791), 无空位(gaps 为 0/791, 占 0)。对该基因氨基酸序列的结构组成进行分析, 发现该基因具有 3 个结构域: 从第 24 位到第 357 位氨基酸为典型的 Glyco_hydro_3 结构域; 从第 394 位到第 652 位氨基酸为 Glyco_hydro_3_C 结构域; 而第 689 位到第 758 位氨基酸是 Fn3_like 结构域, 不具有信号肽(图 1A)。

根据 1.3 节中的引物, 以阴沟肠杆菌 GX-3 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出目的基因, 得到约 2.3 kb 的特异性条带, 测序验证成功后将其命名为 *exyl*, 所编码蛋白质大小预计为 85 697.11 Da, 蛋白质的等电点 pI 为 5.37, 命名为 EXYL。

使用 AlphaFold3 对氨基酸序列进行蛋白质结构预测, 并与同属 GH3 家族、来自海热袍菌(*Thermotoga maritima*) MSB8 的 β -木糖苷酶的晶体结构(SMID: 7zdy)进行重叠比对。结果显示, 2 个蛋白的三级结构高度重合, RMSD=0.95, 表明二者在结构上相似度很高, EXYL 的蛋白质结构具备典型的 GH3 家族结构特征^[27], 含有 TIM-barrel、(α/β)-sandwich 和 Fn III 结构(图 1B)。根据上述序列比对及结构比对结果, 初步确定 EXYL 为 GH3 家族的糖苷水解酶类。对纯酶进行 SDS-PAGE 分析, 在 85 kDa 处有明显的蛋白质条带, 结果与理论分子量一致(图 1C)。

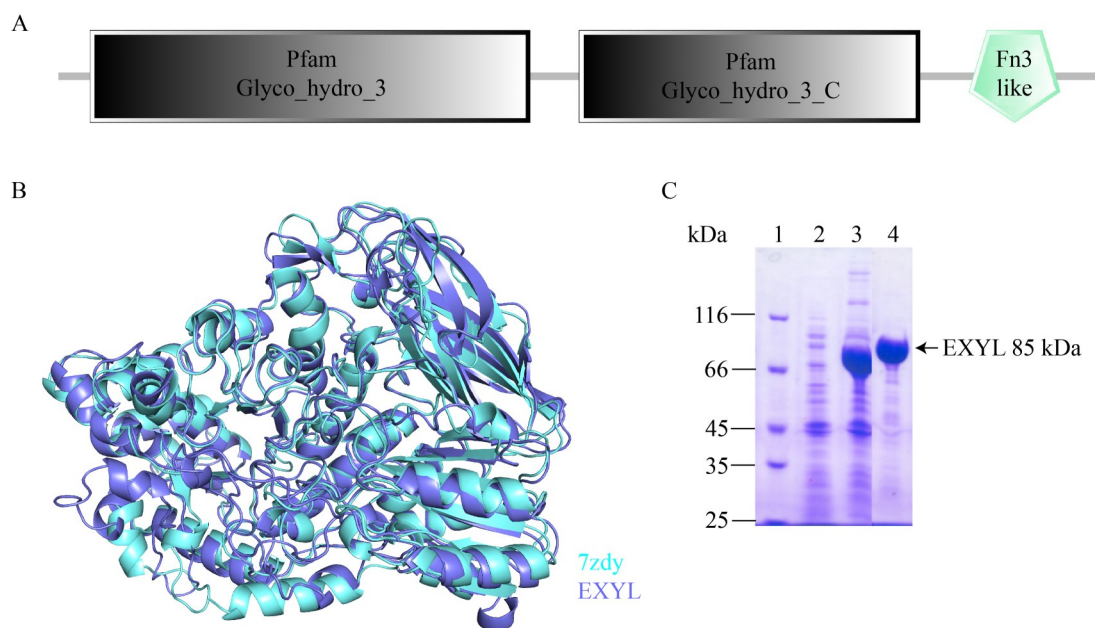


图1 EXYL蛋白质结构分析和比对图及纯酶SDS-PAGE分析

Figure 1 The analysis and alignment of EXYL structure and SDS-PAGE of the purified enzyme. A: The structure analysis of EXYL; B: The structure alignment of EXYL and 7zdy (purple is EXYL, blue is 7zdy); C: SDS-PAGE of recombinant protein EXYL. Lane 1: Protein marker; Lane 2: *E. coli* M15 with pQE30; Lane 3: Recombinant *E. coli* M15 with pQE30-exyl; Lane 4: Purified protein EXYL.

2.2 重组酶 EXYL 的酶学性质

2.2.1 EXYL 的底物特异性分析

按照 1.4.1 节中的方法测定 EXYL 在不同底物 (β -*p*NPG、 β -*p*NPX、 α -*p*NPA、MUG、*p*NP-galac、*N*-acetyl-*p*NPG、*o*NPG、*p*NPC) 下的酶活力。结果表明在酶液稀释倍数相同的条件下, EXYL 水解 β -*p*NPX 的酶活力最高, 水解 α -*p*NPA 的酶活力次之, 此外也能够水解 β -*p*NPG。在紫外光照射下观察到 EXYL 对 MUG 有水解活性, 其他底物未测到酶活性。其中 EXYL 的 β -木糖苷酶、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶的酶活力比值为 344.8:104.1:1。上述结果表明 EXYL 是 β -木糖苷酶/ α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶/ β -葡萄糖苷酶多功能酶。目前已发现的 GH3 糖苷水解酶家族的 β -木糖苷酶大多具备双功能甚至多功能特性^[7,28-29]。来源于嗜热菌的 *Tth xynB3* 是具备 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性的双功能 β -木糖苷

酶, 其对 β -*p*NPX 和 α -*p*NPA 的 K_{cat}/K_m 的比值分别是 1 173.4 L/(mmol·s) 和 505.9 L/(mmol·s)^[7]。Ramírez-Escudero 等^[28]利用宏基因组技术从瘤胃微生物群落中筛选出 GH3 糖苷水解酶家族的酶 GlyA₁, 该酶被鉴定为 β -葡萄糖苷酶/ β -木糖苷酶, 以 β -*p*NPX 和 β -*p*NPG 为底物, 酶活力之比为 624.3:197.0。来自变种网状球菌(*Dictyoglomus turgidum*)的同属 GH3 家族的 β -木糖苷酶 Dt-Xyl3, 在测定底物特异性时该酶对于 *p*NPX 的亲合力最高, 同样也可以水解 *p*NPG、*p*NPArf、*p*NPArp^[29]。

2.2.2 重组酶 EXYL 的最适反应条件及稳定性的分析

EXYL 在以 *p*NPX 为底物时最适 pH 为 5.5 (图 2A)。EXYL 的最适温度为 45 °C (图 2B)。EXYL 在 pH 7.0–9.0 范围内较稳定, 保持 80% 以上的活力, 而在 pH 低于 5.5 时基本无酶活

(图 2C)。在 30–40 °C 范围内可保留 60% 以上的酶活力, 特别是在 30–35 °C 保存下较稳定, 保持相对较高的酶活力, 若保存温度超过 45 °C, 则酶活力急剧下降(图 2D)。目前报道的 β -木糖苷酶的热稳定性和半衰期大多有待提高。Zhang 等^[30]通过结合祖先序列重建和结构分析的计算辅助设计, 理性改造 β -木糖苷酶, 获得组合突变体 rXYLO^{M25I/S51L/S79E}, 在 60 °C 半衰期增加了 6.9 倍, 同时在 pH 稳定性、催化效率和水解活性方面也有所提升。

2.2.3 EXYL 的酶促动力学参数的测定

β -木糖苷酶 EXYL 的酶活性在高浓度底

物下会受到抑制。当底物 *p*NPX 浓度为 1 mmol/L 时, EXYL 表现出最高的酶活力。底物浓度超过 1 mmol/L 时, 酶活性随着底物浓度的增加而逐渐降低。在高底物浓度条件下 (6–10 mmol/L), EXYL 只剩下 20%–30% 的酶活力。使用 GraphPad Prism 10.6 软件中的 Substrate inhibition 模型, β -木糖苷酶 EXYL 以 *p*NPX 为底物时的 K_m 值为 (0.73 ± 0.06) mmol/L, V_{max} 为 (130.00 ± 6.85) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ (图 3)。

2.2.4 金属离子及醇类试剂对 EXYL 酶活力影响

当金属离子浓度为 5 mmol/L 时, Li^+ 、 K^+ 、

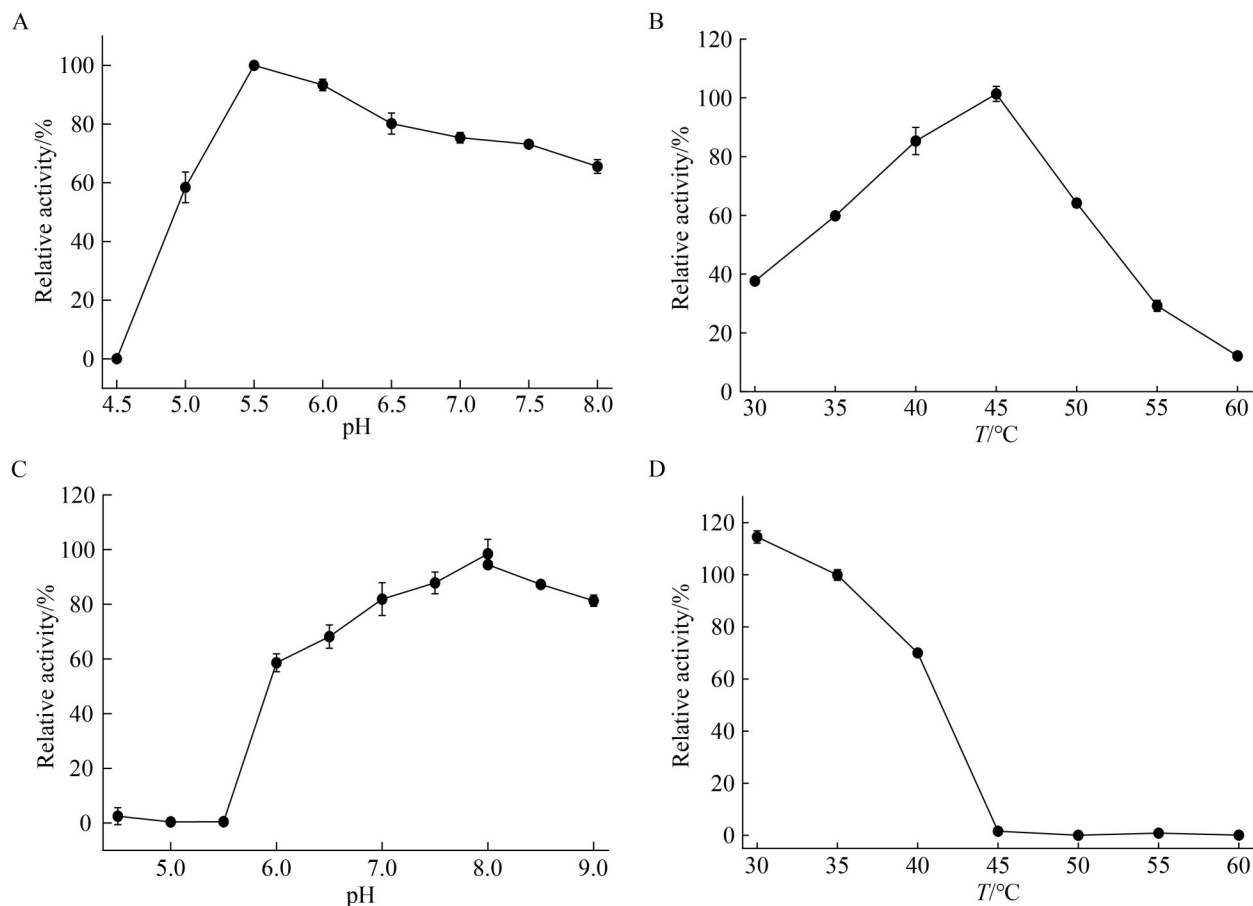


图2 EXYL的最适反应条件及稳定性的测定

Figure 2 Determination of the optimal enzymatic reaction conditions and stability of EXYL. A: Effect of pH on EXYL enzyme activity; B: Effect of temperature on EXYL enzyme activity; C: The pH stability of EXYL; D: The thermal stability of EXYL.

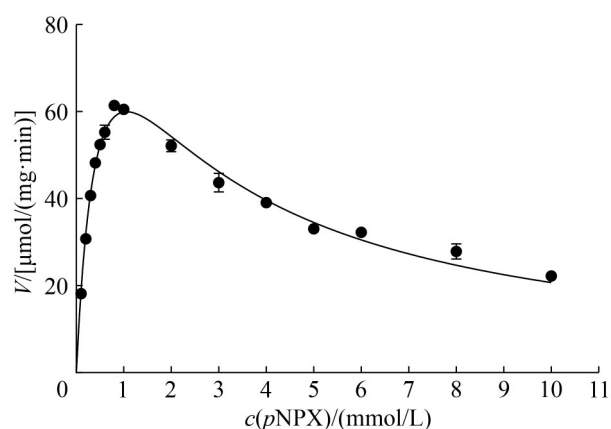


图3 β -木糖苷酶EXYL的 K_m 和 V_{max} 值

Figure 3 K_m values and V_{max} of β -xylosidase EXYL.

Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 对 EXYL 具有轻微激活作用, 而 Ag^+ 和 Hg^{2+} 对 EXYL 的抑制作用明显。 Cu^{2+} 对 EXYL 也具有抑制作用, 可能是因为 Cu^{2+} 会催化半胱氨酸分子的自氧化, 从而导致分子内和分子间二硫键或亚磺酸的形成^[31]。有文献报道 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 能够激活 β -木糖苷酶的活性, 而 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Zn^{2+} 对其不产生激活作用, 甚至具有轻微抑制作用^[32]。值得注意的是, 5 mmol/L Al^{3+} 对 Dt-xyl3 β -木糖苷酶具有强烈的抑制作用^[29], 而 5 mmol/L Al^{3+} 对 EXYL 无显著的抑制

作用, 酶活力可以保持在 90% 左右, 表明 EXYL 对 Al^{3+} 具有一定的耐受性, 且其他金属离子对 EXYL 的抑制作用不显著(图 4A)。1,2-丙二醇对 EXYL 有激活作用, 能使酶活力提升 2.7 倍, EXYL 能够耐受 5% 的甲醇、乙醇, 酶活力不受影响, 不能耐受高浓度的丁醇(图 4B)。

2.2.5 β -木糖苷酶 EXYL 的木糖耐受性及抑制常数

低浓度木糖对 EXYL 具有轻微激活作用, 如在 50、100、150、200 mmol/L 的木糖浓度下, EXYL 的酶活力比不加木糖的酶活力高, 并且在 50 mmol/L 木糖的存在下, 酶活力达到最高, 相对酶活力为 125.7% (图 5A), 该激活作用的具体机制尚未明确。在热泉热袍菌 (*Thermotoga thermarum*) DSM 5069 的 β -木糖苷酶同样存在低浓度木糖激活作用的情况, 当 200 mmol/L 木糖存在时, 酶活力达到最高, 比对照组高约 20%^[7]。来源于黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 的 β -木糖苷酶在 5 mmol/L 的木糖浓度下, 相对酶活力达到 126%^[33]。例如 Xln-DT 在 1 000 mmol/L 木糖的存在下酶活力达到最高, 高于未添加木糖时的酶活力^[15]。此外, 当木糖浓度达到 200–400 mmol/L

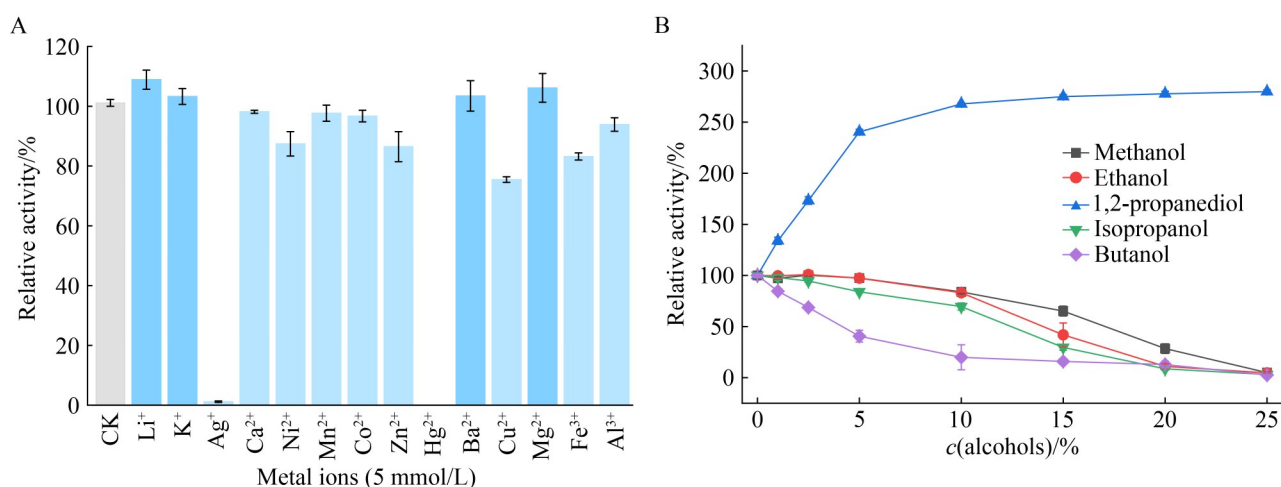


图4 金属离子及醇类试剂对EXYL酶活力影响

Figure 4 Effect of metal ions and alcohols on EXYL enzyme activity. A: Effect of metal ions and alcohols on EXYL enzyme activity; B: Effect of alcohols on EXYL enzyme activity.

时, EXYL 的相对酶活力还能保持 80% 以上。当木糖浓度达到 500 mmol/L 时, EXYL 的相对酶活力也能保持在 70% 以上。EXYL 对木糖的耐受性相对较高。按照 1.4.5 节中的方法计算木糖抑制常数 K_i 值, 使用 GraphPad Prism 10.6 软件里的 Competitive inhibition 模型进行分析, 计算得到木糖抑制常数 K_i 值为 (51.95 ± 2.36) mmol/L (图 5B)。

当前报道高木糖耐受性的 β -木糖苷酶有 Tth xynB3, 当木糖浓度为 1 000 mmol/L 时, 该酶能保持原始活力的 50% 左右^[7]。An-xyl 在 400 mmol/L 木糖的存在下能保持 58.3% 的酶活力^[34], Am β xyl 在 1 000 mmol/L 的木糖存在下保持 100% 的酶活力, 在 1 500 mmol/L 木糖存在下保持 60% 的酶活力, 并且在 250 mmol/L 的木糖下其相对酶活力约为未处理酶活力的 2.5 倍^[35]。在 100 mmol/L 木糖溶液中, Xyl4900 的酶活性高于 50%^[36]。Xln-DT 的 K_i 能够达到 3 300 mmol/L, Dt-xyl3 的耐木糖系数为 20.2 mmol/L^[37]。以上都是木糖耐受性相对较高且未经突变的 β -木糖苷酶。本研究中的 EXYL 的木糖耐受性高于大多数真菌和细菌来源的 β -木糖苷酶^[29]。然而, EXYL 的耐受木糖能力仍

待提高, 后续将通过分子改造的方式进一步提高其木糖耐受性。

2.2.6 EXYL 水解木寡糖产物的 HPLC 分析

EXYL 水解木寡糖 30 min 后, 其中水解 X5 时产物有 X4、X3、X2、X, 水解 X4 时产物有 X3、X2、X, 水解 X3 产物为 X2、X, 水解 X2 产物主要为木糖。由此可知, EXYL 可能以外切方式从非还原末端切割木糖苷键释放木糖。当 EXYL 水解木寡糖 12 h 后, 以木二糖为底物, 产物为木糖, 水解率超过 50%, X3、X4、X5 最终的水解产物均是木糖和木二糖(图 6)。

2.3 EXYL 的木糖耐受性分子改造

已报道 GH3 家族 β -木糖苷酶的木糖耐受性与保守区域的色氨酸相关^[23-24]。由于色氨酸 Trp(W) 是非极性氨基酸, 其中的吲哚环作为弱的电子供体, 能够与糖类产生范德华力、CH- π (carbon hydrogen- π) 相互作用和氢键等。通过与 GH3 家族氨基酸序列比对发现, 在保守区域有 3 个色氨酸位点, 分别是 W138、W175、W283 (图 7)。W138 处于催化口袋的远端 Loop 区域, R177 是活性口袋中的关键氨基酸, WRG 是 GH3 家族糖苷水解酶的保守序列区域, W175 与

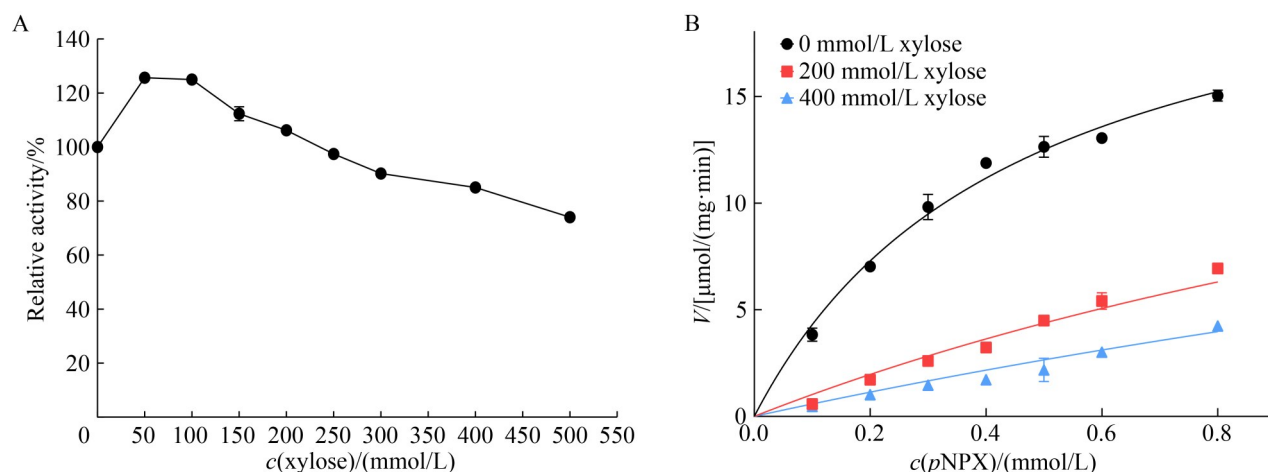
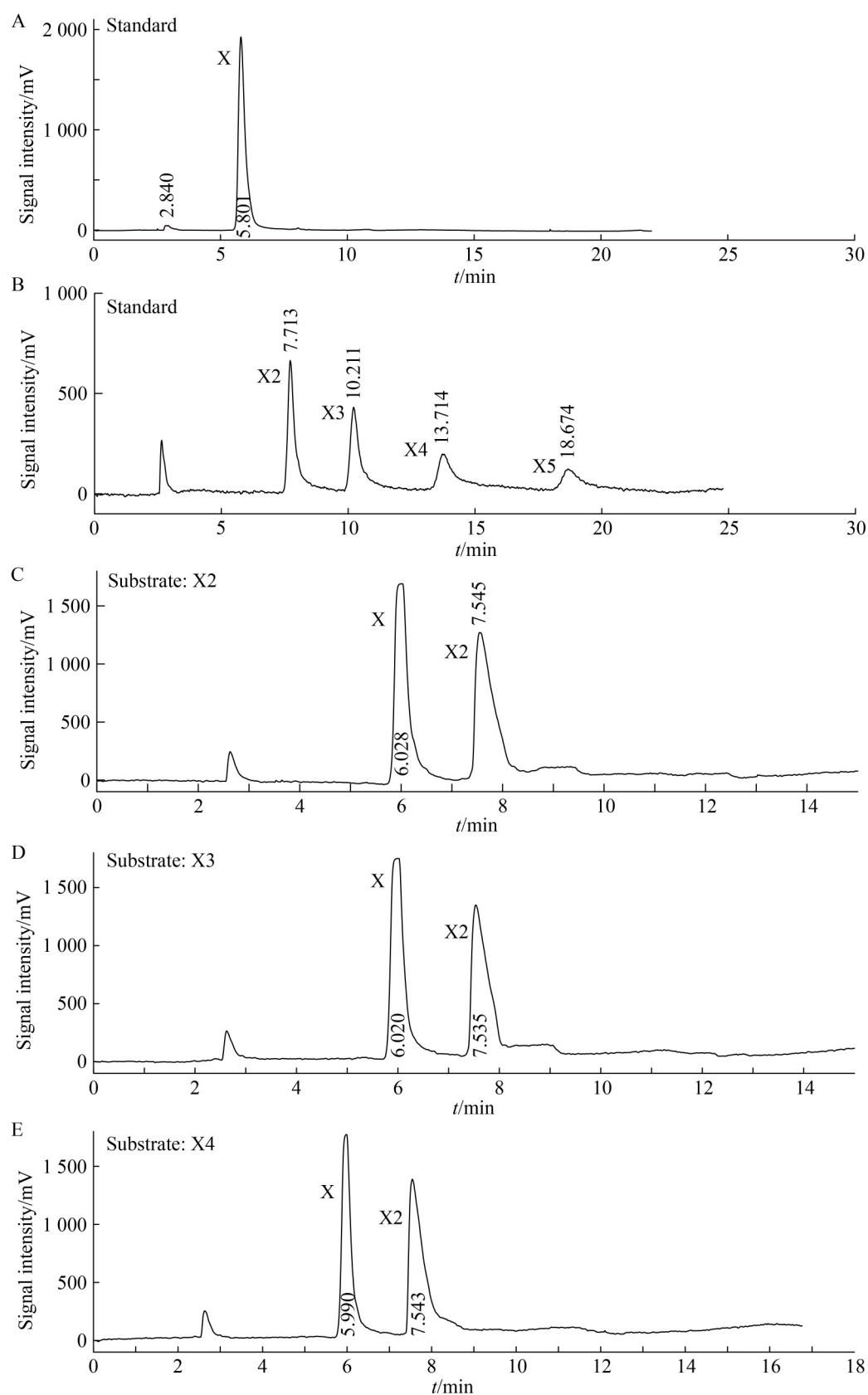


图5 EXYL的木糖耐受性及抑制常数

Figure 5 Tolerance of EXYL to xylose and its inhibition constant. A: Tolerance of EXYL to xylose; B: Xylose inhibition constant K_i of EXYL.



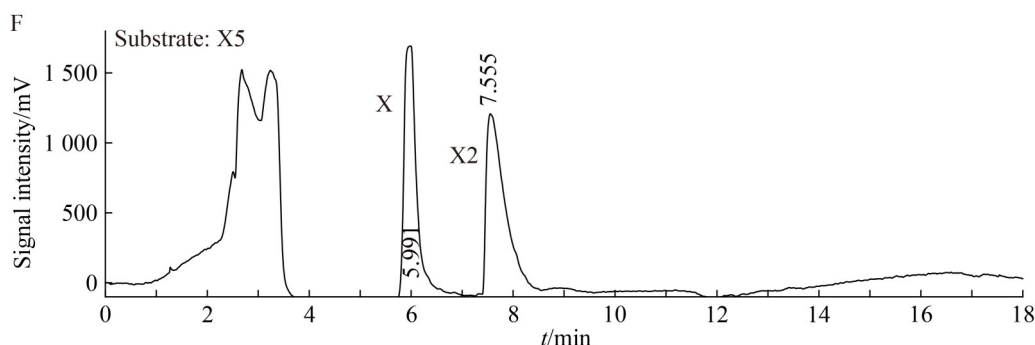


图6 EXYL水解木寡糖HPLC分析

Figure 6 HPLC analysis of xylooligosaccharides hydrolyzed by EXYL. A: HPLC analysis of xylose; B: HPLC analysis of standards (X2–X5); C: HPLC analysis of Xylobiose (X2) hydrolysis products; D: HPLC analysis of xylotriase (X3) hydrolysis products; E: HPLC analysis of xylo-tetraose (X4) hydrolysis products; F: HPLC analysis of xylopentaose (X5) hydrolysis products.

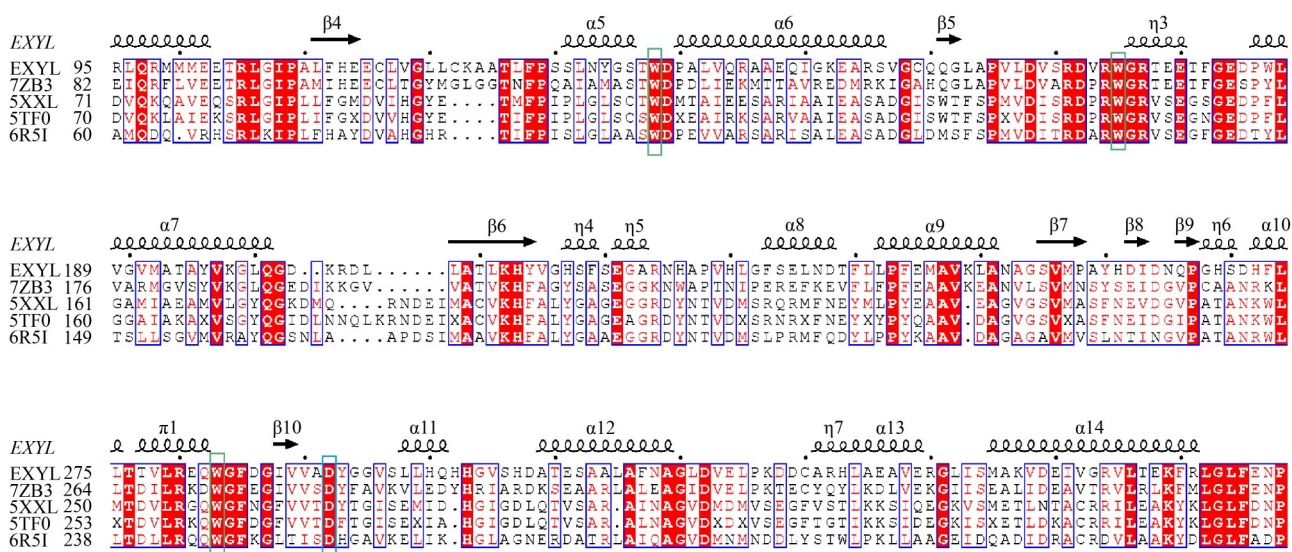


图7 EXYL的多序列比对图

Figure 7 Multiple sequence alignment of EXYL. Multiple sequence alignment of EXYL with selected GH3 family enzymes was performed using MEGA-X. Full species names and PDB ID of the selected protein are as follows: 7ZB3: β -xylosidase from *Thermotoga maritima* MSB8; 5XXL: Beta-glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482; 5TF0: Glycosyl hydrolase family 3 N-terminal domain protein from *Bacteroides intestinalis* DSM 17393; 6R5I: β -glucosidase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; Green box: The tryptophan residue within the conserved motif; Blue box: The catalytic nucleophile of the enzyme.

R177 十分接近, W283 位点处于二级结构 α -螺旋末端, 且与催化作用位点相对较近。根据同属 GH3 家族的糖苷水解酶 BtBGL (PDB ID: 5XXL) 中 D286 作为催化亲核试剂^[38], 鉴于序列

的保守性, 预测 EXYL 的催化亲核位点对应为 D291。在不影响酶的主要结构和酶催化作用的前提下, 选择 W138 位点作为定点突变位点, 并将其突变成同样具备疏水性侧链的苯丙氨

酸 Phe (F)、亮氨酸 Leu (L)、丙氨酸 Ala (A), 含有芳香杂环且为中性的组氨酸 His (H), 以及具有巯基侧链的半胱氨酸 Cys (C)和中性的天冬酰胺 Asn (N)。推测 138 位的色氨酸被替换后可能使酶在不失活的前提下影响其对糖类底物的亲和力和。按照 1.5 节中的方法获得各突变酶。测定 6 个突变酶(W138L、W138C、W138A、W138H、W138N、W138F)的最适温度和最适 pH (图 8), 以及动力学常数和木糖抑制常数(表 1)。

图 8 结果显示, 野生酶 EXYL 及各个突变酶的最适 pH 均为 5.5, 但突变酶 W138A、

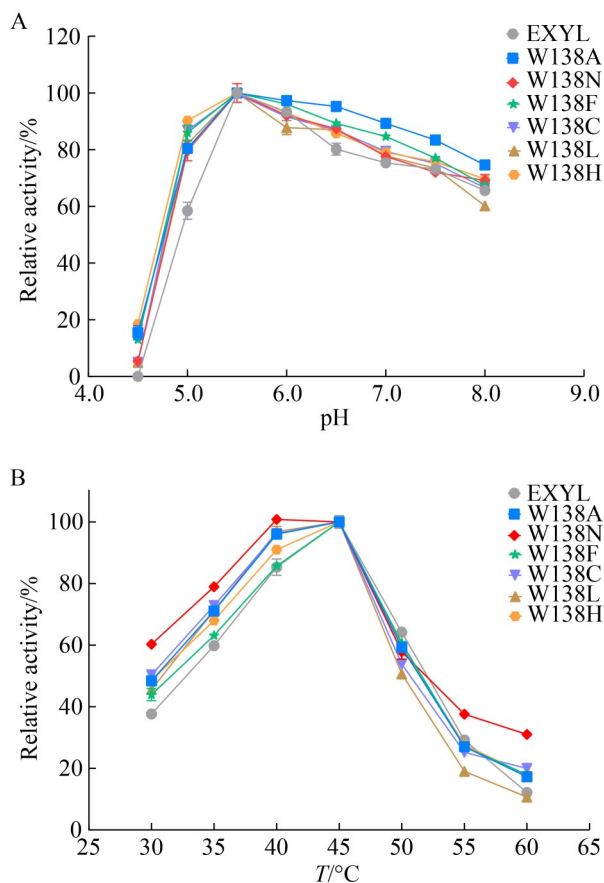


图8 EXYL及突变酶的最适条件

Figure 8 Optimum conditions for EXYL and its mutant enzymes. A: Effect of pH on the enzyme activity of EXYL and its mutants; B: Effect of temperature on the enzyme activity of EXYL and its mutants.

表1 突变酶的酶学性质研究

Table 1 Enzyme properties determination of mutants

Enzyme	K_m /(mmol/L)	V_{max} / [$\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$]	K_i (xylose)/ (mmol/L)
EXYL	0.73 $\pm$ 0.06	130.00 $\pm$ 6.85	51.95 $\pm$ 2.36
W138L	1.10 $\pm$ 0.13	148.40 $\pm$ 14.13	37.18 $\pm$ 1.97
W138C	1.08 $\pm$ 0.12	92.83 $\pm$ 6.07	123.80 $\pm$ 4.88
W138H	0.81 $\pm$ 0.05	110.10 $\pm$ 5.43	51.29 $\pm$ 2.69
W138N	3.10 $\pm$ 1.41	22.66 $\pm$ 9.03	41.91 $\pm$ 2.06
W138F	0.57 $\pm$ 0.05	136.50 $\pm$ 6.61	36.09 $\pm$ 1.76
W138A	0.81 $\pm$ 0.05	6.66 $\pm$ 0.26	95.09 $\pm$ 5.74

W138F、W138C、W138H 在 pH 6.0–7.5 条件下酶活力高于野生酶 EXYL。W138N 和 W138A 在 40 °C 反应条件下表现出最高酶活力, W138A 在 50–55 °C 范围内酶活力还能保持在 80% 以上, 其余突变酶的最适反应温度为 45 °C, 且其变化趋势与野生酶相似。以最适底物 *p*NPX 分析野生酶 EXYL 及各突变酶的动力学参数, 相比 EXYL, W138F 对底物的亲和力提高, W138F 和 W138L 的 V_{max} 也有所提高(表 1)。

在不同浓度的木糖下, 以 0.1–0.8 mmol/L *p*NPX 为底物测定各突变酶的酶活力。由表 1 可知, 与 EXYL 相比, 突变酶 W138C 和 W138A 的木糖抑制常数 K_i 分别提高了 2.38 倍和 1.83 倍, 表明突变酶 W138C 和 W138A 的木糖耐受性提高。初步猜测原因可能是色氨酸上的吲哚环与糖类物质形成的范德华力、CH- π 相互作用等对木糖起固定作用, 替换为半胱氨酸、亮氨酸或丙氨酸后, 减弱了对糖类物质的固定作用, 木糖与 W138C 和 W138A 结合的亲和力减小, 木糖更加容易从结合口袋中脱离, 从而表现出木糖耐受性提高。

由于 W138C 突变酶木糖耐受性的提高效果最佳, 因此通过分子对接进一步分析其木糖耐受性提高的原因。将 EXYL 与突变酶 W138C 分别与 D-木糖分子进行 Autodock Vina 分子对接后, 分析两者与木糖的亲和力、蛋白质表面静电势、配体相互作用及活性口袋变化。根据构

象合理性及较低的对接结合能筛选最佳的结合构象。EXYL 与木糖分子对接的结合自由能为 -5.20 kcal/mol, W138C 与木糖分子对接的结合自由能为 -4.77 kcal/mol, 与猜测一致, EXYL 与木糖结合的亲和力要高于突变体 W138C 与木糖的亲和力。因为分子对接的结合自由能绝对值越大, 则说明该配体与受体分子的亲和力越高^[22]。

使用 PyMOL 3.0 分析 2 个蛋白质表面的静电势, EXYL 与 W138C 的表面静电势存在变化, 正负电势范围增大(图 9A、9C)。推测其原因是原本疏水性极强的色氨酸残基被半胱氨酸残基替换后, 导致带负电的天冬氨酸残基附近的静电环境发生改变, 进而导致整个蛋白质静电势范围的变化。然而, 蛋白质表面静电势的改变与木糖耐受性之间是否存在相关性尚未得到充分解释。使用 Discovery Studio 2025 软件对分子对接结果进行分析, 绘制配体-蛋白相互作用 2D 图。木糖分子与 EXYL 对接后, 可能参与相互作用的关键氨基酸残基有 9 个, 其中 7 个氨基酸残基与木糖形成氢键, 分别是 Glu115、Lys212、His213、Glu533、Arg77、Arg177、Tyr260。此外, 还存在与 Asp292 之间的 C-H 相互作用, 以及 Tyr293 苯环与木糖分子中氧原子的 Pi-孤对电子相互作用(图 9B)。W138C 与木糖可能形成相互作用的关键氨基酸有 9 个, 其中同样有 7 个氨基酸残基与木糖形成氢键, 并存在 Asp292 与木糖形成的 C-H 相互作用, Tyr428 与氧原子产生新的 2 个氢键, 失去 Tyr293 与木糖形成的 Pi-孤对电子相互作用(图 9D), 活性口袋相互作用的改变可能是木糖耐受性提高的原因。

分析木糖分子与 EXYL 和 W138C 的活性口袋对接情况。EXYL 与木糖对接后, His213 与木糖分子的氧原子形成氢键, Glu533 与木糖 2 号位的羟基形成氢键, Lys212 与木糖 5 号位的羟基形成氢键, Glu115 与木糖形成 2 组氢键, 距离分别为 2.2、2.0、1.9、2.0、2.1 Å (图 10A)。

W138C 与木糖对接后, His213、Glu533、Lys212、Glu115 与木糖结合的氢键距离分别为 2.5、2.3、1.8、1.9、2.2 Å (图 10B), 而 Arg77 形成的氢键距离均为 2.3 Å。由此可见, W138C 突变酶是由于突变影响木糖与氨基酸残基所形成的氢键的距离, 推测突变后的木糖与活性口袋的结合发生了轻微的偏移, 处于更接近口袋入口的位置, 使得木糖更容易从活性口袋脱离, 从而木糖耐受性提高。李琦^[37]对来自 GH39 家族的 β -木糖苷酶 Xln-DT 进行定点突变、分子对接分析其耐木糖机制。其中将 His284 突变为 Asp 后, 获得耐糖系数提高的突变体 Xln-DT-284ASP, 比原始酶高 1.35 倍, K_i 达到了 4 602 mmol/L; 进一步分析出 283、284 氨基酸位点是 Xln-DT 耐糖的关键位点, 提出酶的木糖耐受性强弱可能与木糖与酶的底物通道的结合位点的位置有关; 木糖分子能够与酶的底物通道底部、中部或者外部的位点结合; 酶的耐受木糖能力与木糖的不同结合倾向性密切相关, 所获得的木糖耐受性增强的突变体均显示了木糖结合在偏向活性位点外的氨基酸位点, 这种偏向程度直接决定了 β -木糖苷酶对木糖耐受性的高低^[37]。分子对接结果表明, 与 EXYL 相比, 在突变酶 W138C 中木糖与 Tyr293 之间原有的 Pi-孤对电子相互作用消失, 而木糖与非活性位点 Tyr428 之间形成了新的氢键。这表明突变酶 W138C 木糖结合位点偏向非活性位点, 这可能是其木糖耐受性提高的直接原因。

综上所述, 在 6 个突变酶中木糖抑制常数提升的酶有 W138C 和 W138A, 其中 W138C 突变酶在木糖耐受性方面提升显著。这表明 Trp138 可能是 EXYL 木糖耐受性相关的关键作用氨基酸。经过分子对接分析, W138C 相比野生酶 EXYL 与木糖结合的亲和力更低, 原因可能在于缺少了保守区域中第 138 位色氨酸对糖类的固定作用, 138 位的色氨酸被突变成半胱氨酸后, 氨基酸侧链由极为疏水的吡咯环变为硫

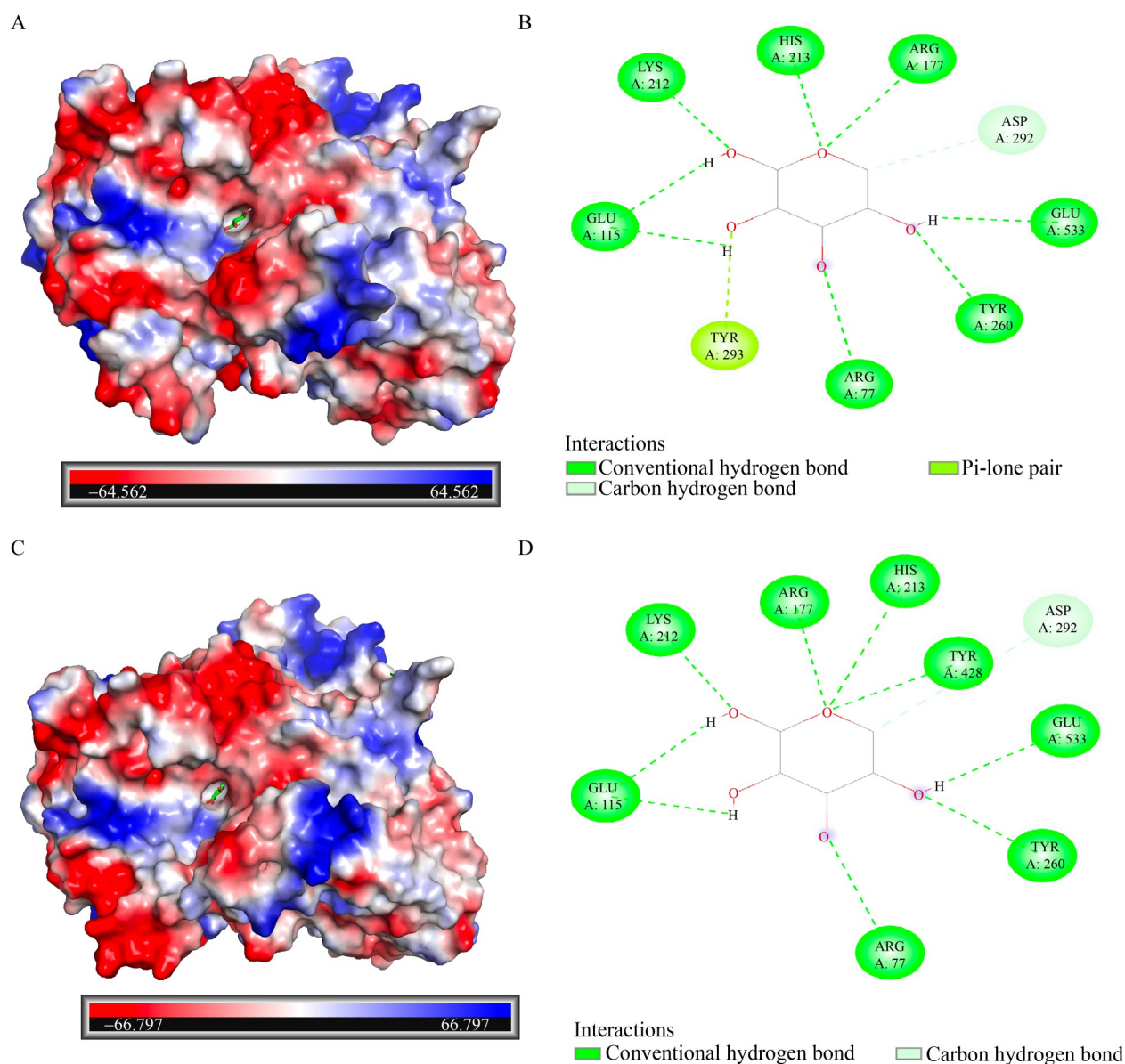


图9 EXYL与突变酶W138C分子对接后蛋白质表面静电势及相互作用2D展示图

Figure 9 Visualization of surface electrostatic potential and 2D interaction diagram for the EXYL and W138C mutant docking complex. A: Visualization of surface electrostatic potential for the EXYL; B: The 2D interaction diagram for the EXYL; C: Visualization of surface electrostatic potential for the W138C mutant; D: The 2D interaction diagram for the W138C.

甲基, 吡啶环与木糖可能形成的相互作用缺失, 木糖分子与活性口袋中的几个关键氨基酸位点的相互作用也发生了改变。进一步观察对接结果发现, 木糖分子在活性口袋的结合位置发生偏移, 可能处于更为靠近活性口袋入口的位置,

并且更倾向与非活性位点结合, 使得木糖更容易从活性口袋中脱落, W138C 突变酶表现出木糖耐受性提高。在实际应用中, 该类耐受木糖的 β -木糖苷酶具备更高的整体性能和应用价值, 该分子改造结果具有重要意义。

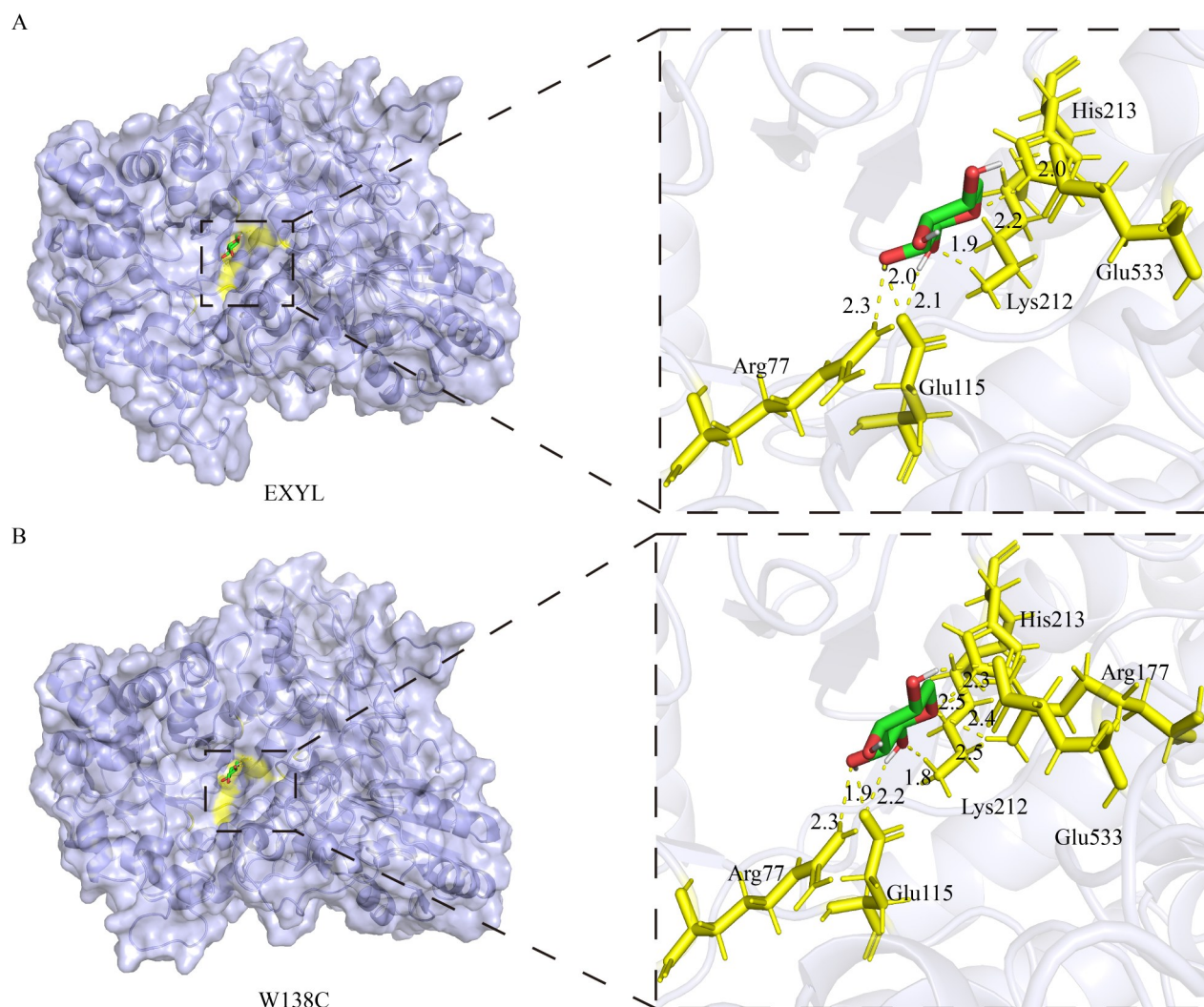


图10 EXYL和W138C与木糖分子对接细节图

Figure 10 Molecular docking of EXYL and the W138C mutant enzyme with xylose. A: The active site for EXYL and xylose binding; B: The active site for the W138C mutant enzyme and xylose binding.

3 结论

本研究探究了来自阴沟肠杆菌 GX-3 的注释为 GH3 糖苷水解酶家族的基因, 经过序列分析、结构比对确定其为 GH3 家族的糖苷水解酶。经过底物特异性分析确定该酶为兼具 α -阿拉伯糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性的 β -木糖苷酶, 酶活力之比为 344.8:104.1:1。测得酶的最适反应条件为 pH 5.5, 45 °C, K_m 为 (0.73 ± 0.06) mmol/L, V_{max} 为 (130.00 ± 6.85) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 木糖抑

制常数 K_i 为 (51.95 ± 2.36) mmol/L, EXYL 在 500 mmol/L 的木糖存在下仍可保持 70% 以上的相对酶活力。为获得木糖耐受性更高的 β -木糖苷酶突变体, 对第 138 位 Trp 进行定点突变, 突变酶 W138C 和 W138A 的木糖抑制常数 K_i 分别较野生型提高了 2.38 倍和 1.83 倍, W138C 和 W138A 的木糖抑制常数分别为 (123.80 ± 4.88) mmol/L 和 (95.09 ± 5.74) mmol/L。相比以往报道, 突变酶 W138C 和 W138A 木糖耐受性的提高具有一定意义。本研究不仅丰富了 GH3 糖苷水解酶家族

多功能 β -木糖苷酶的研究, 也为后续针对 β -木糖苷酶木糖耐受性的分子改造提供新思路。

作者贡献声明

唐林: 数据整理、论文撰写与实验操作; 刘庆: 实验操作和数据收集; 黄金群: 研究构思和设计; 廖桂东: 蛋白质及突变体酶的建模分析; 余晓婷: 参与论文修订与监督管理; 黄申申: 提供部分实验技术支持; 杜丽琴: 论文构思、写作指导、提供基金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Li GY, Wang R, Pang JF, Wang AQ, Li N, Zhang T. Production of renewable hydrocarbon biofuels with lignocellulose and its derivatives over heterogeneous catalysts[J]. Chemical Reviews, 2024, 124(6): 2889-2954.
- [2] Yadav V, Ahmed J, Thakur A, Vishwakarma P, Singh S, Kaur P, Goyal A. Structural insights of a putative β -1,4-xylosidase (PsGH43F) of glycoside hydrolase family 43 from *Pseudopedobacter saltans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 221: 751-762.
- [3] Zhao Y, Meng J, Wang YK, Zhao Q, Wang J, Gao WY. Research progress of β -xylosidase in green synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 306: 141404.
- [4] Thakur A, Sharma K, Goyal A. α -l-arabinofuranosidase: a potential enzyme for the food industry[M]// Parameswaran B, Varjani S, Raveendran S. Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing. Singapore: Springer Singapore, 2019: 229-244.
- [5] Knob A, Terrasan CRF, Carmona EC. β -xylosidases from filamentous fungi: an overview[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(3): 389-407.
- [6] Tong XY, Qi ZP, Zheng DY, Pei JJ, Li Q, Zhao LG. High-level expression of a novel multifunctional GH3 family β -xylosidase/ α -arabinosidase/ β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum* in *Escherichia coli*[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 111: 104906.
- [7] 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: 27.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Zhou J, Bao L, Chang L, Liu Z, You C, Lu H. Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from yak rumen metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans: characterization of a metagenomic GH3 β -glucosidase/xylosidase[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 54(2): 79-87.
- [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] Cheng HL, Zhao RY, Chen TJ, Yu WB, Wang F, Cheng KD, Zhu P. Cloning and characterization of the glycoside hydrolases that remove xylosyl groups from 7- β -xylosyl-10-deacetylaxol and its analogues[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12(8): 2236-2248.
- [13] Shin KC, Seo MJ, Oh DK. Characterization of β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and its application to the production of ginsenosides Rg1 and Rh1 from notoginsenosides R1 and R2[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(11): 2275-2281.
- [14] Li N, Zhang R, Zhou JP, Huang ZX. Structures, biochemical characteristics, and functions of β -xylosidases[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(21): 7961-7976.
- [15] Li Q, Wu T, Qi ZP, Zhao LG, Pei JJ, Tang F. Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39 β -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18: 29.
- [16] Zhang R, Li N, Xu SJ, Han XW, Li CY, Wei X, Liu Y, Tu T, Tang XH, Zhou JP, Huang ZX. Glycoside hydrolase family 39 β -xylosidases exhibit β -1,2-xylosidase activity for transformation of notoginsenosides: a new EC subclass[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(11): 3220-3228.
- [17] Kim JH, Yi YS, Kim MY, Cho JY. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases[J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(4): 435-443.
- [18] 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.
- [19] Smulek W, Kaczorek E, Hricovíniová Z. Alkyl xylosides: physico-chemical properties and influence on environmental bacteria cells[J]. Journal of Surfactants and Detergents, 2017, 20(6): 1269-1279.
- [20] 梁蒙, 林宇, 黄日波, 杜丽琴. β -木糖苷酶的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2022, 38(1): 1-10.
- Liang M, Lin Y, Huang RB, Du LQ. Research progress of β -xylosidase[J]. Journal of Guangxi Academy of

- Sciences, 2022, 38(1): 1-10 (in Chinese).
- [21] De A Ximenes F, de Paula Silveira FQ, Filho EXF. Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains[J]. *Current Microbiology*, 1996, 33(2): 71-77.
- [22] 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.
- [23] Jordan DB, Wagschal K, Fan ZM, Yuan L, Braker JD, Heng C. Engineering lower inhibitor affinities in β -D-xylosidase of *Selenomonas ruminantium* by site-directed mutagenesis of Trp145[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(11): 1821-1835.
- [24] Seidle HF, McKenzie K, Marten I, Shoseyov O, Huber RE. Trp-262 is a key residue for the hydrolytic and transglucosidic reactivity of the *Aspergillus niger* family 3 β -glucosidase: substitution results in enzymes with mainly transglucosidic activity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 444(1): 66-75.
- [25] Yan QJ, Wang L, Jiang ZQ, Yang SQ, Zhu HF, Li LT. A xylose-tolerant β -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: characterization and its co-action with the endogenous xylanase[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5402-5410.
- [26] Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999, 27(6): 756-762.
- [27] Kaenyng W, Choengpanya K, Tagami T, Wattana-Amorn P, Lang W, Okuyama M, Li YK, Kimura A, Kongsaree PT. Crystal structure and identification of amino acid residues for catalysis and binding of GH3 AnBX β -xylosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(7/8): 2335-2349.
- [28] Ramírez-Escudero M, del Pozo MV, Marín-Navarro J, González B, Golyshin PN, Polaina J, Ferrer M, Sanz-Aparicio J. Structural and functional characterization of a ruminal β -glycosidase defines a novel subfamily of glycoside hydrolase family 3 with permuted domain topology[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(46): 24200-24214.
- [29] 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-xylositol[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103357.
- [30] Zhang CC, Gao WJ, Song ZL, Dong MJ, Lin HX, Zhu G, Lian MK, Xiao YJ, Lu FP, Wang FH, Liu YH. Computation-aided phylogeny-oriented engineering of β -xylosidase: modification of “blades” to enhance stability and activity for the bioconversion of hemicellulose to produce xylose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(5): 2678-2688.
- [31] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1-43.
- [32] Han GQ, Hu XQ, Qin TY, Li Y, Wang XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 to produce S-adenosyl-L-methionine[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 83: 14-21.
- [33] Huy ND, 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.
- [34] 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-xy1 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 L, Peng C, Yu KP, Tang YL, Lin YL, Li LJ, Ni H, Li QB. Expression of β -xylosidase An-xy1 from *Aspergillus niger* and characterization of its xylose tolerance[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(11): 4593-4607 (in Chinese).
- [35] Salzano F, Aulitto M, Fiorentino G, Pedone E, Contursi P, Limauro D. *Alicyclobacillus mali* FL18 as a novel source of glycosyl hydrolases: characterization of a new thermophilic β -xylosidase tolerant to monosaccharides[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 14310.
- [36] 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 Q, 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).
- [37] 李琦. 耐热木糖苷酶的耐糖机理及在木聚糖和皂苷催化与转化中的应用[D]. 南京: 南京林业大学, 2020.
- Li Q. Sugar tolerance mechanism of thermostable β -xylosidase and its application in the catalysis of xylan and saponin[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [38] Ishiguro R, Tanaka N, Abe K, Nakajima M, Maeda T, Miyana A, Takahashi Y, Sugimoto N, Nakai H, Taguchi H. Function and structure relationships of a β -1,2-glucooligosaccharide-degrading β -glucosidase[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(23): 3926-3936.