

网络出版时间:2016-08-09 09:41

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.09.026

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160809.0941.052.html>

小麦木聚糖酶抑制蛋白的分离纯化及其性质研究

刘新育,崔世修,刘艳芳,贾新成,陈红歌

(河南农业大学 生命科学院 农业部农业微生物酶工程重点实验室,河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】从成熟的小麦籽粒中纯化小麦木聚糖酶抑制蛋白,并研究其对木聚糖酶的抑制作用,从而探明小麦中木聚糖酶抑制蛋白对外加木聚糖酶的影响。【方法】采用硫酸铵盐析、Macro-prep CM 阳离子交换层析、Macro-prep DEAE 阴离子交换层析以及 Macro-prep 25S 阳离子交换层析等方法,从小偃 22 小麦中分离纯化木聚糖酶抑制蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳检测木聚糖酶抑制蛋白的纯度和分子质量,并进一步研究了不同温度和反应时间对木聚糖酶抑制蛋白抑制活力的影响。【结果】小麦木聚糖酶抑制蛋白分子质量约为 29 ku,N 端氨基酸序列为 SVSSVVS,经 NCBI BLAST 比对,该抑制蛋白 N 端序列与其他木聚糖酶抑制蛋白无同源性,但与大麦几丁质酶的 N 端序列高度同源,却无几丁质酶活性;该蛋白对来自黑曲霉的 GH11 家族木聚糖酶有强烈的抑制活性,但对 GH10 家族的木聚糖酶不敏感;该蛋白与木聚糖酶结合的最适温度为 30 ℃,最佳时间为 30 min;该抑制蛋白的半失活温度为 74 ℃,具有较好的热稳定性。【结论】所获得的小麦木聚糖酶抑制蛋白可能是一种新型的 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白。

【关键词】 小麦;木聚糖酶;木聚糖酶抑制蛋白;抑制性质

【中图分类号】 TS210.1;S512.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)09-0195-06

Purification and properties of xylanase inhibitor protein in wheat

LIU Xinyu,CUI Shixiu,LIU Yanfang,

JIA Xincheng,CHEN Hongge

(Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology,Ministry of Agriculture,
College of Life Sciences,Henan Agricultural University,Zhengzhou,Henan 450002,China)

Abstract: 【Objective】 This experiment was conducted to purify xylanase inhibitory protein from mature wheat seed and study its inhibition to xylanase,which clarified the effects of xylanase inhibitor proteins in wheat-based diet on added xylanase.【Method】 The xylanase inhibitory protein from wheat variety Xiaoyan 22 was purified by salting out with ammonium sulfate,Macro-prep CM cation exchange chromatography,Macro-prep DEAE anion exchange chromatography and Macro-prep 25S cation exchange chromatography. The purity and molecular mass of xylanase inhibitory protein were checked by SDS-PAGE. Then,the effects of temperature and reaction time on inhibition of xylanase inhibitor protein were investigated.【Result】 The obtained inhibitor had a molecular mass of 29 ku approximately. Its N-terminal amino acid sequence of SVSSVVS was not similar to those of other xylanase inhibitors by NCBI BLAST program,while it had high similarity to chitinases in barley. The protein had no chitinase activity and strongly inhibited the activity of *Aspergillus niger* GH11 family xylanases,while insensitive to GH10 family xylanases. The optimum inhibition temperature and time for the inhibitor protein and xylanase were 30 ℃ and 30 min, respectively. The inhibitor had high thermal stability,with a temperature of remaining half inhibitory activ-

【收稿日期】 2015-01-05

【基金项目】 NSFC-河南人才培养联合基金项目(U1404324)

【作者简介】 刘新育(1976—),男,河南延津人,副教授,硕士,主要从事微生物酶学研究。E-mail:liuxinyu@henau.edu.cn

【通信作者】 陈红歌(1967—),女,河南许昌人,教授,博士,博士生导师,主要从事微生物酶学研究。E-mail:honggeyz@163.com

ity of 74 °C.【Conclusion】The obtained inhibitor in this work was probably a novel class of XIP-type xylanase inhibitor.

Key words: wheat; xylanase; xylanase inhibitor protein; inhibition characteristics

木聚糖酶添加到小麦面粉等谷物原料中后,其将以内切方式专一性地作用于麦类木聚糖主链内部的 β -1,4-木糖苷键,水解产物主要为低聚木糖以及少量的其他木糖,从而可解除大麦、小麦和麦麸等谷物原料中木聚糖对面团流变性和面食品质的不利影响,可显著增加面包体积,延缓面包老化^[1]。另外,在小麦谷朊粉-淀粉分离中添加包括木聚糖酶在内的复合酶,可以降低由木聚糖成分造成的面浆的黏性,促进谷朊粉更好地凝聚结块,从而提高谷朊粉和淀粉的得率^[2]。然而 Debyser 等^[3]发现,小麦中存在对木聚糖酶活性具有抑制作用的蛋白成分。在需要外加木聚糖酶而进行麦芽汁过滤、面包焙烤和谷朊粉-淀粉分离时,木聚糖酶抑制蛋白的存在对这些用酶过程会表现出一定的负面影响^[3-5]。

近几年研究发现,木聚糖酶抑制蛋白在小麦、玉米、水稻、大麦、黑麦、燕麦和高粱中广泛存在^[6-7]。至今已从小麦中分离纯化出 3 种木聚糖酶抑制蛋白,即 TAXI (*Triticum aestivum* xylanase inhibitor)^[8]、XIP(Xylanase inhibitor protein)^[9]和 TLXI (Thaumatococcus-like xylanase inhibitor)^[10],3 种抑制蛋白的基因也已被克隆并异源表达^[10-12]。小麦中的木聚糖酶抑制蛋白只作用于微生物来源的木聚糖酶,而对小麦自身的木聚糖酶并无抑制作用^[13];在水稻中过量表达木聚糖酶抑制蛋白 OsHI-XIP 和 RIXI,可有效增强植株对病原真菌的抵抗力^[14-15],因此木聚糖酶抑制蛋白也可归为植物防御相关蛋白。

木聚糖酶抑制蛋白在小麦的根、茎、叶片和籽粒中都有存在,其中以籽粒中含量最高^[16]。Croes 等^[17-18]采用免疫印迹定量法测定了 8 种小麦品系籽粒中 TAXI、XIP 和 TLXI 抑制蛋白的平均含量,分别为 133,235 和 112 mg/kg,3 种抑制蛋白总量可占小麦籽粒全部活性白蛋白与球蛋白总量的约 2.5%。由于小麦中存在高含量的木聚糖酶抑制蛋白,导致小麦加工工艺中所添加的木聚糖酶制剂并不能完全发挥其应有的作用。Frederix 等^[4]证实,来自棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的对抑制蛋白不敏感的木聚糖酶可以显著改善谷朊粉-淀粉的分离过程,而来自枯草芽孢杆菌的对抑制蛋白敏感的木聚糖酶在低剂量下对谷朊粉-淀粉的分离过程没有作用,只有在高剂量下才有改善作用。所以应当重视木聚糖酶

抑制蛋白对木聚糖酶应用领域可能产生的负面作用。

小麦木聚糖酶抑制蛋白可以通过从小麦中纯化或抑制蛋白基因的异源表达 2 种方法获得。研究表明,与天然的 TLXI 和 XIP 抑制蛋白相比,重组表达的 TLXI 或 XIP 抑制蛋白对木聚糖酶的抑制能力较弱,甚至失去抑制能力^[10,19],因此采用重组抑制蛋白进行研究不能准确反映天然状态下抑制蛋白的性质。但从小麦中纯化木聚糖酶抑制蛋白操作复杂,如 Goesaert 等^[20]从黑麦中纯化 TAXI 抑制蛋白时进行了 7 次阳离子交换层析和凝胶过滤层析。McLauchlan 等^[9]纯化 XIP 抑制蛋白时分别采用凝胶过滤层析、疏水层析和 4 次不同树脂的离子交换层析。而将木聚糖酶固定化后进行抑制蛋白的亲层层析,再辅以离子交换层析,则可大大简化纯化流程^[21],然而,如何获得较高的木聚糖酶固定化效率也是此类试验的一大难题。

Flatman 等^[22]利用等离子共振和电泳滴定曲线方法,研究了不同 pH 对 XIP 与木聚糖酶形成二聚体的影响,热稳定性研究发现,煮沸条件下 XIP 会失去抑制作用;并进一步测定了抑制动力学,研究了抑制蛋白对不同木聚糖酶的抑制谱。然而有关 XIP 抑制蛋白与木聚糖酶的最适抑制时间、最适抑制温度以及温度对 XIP 稳定性的影响,尚未见报道。为此,本试验拟采用更为简易的方法分离纯化小麦木聚糖酶抑制蛋白,进一步研究其对木聚糖酶的抑制性质,以便于在小麦加工工艺中通过优化用酶条件来避开抑制蛋白的不利影响,减少木聚糖酶的活性损失。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦品种为小偃 22,桦木木聚糖为 Sigma 产品。

1.2 小麦木聚糖酶抑制蛋白的提取与纯化

小麦木聚糖酶抑制蛋白的提取与纯化按照文献^[4]的方法但略有改动。取小偃 22 小麦籽粒 1 kg 粉碎,溶于 2 L 蒸馏水中,混匀,4 °C 振荡 30 min,12 000×g、4 °C 离心 30 min,取上清液加入固体硫酸铵至 30%~80%饱和度,在 4 °C、12 000×g 下离心 15 min 进行分级沉淀。沉淀用 0.05 mol/L、pH

7.0的咪唑/HCl缓冲液溶解,并在该缓冲液中透析过夜除盐。样品经Macro-prep CM阳离子交换层析,用0~0.7 mol/L NaCl进行梯度洗脱,收集有蛋白吸收峰值的流出样,缓冲液透析后测定其抑制活性,合并有抑制活性的部分。合并的样品用质量分数20%的PEG20000过夜透析,再用0.05 mol/L、pH 10.0的Tris/HCl缓冲液溶解,进行Macro-prep DEAE阴离子交换层析,收集有蛋白吸收峰的流出样并测定其抑制活性。合并有抑制活性的部分,用质量分数为20%的PEG20000过夜透析,并溶于0.05 mol/L、pH 7.8的咪唑/HCl缓冲液,进行Macro-prep 25S阳离子交换层析,收集有蛋白吸收峰的部分,缓冲液透析后测其抑制活性及蛋白质量浓度,SDS-PAGE电泳检测木聚糖酶抑制蛋白的纯度。

1.3 分子质量的测定

采用SDS-PAGE测定木聚糖酶抑制蛋白的相对分子质量,分离胶质量浓度为100 g/L,浓缩胶质量浓度为30 g/L,采用考马斯亮蓝R250染色。采用低分子质量标准蛋白质,分子质量为14.4~97.2 ku(其中兔磷酸化酶B,分子质量97.2 ku;牛血清白蛋白,分子质量66.4 ku;兔肌动蛋白,分子质量44.3 ku;牛碳酸酐,分子质量29 ku;胰蛋白酶抑制剂,分子质量20.1 ku;鸡蛋清溶菌酶,分子质量14.4 ku)。在SDS-PAGE电泳图谱上用直尺分别量出标准蛋白质、待测蛋白质条带中心和溴酚蓝前沿距分离胶顶端的迁移距离,再按下式计算相对迁移率:

相对迁移率=样品迁移距离/溴酚蓝前沿迁移距离。

以标准蛋白质分子质量的常用对数($\lg Mr$)对相对迁移率作图,得到标准曲线方程为: $Y = -1.0469X + 2.0968$ (其中 Y 为 $\lg Mr$, X 为相对迁移率),根据待测蛋白质样品的相对迁移率,从标准曲线上查出其相对分子质量的常用对数,再换算出其相对分子质量。

1.4 蛋白质含量的测定

采用Folin-酚法^[23]测定木聚糖酶抑制蛋白的含量,以不同质量浓度牛血清蛋白为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:

$$Y = 0.53X - 0.022。$$

式中: Y 为蛋白质量浓度,mg/mL; X 为吸光度值。

将待测木聚糖酶抑制蛋白在500 nm处的吸光度值代入上述计算公式,即可计算得到蛋白含量。

1.5 木聚糖酶和纤维素酶的制备

1.5.1 重组酵母GH11木聚糖酶的制备 以带有黑曲霉GH11木聚糖酶基因(GenBank登录号EU375728)的毕赤酵母GS115-xyn菌株(本实验室构建)作为木聚糖酶生产菌,该菌经甲醇诱导发酵,离心后上清即为木聚糖酶纯酶液。

1.5.2 重组大肠杆菌GH10木聚糖酶的制备 以带有黑曲霉GH10木聚糖酶基因(SwissProt登录号A2QFV7)的大肠杆菌BL21(DE3)(本实验室构建)作为木聚糖酶生产菌,该菌经IPTG诱导发酵,离心收集沉淀进行超声波破碎,再经离心取上清进行亲和层析纯化,获得木聚糖酶纯酶液。

1.5.3 木聚糖酶粗酶液的制备 将黑曲霉(*Aspergillus niger*)或斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)分别接种于木聚糖酶产酶培养基(玉米芯20 g/L,麸皮20 g/L,葡萄糖2 g/L,蛋白胨10 g/L,Tween-80 1.5 g/L,蒸馏水1 L,初始pH为6.0)上,33℃下培养76 h,10 000×g离心10 min,上清即为木聚糖酶粗酶液。

1.5.4 纤维素酶粗酶液的制备 将黑曲霉或斜卧青霉分别接种于纤维素酶产酶培养基(麸皮40 g/L,蒸馏水1 L)上,33℃下培养76 h,10 000×g离心10 min,上清即为纤维素酶粗酶液。

1.6 木聚糖酶活力的测定

取0.1 mL木聚糖酶粗酶液,加入0.1 mL质量分数2%桦木木聚糖(Sigma)底物溶液(用0.2 mol/L、pH 4.6的HAC-NaAC缓冲液配制),50℃保温15 min后,立即加入0.6 mL DNS(3,5-二硝基水杨酸)试剂,煮沸10 min显色,定容至5 mL,于550 nm波长下测定还原糖含量(以木糖计),样品重复测定3次。在上述条件下,以每分钟产生1 μmol木糖所需的酶量为1个酶活力单位(IU/mL)。

1.7 木聚糖酶抑制活力的测定

适当稀释GH11木聚糖酶纯酶液,使其OD_{550 nm}值在0.6~0.8(木聚糖酶活力相当于0.92~1.23 IU/mL)。取0.2 mL该木聚糖酶酶液,加入0.2 mL抑制蛋白提取液,混匀,30℃保温30 min。从保温后的混合液中取0.1 mL测定残余木聚糖酶活力,以磷酸缓冲液代替抑制蛋白溶液作为对照。样品测定重复3次。计算抑制活力:抑制活力=(对照木聚糖酶活力-残余木聚糖酶活力)/对照木聚糖酶活力×100%。

1.8 木聚糖酶抑制蛋白抑制性质分析

1.8.1 最适抑制温度 将0.2 mL重组酵母GH11

木聚糖酶纯酶液与 0.2 mL 抑制蛋白提取液混合, 分别置于 20, 30, 40 和 50 ℃ 的水浴锅中保温 30 min, 测定残余木聚糖酶活力, 计算抑制蛋白的抑制活力, 最大抑制活力对应的反应温度即为最适抑制温度。

1.8.2 温度稳定性 将抑制蛋白提取液分别置于 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 和 100 ℃ 水浴锅中保温 1 h, 然后取 0.2 mL 提取液与 0.2 mL 重组酵母 GH11 木聚糖酶纯酶液混合, 测定残余木聚糖酶活力, 计算抑制蛋白的抑制活力, 确定影响抑制蛋白稳定性的温度范围。抑制蛋白对木聚糖酶的最大抑制活力下降 1/2 时对应的温度即为半失活温度。

1.8.3 最适抑制时间 将 0.2 mL 重组酵母 GH11 木聚糖酶纯酶液与 0.2 mL 抑制蛋白提取液混合, 分别保温 10, 20, 30, 40, 50 和 60 min, 测定残余木聚糖酶活力, 计算抑制蛋白的抑制活力, 最大抑制活力对应的反应时间即为最适抑制时间。

1.8.4 抑制谱 将 0.2 mL 抑制蛋白提取液分别与 0.2 mL 1.5 节的木聚糖酶或纤维素酶溶液混合, 保温 30 min 后测定残余木聚糖酶活力, 计算抑制蛋白的抑制活力。

2 结果与分析

2.1 小麦木聚糖酶抑制蛋白的分离纯化

小麦籽粒粗蛋白提取液经过分离纯化后, SDS-PAGE 电泳检测表明, 该抑制蛋白电泳条带较为均一(图 1), 分子质量为 29 ku 左右。将纯化的抑制蛋白送上海基康生物技术有限公司, 采用 Edman 降解法测 N 端序列, 结果为 SVSSVVS。经 NCBI 比对,

该 N 端序列与目前已发现的 3 种小麦木聚糖酶抑制蛋白均无同源性, 却与来自大麦的 2 种几丁质酶(在蛋白质数据库 PDB 中的登录号分别为 1CNS_A 和 2BAA)具有高度同源性。经测定, 该蛋白无几丁质酶活性(数据未显示)。

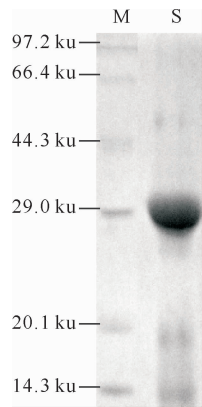


图 1 小麦木聚糖酶抑制蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
M. 标准分子质量蛋白; S. 小麦木聚糖酶抑制蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE of wheat xylanase inhibitor protein

M. Standard molecular weight protein Marker;

S. Wheat xylanase inhibitor protein

2.2 小麦木聚糖酶抑制蛋白的最适抑制温度

不同温度下抑制蛋白对木聚糖酶抑制活力的测定结果见图 2。由图 2 可知, 当抑制反应温度在 20 ℃ 时, 抑制蛋白对木聚糖酶的抑制活力最低; 当抑制反应温度在 30 ℃ 时, 抑制蛋白对木聚糖酶的抑制活力最高; 而当抑制反应温度为 40, 50 ℃ 时, 抑制蛋白的抑制活力有所降低, 但总体变化不大, 因此木聚糖酶抑制蛋白对木聚糖酶的最佳抑制温度为 30 ℃。

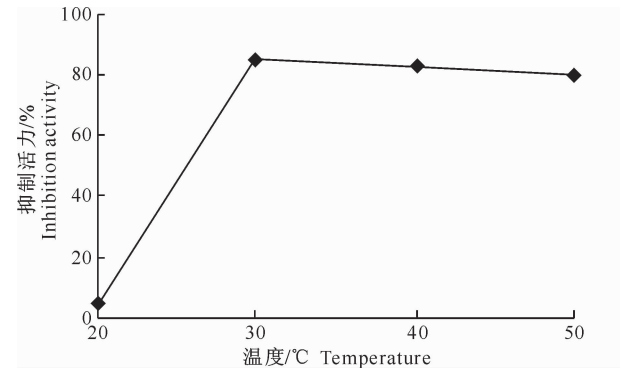


图 2 温度对小麦木聚糖酶抑制蛋白抑制活力的影响
Fig. 2 Effect of temperature on inhibition activity of wheat xylanase inhibitor protein

2.3 小麦木聚糖酶抑制蛋白的温度稳定性

将小麦木聚糖酶抑制蛋白在不同温度下保温

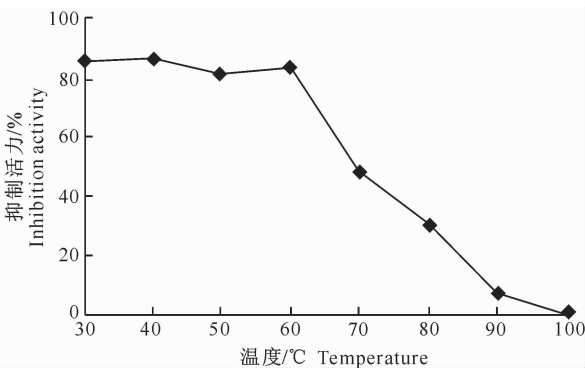


图 3 小麦木聚糖酶抑制蛋白的温度稳定性
Fig. 3 Temperature stability of wheat xylanase inhibitor protein

后, 测定其对木聚糖酶的抑制作用, 结果见图 3。由图 3 可知, 在 30~60 ℃ 内保温 1 h 对抑制蛋白的活

力没有影响,当温度高于 60 ℃ 时,抑制活力开始迅速下降,100 ℃ 时基本没有抑制活力,得出抑制蛋白的半失活温度为 74 ℃。

2.4 小麦木聚糖酶抑制蛋白的最适抑制时间

将小麦木聚糖酶抑制蛋白与木聚糖酶保温不同时间后,测定其对木聚糖酶的抑制作用,结果见图 4。由图 4 可知,抑制蛋白与酶液保温 30 min 为最适抑制时间,抑制活力可以达到最大。

2.5 小麦木聚糖酶抑制蛋白的抑制谱分析

测定小麦木聚糖酶抑制蛋白对不同来源木聚糖酶或纤维素酶的抑制作用,结果见表 1。由表 1 可知,该抑制蛋白对黑曲霉 GH11 家族的木聚糖酶有强烈的抑制活性,抑制活力达 87%,而对 GH10 家族的真菌木聚糖酶无抑制活力。同时,该抑制蛋白对真菌来源纤维素酶具有抑制活力,抑制活力可达

23%~27%。

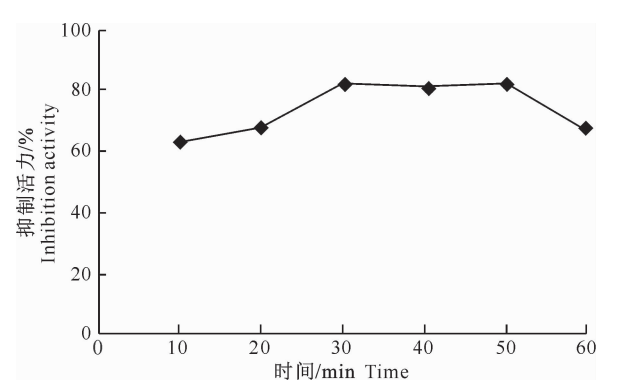


图 4 反应时间对小麦木聚糖酶抑制蛋白抑制活力的影响

Fig. 4 Effects of reaction time on inhibition activity of wheat xylanase inhibitor protein

表 1 小麦木聚糖酶抑制蛋白的抑制谱

木质纤维素降解酶 Lignocellulolytic enzymes	抑制活力/% Inhibition activity
纯化的黑曲霉 GH11 木聚糖酶(毕赤酵母表达) Purified <i>A. niger</i> GH11 xylanase(expressed in <i>Pichia pastoris</i>)	87
纯化的黑曲霉 GH10 木聚糖酶(大肠杆菌表达) Purified <i>A. niger</i> GH10 xylanase(expressed in <i>Escherichia coli</i>)	0
黑曲霉木聚糖酶粗酶液 Crude xylanase from <i>A. niger</i>	75
斜卧青霉木聚糖酶粗酶液 Crude xylanase from <i>P. decumbens</i>	32
黑曲霉纤维素酶粗酶液 Crude cellulase from <i>A. niger</i>	23
斜卧青霉纤维素酶粗酶液 Crude cellulase from <i>P. decumbens</i>	27

3 讨 论

本试验纯化到的小麦木聚糖酶抑制蛋白,其分子质量大小及抑制活力与多种谷物来源的 XIP 型抑制蛋白都很接近^[19],不同之处在于这些 XIP 型抑制蛋白能够同时抑制真菌来源的 GH10 和 GH11 木聚糖酶^[11],而本试验中的抑制蛋白只能抑制真菌来源的 GH11 木聚糖酶,并对真菌来源纤维素酶具有一定的抑制作用。Goesaert 等^[24]研究发现,来自硬质小麦、黑麦、大麦和玉米等不同谷物的 XIP 具有高度相似的 N 端氨基酸序列,然而本试验所得抑制蛋白的 N 端氨基酸序列 SVSSVVS 却与已发现的 TAXI、XIP 和 TLXI 木聚糖酶抑制蛋白之间都不具有序列同源性,而是与来自大麦的 2 种几丁质酶的 N 端氨基酸序列 SVSSIVS 只有 1 个氨基酸的差异,对应的碱基序列也只有 1 个碱基的差异;而 XIP 型抑制蛋白与植物的 3 类几丁质酶在序列和结构上有很高的相似性,Durand 等^[19]推测,XIP 型抑制蛋白极有可能是从几丁质酶进化而来,因此可以推测

本试验的木聚糖酶抑制蛋白可能是一种新型的 XIP 抑制蛋白。为了最终确定该抑制蛋白的种类以及与 TAXI、XIP 和 TLXI 抑制蛋白之间的关系,还需要进一步通过测定氨基酸组分或者该抑制蛋白的完整基因序列并进行比对分析。

本试验获得的抑制蛋白能够专一性地抑制真菌 GH11 木聚糖酶,但是不能作用于真菌 GH10 家族木聚糖酶;同时 TAXI 和 TLXI 抑制蛋白也只能作用于 GH11 家族木聚糖酶,对 GH10 木聚糖酶无抑制作用^[10-11],因此为了避免小麦面粉中这 3 类抑制蛋白对外加木聚糖酶制剂的阻碍作用,添加真菌 GH10 木聚糖酶比添加 GH11 木聚糖酶将会发挥更好的效果。如果对 GH10 木聚糖酶上与 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白相结合的位点进行定点突变,可获得不能被所有类型木聚糖酶抑制蛋白抑制的 GH10 木聚糖酶突变体,若将此突变酶添加到面粉焙烤或谷朊粉-淀粉分离工艺中,预计将有更好的用酶效果。

本研究所纯化的抑制蛋白与木聚糖酶结合的最适温度为 30 ℃,最佳时间为 30 min,因此在面粉焙

烤或谷朥粉-淀粉分离工艺添加木聚糖酶反应的环节中,为了最大程度地避免面粉中抑制蛋白对木聚糖酶的不利影响,最好将面粉加工条件控制在 30 ℃ 以下、30 min 以内完成。然而,较低的温度与较短的反应时间同时又会降低木聚糖酶的催化效果,因此控制面粉加工条件需要同时兼顾木聚糖酶催化效果的最大化和抑制蛋白作用的最小化,这需要进行深入研究。

4 结 论

1)从小偃 22 小麦中纯化到了一种木聚糖酶抑制蛋白,分子质量约为 29 ku,该抑制蛋白可能是一种新型的 XIP 型木聚糖酶抑制蛋白。

2)所纯化的抑制蛋白对来自黑曲霉的 GH11 家族重组 endo-β-1,4-木聚糖酶有强烈的抑制活性,对真菌来源的纤维素酶也具有一定的抑制作用,但对 GH10 家族的真菌木聚糖酶不敏感,表明该抑制蛋白对不同结构的木聚糖酶具有不同的抑制作用。

3)所纯化的抑制蛋白与木聚糖酶结合的最适温度为 30 ℃,最佳时间为 30 min;抑制蛋白的半失活温度为 74 ℃,具有较好的热稳定性。

[参考文献]

[1] 李金春,杨 然,李秀婷,等.微生物木聚糖酶在食品工业中的应用进展[J].中国食品学报,2012,12(6):133-140.
Li J C, Yang R, Li X T, et al. Research on application of micro-organism xylanases in food industry [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(6): 133-140.

[2] Weegels P L, Marseille J P, Hamerr J. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten [J]. Starch-Stärke, 1992, 44(2): 44-48.

[3] Debyser W, Derdelinckx G, Delcour J A. Arabinoxylan solubilisation and inhibition of the barely malt xylanolytic system by wheat during brewing with wheat whole meal adjunct: evidence for a new class of enzyme inhibitor [J]. Journal of the American Society Brewing Chemists, 1997, 55(4): 153-156.

[4] Frederix S A, Courtin C A, Delcour J A. Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation [J]. Journal of Cereal Science, 2004, 40(1): 41-49.

[5] Gebruers K, Courtin C M, Moers K, et al. The bread-making functionalities of two *Aspergillus niger* endoxylanases are strongly dictated by their inhibitor sensitivities [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4): 417-425.

[6] Beaugrand J, Gebruers K, Ververken C, et al. Antibodies against wheat xylanase inhibitors as tools for the selective identification of their homologues in other cereals [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(1): 59-67.

[7] Lin P, Wong J H, Ng T B, et al. A sorghum xylanase inhibitor-like protein with highly potent antifungal, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2916-2922.

[8] Debyser W, Peumans W J, Van Damme E J M, et al. *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance [J]. Journal of Cereal Science, 1999, 30: 39-43.

[9] McLauchlan W R, Garcia-Conesa M T, Williamson G, et al. A novel class of protein from wheat which inhibits xylanase [J]. Biochemical Journal, 1999, 338(2): 441-446.

[10] Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, et al. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family [J]. Biochemical Journal, 2007, 403(3): 583-591.

[11] Fierens K, Geudens N, Brijs K, et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I. secreted by the yeast *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 37(1): 39-46.

[12] Elliott G O, Hughes R K, Juge N, et al. Functional identification of the cDNA coding for a wheat endo-1,4-beta-D-xylanase inhibitor [J]. FEBS Letters, 2002, 519(1): 66-70.

[13] Gebruers K, Brijs K, Courtin C M, et al. Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1696(2): 213-221.

[14] Xin Z J, Wang Q, Yu Z N, et al. Overexpression of a xylanase inhibitor gene, OsHI-XIP, enhances resistance in rice to herbivores [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(2): 465-475.

[15] Hou C X, Lv T, Zhan Y H, et al. Overexpression of the RIXI xylanase inhibitor improves disease resistance to the fungal pathogen, *Magnaporthe oryzae*, in rice [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2015, 120(1): 167-177.

[16] 王明道,魏照辉,张俊丽,等.小麦不同生育时期木聚糖酶活性及木聚糖酶抑制蛋白活性的变化[J].麦类作物学报,2010,30(3):544-547.
Wang M D, Wei Z H, Zhang J L, et al. Changes of xylanase activity and xylanase inhibitor activity in wheat at different growth stages [J]. Journal of Triticeae Crops, 2010, 30(3): 544-547.

[17] Croes E, Gebruers K, Robben J, et al. Variability of polymorphic families of three types of xylanase inhibitors in the wheat grain proteome [J]. Proteomics, 2008, 8(8): 1692-1705.

[18] Croes E, Gebruers K, Luyten N, et al. Immunoblot quantification of three classes of proteinaceous xylanase inhibitors in different wheat (*Triticum aestivum*) cultivars and milling fractions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(3): 1029-1035.

[19] Durand A, Hughes R, Roussel A, et al. Emergence of a sub-family of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18 [J]. FEBS J, 2005, 272(12): 1745-1755.

- one-pot synthesis of 4-hydroxycoumarin and 4-hydroxy-2-quinolinone derivatives [J]. Synthetic Communications, 2010, 40(5):732-738.
- [11] 高文涛,郑美茹,侯文端. 米氏酸在杂环化合物合成中的应用研究进展 [J]. 有机化学, 2010, 30(7):958-967.
Gao W T, Zheng M R, Hou W D. Progress in application of meldrum's acid to synthesis of heterocyclic compounds [J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2010, 30(7):958-967.
- [12] 李 森,张金波,杨吉春,等. 新型含吡唑环的 N-甲氧基氨基甲酸甲酯类化合物的设计、合成及生物活性 [J]. 高等化学学报, 2009, 30(7):1348-1352.
Li M, Zhang J B, Yang J C, et al. Design, synthesis and bioactivity of new N-Methoxycarbamate containing pyrazole [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2009, 30(7):1348-1352.
- [13] 李 焰,周叶兵,刘 杰,等. 新型杀菌剂醚菌酯的合成研究 [J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2005, 27(1):14-16.
Li Y, Zhou Y B, Liu J, et al. Studies on synthesis of kresoxim-methylase a new class of fungicides [J]. Journal of Hubei University(Natural Science), 2005, 27(1):14-16.
- [14] 周文明,王昌钊,李长杰,等. 新三唑类化合物的合成及抑菌活性的研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(6):147-150.
Zhou W M, Wang C Z, Li C J, et al. Synthesization and fungicidal activities of new triazole compounds [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 2005, 33(6):147-150.
- [15] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论 [M]. 西安:陕西科学与技术出版社, 1988:123-127.
Wu W J. Experimental techniques of plant chemical protection introduction discipline [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1988:123-127.
-

(上接第 200 页)

- [20] Goesaert H, Gebruers K, Courtin C M, et al. A family of 'TA-XI'-like endoxylanase inhibitors in rye [J]. Journal of Cereal Science, 2002, 36(2):177-185.
- [21] Mokrane H, Gebruers K, Beaugrand J, et al. Algerian pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) contains XIP but not TAXI and TLXI type xylanase inhibitors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12):5542-5548.
- [22] Flatman R, McLauchlan W R, Juge N, et al. Interaction defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP- I from wheat [J]. Biochemical Journal, 2002, 365(3):773-781.
- [23] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京:科学出版社, 2002:164-166.
Chen Y Q. The experimental means and technology of biochemistry [M]. Beijing: Science Press, 2002:164-166.
- [24] Goesaert H, Gebruers K, Brijs K, et al. XIP-type endoxylanase inhibitors in different cereals [J]. Journal of Cereal Science, 2003, 38(3):317-324.