

重组木聚糖酶 xynP N-末端对酸稳定性的影响 及在苹果汁澄清中的应用

覃池, 刘书亮, 李建龙, 胡凯弟, 赵宁, 李琴*
(四川农业大学食品学院 四川雅安 625000)

摘要 为探究 N-末端对木聚糖酶酸稳定性的影响,从 NCBI 数据库中筛选 1 段基因序列进行克隆表达,设计响应面试验获得最佳表达条件。从 N-末端入手,采用重叠延伸 PCR 技术对 N-末端置换构建突变体,表征木聚糖酶活力及相关酶学性质。将该酶应用于苹果汁中,研究其澄清效果。结果表明:在 100 mL TB 培养基中接入 1.5% 种子液,诱导时机为 3.5 h,添加 200 μ L 500 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),在 20 $^{\circ}$ C 诱导 21.6 h 得到最佳木聚糖酶 xynP 表达条件,其酶活为 1 884 U/mL。木聚糖酶 xynP 和突变酶 xynP-1 的最适温度均为 40 $^{\circ}$ C,最适 pH 值分别为 4.5 和 5.0。在不同 pH 值处理后,突变酶 xynP-1 在较酸的条件下(pH=4.0)稳定性略弱于野生型木聚糖酶 xynP,而随着 pH 值的增加(pH 4.5~5.5)其酸稳定性均高原酶 xynP,说明 N-末端对木聚糖酶的酸稳定性有一定影响。金属离子 Pb^{2+} 和化学试剂十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)对 2 种酶活力有明显的抑制作用。以榉木木聚糖为底物时测得两种酶的 K_m 值分别为 1.72 mg/mL 和 2.57 mg/mL; v_{max} 值分别为 0.93 nmol/(mg \cdot min)和 1.15 nmol/(mg \cdot min),突变酶的底物亲和力和催化效率均不及原酶。将 2 种酶应用于苹果汁中,加原酶 xynP 和突变酶 xynP-1 后,果汁透光率分别由 24.33% 提高到 90.03% 和 95.70%,说明添加木聚糖酶 xynP 对苹果汁有显著的澄清效果。该研究结果为后续探究木聚糖酶在果汁加工中的应用提供了参考。

关键词 木聚糖酶; N-末端替换; 酶学性质; 果汁澄清

文章编号 1009-7848(2024)11-0163-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.11.016

木聚糖是自然界中含量第二丰富的多糖,仅次于纤维素^[1]。木聚糖结构复杂,它的降解过程中涉及多种木聚糖水解酶,其中 β -1,4-D-内切木聚糖酶能够裂解木聚糖的主要糖苷键,在水解过程中起关键作用,这种酶也被简称为木聚糖酶^[2]。随着人们对自然生物资源的不断开发与利用,木聚糖酶作为一种环保且高效的生物催化剂,其应用领域正不断扩展,在制浆造纸、食品工业、动物饲料和医疗保健等领域广泛应用^[3-5]。

近年来,随着人们生活水平的提高和消费方式的改变,果汁饮料在我国发展潜力巨大,苹果汁作为我国苹果资源的有效利用方式,其口感甘甜、色泽诱人,富含大量酚类化合物、微量元素等,营养价值丰富,深受大众喜爱^[6]。然而,加工过程中出现的浑浊现象制约着苹果汁产业的快速发展^[7]。目

前,工业生产中常采用物理化学方法来提高果汁澄清度,而这些方法存在成本高、操作复杂等缺点。相比之下,酶法澄清工艺能规避这些不足,具有操作简单,反应条件温和,营养成分损失少等优点^[8-9]。有研究将果胶酶、纤维素酶和木聚糖酶等用于果汁澄清,具有一定的效果^[10-11]。其中,一些水果,如菠萝、苹果等除富含果胶外,还含有相当多的半纤维素^[12],木聚糖酶因其能够去除果汁中过量的半纤维素促使果汁澄清,从而被广泛应用于果汁加工生产中。

本文从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中筛选到 1 段基因序列,命名为 xynP(xynP 基因序列 NCBI 登录号为 XP022486268.1),合成并克隆后予以异源表达。设计响应面试验,对影响酶活力较大的因素进行优化,从而提高木聚糖酶的表达水平。对其 N-末端进行置换,探究 N-末端对木聚糖酶酸稳定性的影响。将木聚糖酶应用于澄清苹果汁,为该方法在生产上的应用提供参考。

收稿日期: 2023-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901634);四川省科技厅项目(2022NSFSC1739);省级大学生创新创业训练计划项目(S202310626099)

第一作者: 覃池,女,硕士,助理工程师

通信作者: 李琴 E-mail: 17888820100@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

目的基因 *xynP* 从 NCBI 数据库中筛选并送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。感受态细胞大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3)均购买于天根生化科技有限公司。克隆载体 pMD18-T Vector 和表达载体 pET-28a(+) Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。

Q5 超保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nco*I、*Not*I、T4 DNA 连接酶,美国 New England Biolabs 公司;DNA Maker、2.5 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)配制试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;桦木木聚糖, Sigma 公司;氨苄青霉素钠 (Ampicillin sodium, Amp)、硫酸卡那霉素 (Kanamycin sulfate, Kan)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG),北京索莱宝科技有限公司;其它试剂如无特殊说明均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-1800PC 型紫外/可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;JY92-IIDN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;C1000 Thermal Cycler 型 PCR 仪、SUB-CELL GT 型水平电泳槽、PowerPac Basic 型凝胶电泳仪、Gel Doc XR+型凝胶成像分析系统,美国 Bio-RAD 公司;Sorvall ST 16R 型冷冻离心机,美国赛默飞公司;SZB-20 型制冰机,常熟市菱科电器有限公司;ZWY-2102C 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司。

1.3 培养基配方

1.3.1 Luria-Bertani(LB)液体培养基(g/L) 蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g、酵母膏 5 g、水 1 000 mL;固体培养基需添加 2%琼脂。

1.3.2 Terrific-Broth(TB)液体培养基(g/L) 胰蛋白胨 12 g, 酵母提取物 24 g, 甘油 4 mL, 水 900 mL, 100 mL 磷酸盐缓冲液。

1.3.3 Yeast peptone broth(2 \times YT)液体培养基 胰蛋白胨 16 g, 酵母提取物 10 g, 氯化钠 5 g, 水

1 000 mL。

1.3.4 Tryptone Soy Broth(TSB)培养基 胰蛋白胨 15 g,大豆蛋白胨 5 g,氯化钠 5 g,水 1 000 mL。

1.4 方法

1.4.1 目的基因的克隆与表达 根据 NCBI 数据库筛选出的目的基因序列,设计特异性 PCR 扩增引物 F:5'-CATGCCATGGCCCAGACCATTACCA CCAGCCAGACTG-3' 和 R:5'-ATAAGAATGCCGCCGCCGAAACAGTGATGGAAGAAGAACCA -3' 进行目的基因的 PCR 扩增,其中划线部分分别为限制性内切酶 *Nco*I 和 *Not*I 的酶切位点。PCR 反应体系为:DNA 模板 1.25 μ L,引物 F 1.25 μ L,引物 R 1.25 μ L,5 \times 缓冲溶液 5 μ L,dNTP 混合物 2 μ L,Q5 超保真 DNA 聚合酶 0.25 μ L,ddH₂O 14.0 μ L。PCR 反应条件为:98 $^{\circ}$ C 30 s;98 $^{\circ}$ C 10 s,68 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,重复 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 结束。PCR 扩增产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,参照 DNA 回收试剂盒说明书对 PCR 产物进行回收纯化。将回收的 PCR 产物经 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 连接,转染至大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆测序验证并保存。基于载体上携带的抗性基因,每 100 mL 培养基中添加 100 μ L 的 100 mg/mL 氨苄抗生素,在 LB 培养基中培养并测序验证。测序正确的基因在 *Nco*I 和 *Not*I 酶切位点与 pET28a(+)连接,然后转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)中,重组菌株为 *xynP*。

1.4.2 木聚糖酶的诱导表达条件优化

1.4.2.1 单因素实验设计 将重组菌株 *xynP* 接种到含有卡那霉素(Kan)的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 条件下振荡培养,待菌液 OD_{600nm} 值为 0.5~0.6 时作为种子液备用。选择 100 mL LB 培养基添加 2.0%种子液,诱导时机(未加 IPTG 的培养时间)为 3.5 h,500 mmol/L IPTG 添加量为 200 μ L,诱导温度为 20 $^{\circ}$ C,诱导时间为 16 h 作为木聚糖酶 *xynP* 的初始表达条件。每次只改变一个因素,其它因素不变,研究单一变量对木聚糖酶诱导表达的影响。

1) 培养基的影响 在诱导温度 20 $^{\circ}$ C、接种量 2.0%、500 mmol/L IPTG 200 μ L、诱导时间 16 h、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究培养基 LB、TB、2 \times YT、TSB 对木聚糖酶诱导表达的影响。

2) 接种量的影响 在 LB 培养基中按诱导温度 20 ℃、500 mmol/L IPTG 200 μL、诱导时间 16 h、诱导时机 3.5 h 的条件,研究接种量分别为 1%、1.5%、2%、2.5%、3% 时对木聚糖酶诱导表达的影响。

3) 诱导时机的影响 在 LB 培养基中按诱导温度 20 ℃、接种量 2.0%、500 mmol/L IPTG 200 μL、诱导时间 16 h 的条件,研究诱导时机分别为 2、2.5、3、3.5、4 h 时对木聚糖酶诱导表达的影响。

4) 500 mmol/L IPTG 添加量的影响 在 LB 培养基中按诱导温度 20 ℃、接种量 2.0%、诱导时间 16 h、诱导时机 3.5 h 的条件,研究 500 mmol/L IPTG 添加量分别为 100、150、200、250、300 μL 时对木聚糖酶诱导表达的影响。

5) 诱导温度的影响 在 LB 培养基中按接种量 2.0%、500 mmol/L IPTG 200 μL、诱导时间 16 h、诱导时机 3.5 h 的条件,研究诱导温度分别为 16、18、20、22、24 ℃ 时对木聚糖酶表达的影响。

6) 诱导时间的影响 在 LB 培养基中按诱导温度 20 ℃、接种量 2.0%、500 mmol/L IPTG 量为 200 μL、诱导时机 3.5 h 的条件,研究诱导时间分别为 12、14、16、18、20、22、24 h 时对木聚糖酶诱导表达的影响。

1.4.2.2 响应面设计 基于单因素实验结果,选取对木聚糖酶酶活力影响较大的 3 个因素,利用响应面分析软件(Design-Expert 8.0.6)进行 Box-Behnken 试验设计,建立 3 因素 3 水平的试验,以酶活力(*Y*)为响应值的 17 组响应面试验点,以确定最佳的诱导表达条件,响应面设计因素与水平见表 1。

1.4.3 木聚糖酶突变体的构建 根据生物信息学分析拟定突变策略并设计引物(表 2 所示)。提取大肠杆菌 DH5α 中含有目的片段的质粒,将其作为 PCR 反应中的模板,采用重叠延伸 PCR 技术进行突变。改造策略如图 1 所示,*xynP* N-末端的“QTITTS”替换为“FPTGNTTELEKRQTT”[该序列来源于木聚糖酶 *xynT*(NCBI 登录号:ACS26244.1)的 N-末端序列]构建成 *xynP*-1。

表 1 响应面试验因素水平表

水平	接种量 (A)/%	诱导温度 (B)/℃	诱导时间 (C)/h
-1	1.0	18	20
0	1.5	20	22
1	2.0	22	24

表 2 引物序列设计及酶切位点

Table 2 Design of primer sequences and restriction sites

引物	引物序列(5'-3')	内切酶种类
Fu	CATGCCATGGCCTTCCCGACAGGAATACTACGGAGC	<i>Nco</i> I
fu	CATGCCATGGCCTTCCCGACAGGAATACTACGGAGCTCGAAAAGCGACA GACCACCCAGACTGGAACCAACAATGGCTACT	<i>Nco</i> I
F	CATGCCATGGCCCAGACCATTACCACCAGCCAGACTG	<i>Nco</i> I
R	ATAAGAATGCGGCCGCCGAAACAGTGATGGAAGAAGAACCA	<i>Not</i> I

注:引物 F 和 R 用于克隆基因 *xynP* 全长,引物 Fu 和 fu 用于 N-末端替换,下划线为酶切位点。

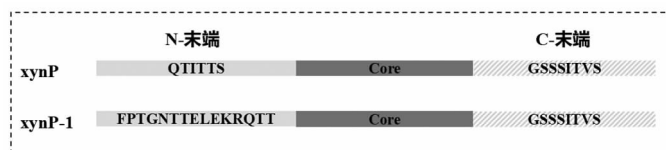


图 1 改造策略示意图

Fig.1 Transformation strategy diagram

1.4.4 木聚糖酶及突变体的纯化 以体积分数 1%的接种量将重组菌株接种于含 Kan(40 μg/mL)

的 100 mL LB 培养基中,37 ℃,160 r/min 培养至 OD 值在 0.6~0.8 范围,添加诱导剂 IPTG(500

mmol/L), 20 °C、160 r/min 培养 16 h 进行诱导表达。将上述培养的菌液进行离心, 8 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集菌体, 用 10 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 进行重悬, 超声破壁 10 min, 最后 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 收集初酶液。采用镍柱亲和纯化, 利用组氨酸标签进行亲和纯化, 采用 SDS-PAGE 电泳验证并测定蛋白分子量, 并采用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。

1.4.5 木聚糖酶酶活测定 将 0.1 mL 适当稀释的酶液与 0.9 mL 1% 榉木木聚糖底物在 55 °C 水浴条件下反应 5 min。采用 DNS 方法测定生成的还原糖含量^[13], 加入 1 mL DNS 溶液, 沸水浴 15 min, 冷却, 加入 1 mL 40% 四水合酒石酸钾钠溶液, 在波长 540 nm 处测定吸光度值。

酶活(U)定义为: 在上述试验条件下, 每分钟水解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需要的酶量为一个酶活单位。

1.4.6 木聚糖酶 xynP 及突变体酶学性质的研究

1.4.6.1 最适温度和热稳定性

1) 温度对酶活力的影响 选择 25~80 °C (间隔 5 °C) 的温度, 在 0.1 mol/L、pH 5.5 柠檬酸盐缓冲条件下进行, 采用上述 DNS 方法测定相对酶活 (以最佳温度条件下的酶活力为 100%)。

2) 酶的热稳定性 将酶分别置于 35, 40, 45, 50 °C 条件下保温 30 min (pH 4.5), 采用上述 DNS 方法测定残余酶活 (以未处理的酶活力为 100%)。

1.4.6.2 最适 pH 值和 pH 值稳定性

1) pH 值对酶活力的影响 选择 pH 3.0~8.0 (0.1 mol/L) 的缓冲液 (柠檬酸盐缓冲液 pH 3.0~5.5, 磷酸盐缓冲液 pH 5.5~7.0, Tris-HCl 缓冲液 pH 7.0~8.0), 在 40 °C 条件下进行反应, 采用上述 DNS 方法测定相对酶活 (以最佳 pH 值条件下的酶活力为 100%)。

2) 酶的 pH 值稳定性 将酶置于上述测定的不同 pH 缓冲液中进行保温, 40 °C 保温 2 h, 采用上述 DNS 方法测定残余酶活 (以未处理的酶活力为 100%)。

1.4.6.3 金属离子及化学试剂对重组木聚糖酶及突变体活性的影响 配置不同金属离子母液包括: K^+ 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、

Ca^{2+} , 化学试剂包括: 乙醇、乙腈、异丙醇、石油醚、丙醇、二甲亚砜、EDTA、DTT、SDS、尿素、CATB。按需添加至稀释后的酶液中, 分别考察了它们对重组木聚糖酶活的影响。最适条件下测定酶活 (以未添加金属离子和化学试剂的酶活为 100%)。

1.4.6.4 酶促动力学参数 测定酶促动力学参数, 将底物设置 6 个不同浓度, 在 0.1 mol/L、pH=4.5 柠檬酸盐缓冲条件下与纯酶在 45 °C 下反应 5 min^[14], 采用上述 DNS 方法进行测定, 最后运用软件 GraphPad Prism 计算出 K_m 和 k_{cat} 。

1.4.7 木聚糖酶 xynP 及突变体在苹果汁澄清中的应用 苹果从当地购买, 挑选充分成熟苹果去籽, 切块并置于纯水中隔水备用。捞出沥水榨汁后立即加入 1% 抗坏血酸护色剂搅拌均匀进行护色, 随后用 4 层纱布过滤, 滤液即为苹果原汁 (pH=4.0), 保存于 4 °C 备用^[15]。将重组酸性木聚糖酶及突变酶 (2 U/mL) 加入到 10 mL 苹果汁原汁中于 45 °C 下保温 30 min, 处理后的果汁于沸水中加热 2 min 灭活酶, 并在 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集上清。采用紫外-可见分光光度计在波长 660 nm 处测定酶解后果汁的透光率 (T), 以超纯水作对照 (计为 100%)。透光率的大小作为果汁澄清率的判断指标^[16]。采用 DNS 法测定果汁中还原糖的含量^[17]。利用手持阿贝折光仪测定果汁中可溶性固形物含量。以添加等量灭活酶的苹果汁反应液作为空白对照组。

1.4.8 数据分析与统计 所有试验均重复 3 次。使用 Excel、Origin 2022 进行数据处理与分析, 制作相关图表。

2 结果与分析

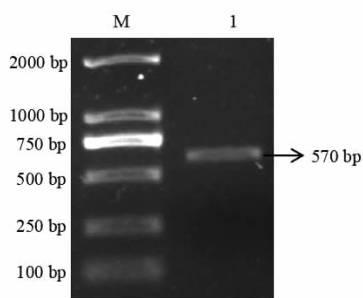
2.1 木聚糖酶基因的克隆

以木聚糖酶 *xynP* 为模板, 通过 PCR 扩增得到目的片段, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 该片段全长 570 bp。扩增目的片段长度与目的基因 *xynP* 的大小一致。

2.2 木聚糖酶的诱导表达条件优化

2.2.1 单因素实验

2.2.1.1 培养基对木聚糖酶酶活力的影响 培养基之间有营养成分和含量的差异, 合适的诱导培养基可以使酶活表达量有一定提升^[18], 因此选择 4



注: M. 2 000 bp DNA Marker; 条带 1 为目标 DNA。

图 2 *xynP* 电泳检测图

Fig.2 *xynP* electrophoretic diagram

类不同的培养基进行优化。结果如图 3a 所示, 由于 TB 培养基相比于其它 3 类培养基营养成分较为丰富、含量更高, 并且有 4% 的甘油可以作为碳源和菌体的保护剂, 磷酸盐缓冲液可以提供稳定的 pH 值环境, 取得了很好的酶活表达效果, 后续单因素筛选过程中使用 TB 培养基作为诱导培养基。

2.2.1.2 接种量对木聚糖酶酶活力的影响 接种

量决定了菌液的初始浓度, 采用合适的接种量可以得到较好的表达效果, 为了确定最适的接种量, 分别对接种量为 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 的菌液进行酶活力测定。如图 3b 所示, 当接种量为 1.5% 时, 酶活力最高。随着接种量增加, 初始菌液浓度过高, 培养基营养物质迅速消耗, 菌群很快达到衰亡期, 使得酶活力下降^[19]。

2.2.1.3 诱导时机对木聚糖酶酶活力的影响 诱导时机影响种子液接种时的菌活力, 合适的诱导时机能提升菌的表达效果, 为了确定最适的诱导时机, 以诱导时机为变量, 分别对诱导时机为 2, 2.5, 3, 3.5, 4 h 的菌液进行酶活力测定。如图 3c 所示, 当诱导时机在 3.5 h 时达到顶峰, 继续增加时长酶活力开始下降。这是由于培养时间过长, 产生的有害物质累积, 使菌的活力下降, 导致表达量减少^[20]。

2.2.1.4 IPTG 添加量对木聚糖酶酶活力的影响 IPTG 是一种作用能力很强的诱导表达剂, 可以不同程度的启动目的基因的表达, 为了探究最适的 IPTG

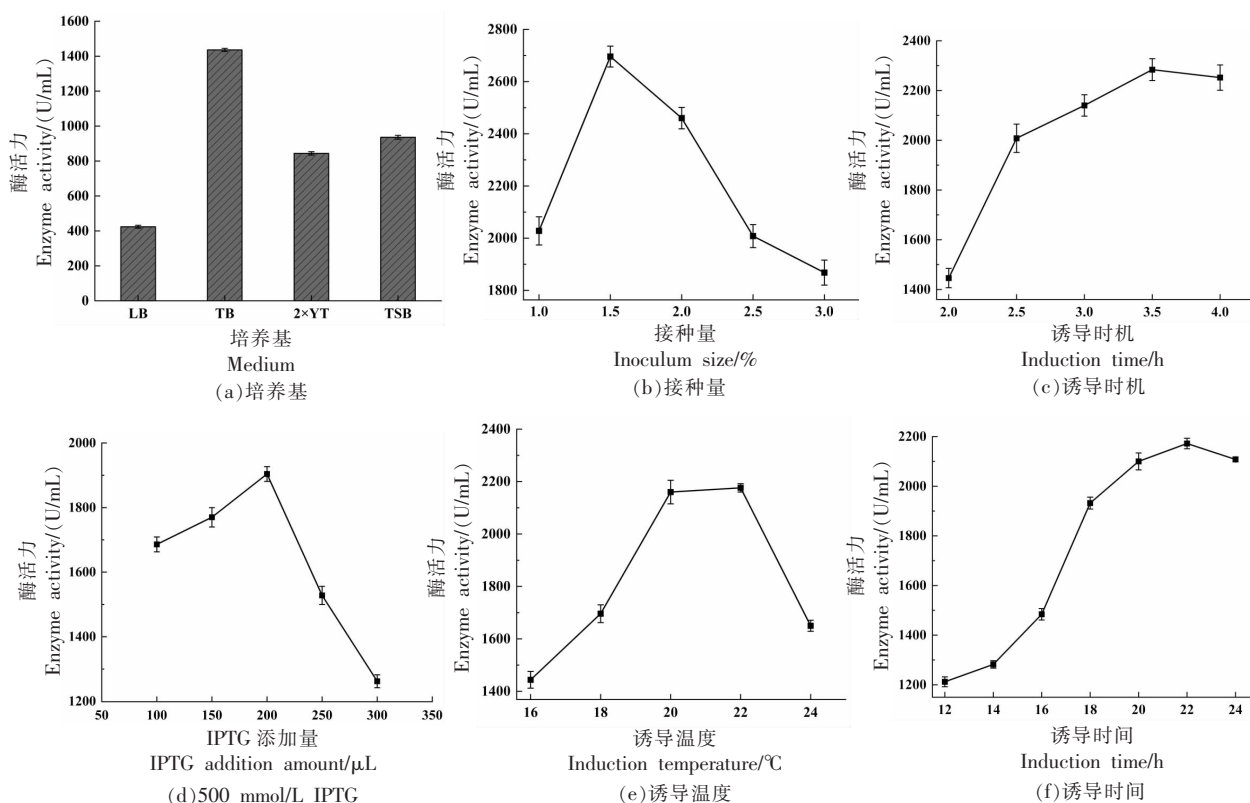


图 3 木聚糖酶表达条件的优化

Fig.3 Optimization of expression conditions for xylanase

添加量,以诱导剂浓度为变量,分别对添加 100, 150,200,250,300 μL 的菌液进行酶活力测定。如图 3d 所示,5 个水平中在每 100 mL 诱导培养基中添加 200 μL 的 IPTG 对大肠杆菌诱导的作用最佳,继续提高诱导剂添加量会导致酶活力下降。因为 IPTG 对菌体由一定的毒害作用,添加量过高反而影响其酶活表达^[21]。

2.2.1.5 诱导温度添加量对木聚糖酶活力的影响

为了探究最佳的诱导表达温度,以温度为变量,分别对经过 16,18,20,22,24 $^{\circ}\text{C}$ 环境诱导培养的菌液测定酶活力。试验结果如图 3e 所示,当温度上升时,酶活力上升,20 $^{\circ}\text{C}$ 达到顶峰,随后开始出现下降趋势。温度过低或过高都会影响酶的正确表达,导致酶活力下降^[22]。

2.2.1.6 诱导时间对木聚糖酶活力的影响 诱导时间是诱导表达的一个重要因素,为了探究最佳的诱导时间,以时间为变量分别对经过 12,14,16,18,20,22,24 h 诱导的菌液进行酶活力测定。结果如图 3f 所示,酶活力随诱导时间的延长处于上升状态,22 h 时表达效果最佳,继续增加诱导时长,酶活力开始呈现下降趋势。诱导时间过长,酶与菌液中的成分会形成包涵体,使得酶活力下降^[23]。

2.2.2 响应面试验

2.2.2.1 Box-Behnken 设计与结果 根据单因素试验结果,选取接种量(A)、诱导温度(B)和诱导时间(C) 3 个对酶活力具有显著影响的因素作为

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken test

序号	接种量 (A)/%	诱导温度 (B)/ $^{\circ}\text{C}$	诱导时间 (C)/h	酶活力(Y)/ (U/mL)
1	1.5	20	22	1 804
2	1.5	22	24	1 560
3	1.0	18	22	1 700
4	2.0	22	22	1 756
5	1.5	18	20	1 684
6	2.0	20	20	1 642
7	1.5	22	20	1 764
8	1.5	20	22	1 876
9	1.0	20	20	1 704
10	2.0	18	22	1 756
11	1.0	22	22	1 752
12	1.0	20	24	1 564
13	1.5	18	24	1 542
14	1.5	20	22	1 904
15	2.0	20	24	1 584
16	1.5	20	22	1 896
17	1.5	20	22	1 884

自变量,其它因素分别选择单因素试验的最佳条件,以酶活力(Y)作为响应值,通过响应面分析软件设计了 17 个试验方案,进行响应面分析试验,试验设计与结果如表 3 所示。

2.2.2.2 回归模型的建立及其显著性检验 根据表 3 中的 17 组试验数据,利用响应面分析软件建立回归方程模型。回归模型的显著性分析结果如表 4 所示。

表 4 回归模型的显著性分析

Table 4 Significance analysis of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.25 $\times 10^5$	9	25 012.81	16.39	0.0007	**
A	1 562.50	1	1 562.50	1.02	0.3453	
B	5 268.38	1	5 268.38	3.45	0.1055	
C	54 733.95	1	54 733.95	35.86	0.0005	
AB	676.00	1	676.00	0.44	0.5270	
AC	1 681.00	1	1 681.00	1.10	0.3288	
BC	961.00	1	961.00	0.63	0.4535	
A ²	22 376.46	1	22 376.46	14.66	0.0065	
B ²	14 607.20	1	14 607.20	9.57	0.0175	
C ²	1.31 $\times 10^5$	1	1.31 $\times 10^5$	85.84	<0.0001	
残差	10 683.80	7	1 526.26			
失拟项	4 303.00	3	1 434.33	0.90	0.5154	不显著
误差项	6 380.80	4	1 595.20			
总和	2.35 $\times 10^5$	16				

注:**表示差异极显著, $P < 0.01$; *表示差异显著, $P < 0.05$ 。

通过使用 Design Expert 8.0.6 软件,对回归模型方差分析结果进行了多元二次回归拟合,建立以接种量、诱导温度、诱导时间为自变量,木聚糖酶的酶活力为响应值的多元回归方程: $Y = 1739.75 - 31.25A - 83.55B + 269.30C - 13.00AB + 20.50AC - 15.50BC - 72.90A^2 - 58.90B^2 - 176.40C^2$ 。从表 4 可以看出,各因素的 F 值即对试验结果的影响排序为 $C>B>A$,即诱导时间>诱导温度>接种量。回归模型的 F 值为 16.39, $P=0.0007<0.01$,表明该模型回归差异为极显著,且失拟项 ($P=0.5154>0.05$) 不显著,因此该模型具有良好的拟

合度和可靠度。该模型的决定系数 $R^2=0.9547$,说明各因素对酶活力有显著的线性关系,实测酶活力与该模型预测值之间的拟合度较好,因此该模型可用于分析和预测重组木聚糖酶 xynP 酶活力的最佳表达条件。

2.2.2.3 各因素响应面交互作用分析 根据二次响应面回归方程,在 Design Expert 8.0.6 中绘制出响应面交互作用图,用于分析影响木聚糖酶酶活力的各两因素之间的交互作用。拟合的等高线和响应曲面,如图 4 所示。

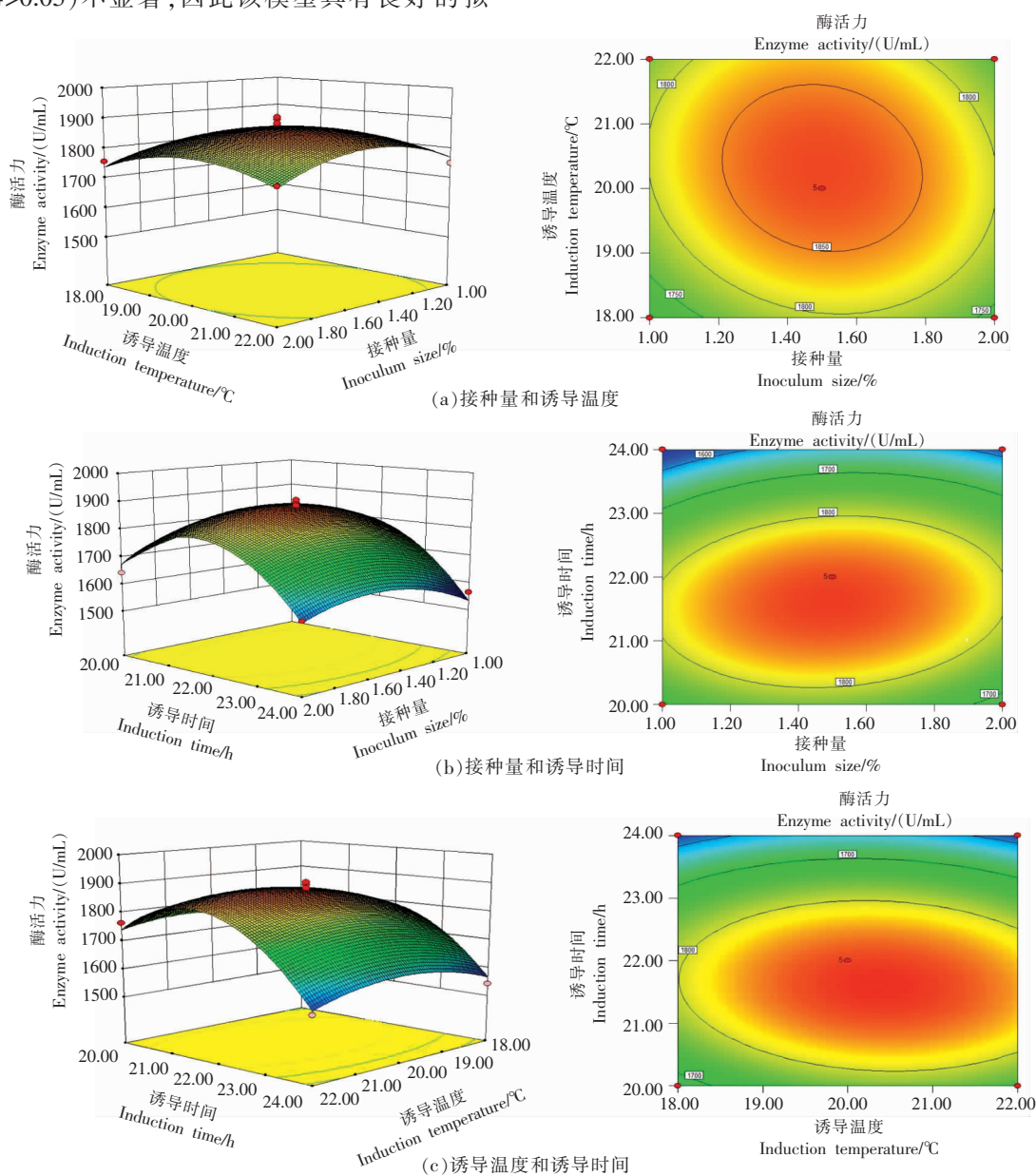


图 4 接种量、诱导温度和诱导时间的交互作用图

Fig.4 Interaction plot of inoculum size, induction temperature and induction time

2.2.2.4 最佳表达条件的确定及验证 从上述回归模型中得到最优的表达条件为:接种量 1.49%、诱导温度 20.38 °C、诱导时间 21.59 h,在此条件下预测酶活力值(Y)为 1 881.43 U/mL。根据实际情况,调整预测条件进行验证试验,在 100 mL 的 TB 培养基中接入 1.5%种子液,在 37 °C 条件下培养 3.5 h,添加 200 μ L 500 mmol/L IPTG,20 °C 150 r/min 诱导 21.6 h 后,所得到的平均酶活力为 1 884 U/mL,与预测值相符合。

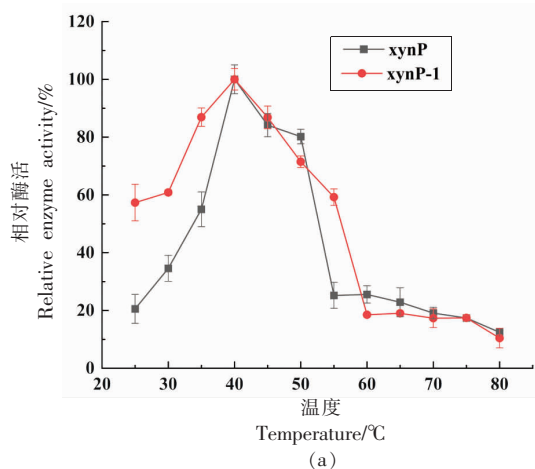
2.3 木聚糖酶突变体的构建

纯化的重组木聚糖酶 xynP 及其突变体 xynP-1 如图 5 所示。xynP 及其突变酶 xynP-1 的分子质量分别为 20.61 ku 和 21.68 ku,其分子质量提高,说明重组木聚糖酶 xynP 改造成功。

2.4 木聚糖酶 xynP 及其突变体酶学性质的研究

2.4.1 木聚糖酶 xynP 的最适温度和温度稳定性

在 25~80 °C 范围(间隔 5 °C 取样)、pH=5.5 的条件下测定木聚糖酶 xynP 及突变酶的最适反应温度,结果如图 6a 所示,木聚糖酶 xynP 与突变酶的最适温度均为 45 °C,在温度 55 °C 时,木聚糖酶 xynP 酶活出现急剧下降,其相对酶活仅残余 20% 左右,这可能是由于在生物催化过程,温度较高,使得酶蛋白变形,致使酶失活^[24]。将适当稀释后的木聚糖酶 xynP 在无底物的情况下,置于 35~50 °C

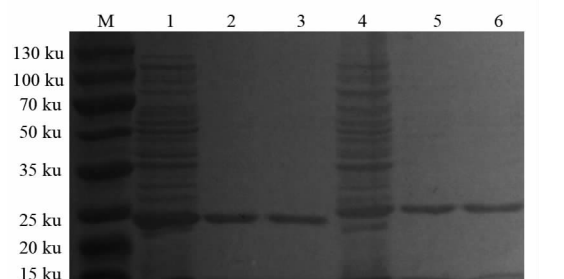


注:a 图中最高酶活力定义为 100%;b 图中没有进行保温处理的样品酶活定义为 100%。

图 6 xynP 及其突变体的最适反应温度(a)和热稳定性(b)

Fig.6 Effects of optimal reaction temperature (a) and thermal stability (b) of xynP and its mutant

2.4.2 木聚糖酶 xynP 的最适 pH 值和 pH 值稳定性 在最适温度 40 °C 条件下,分别选择 pH 3.0~8.0 的缓冲液进行酶活力的测定,考察木聚糖酶

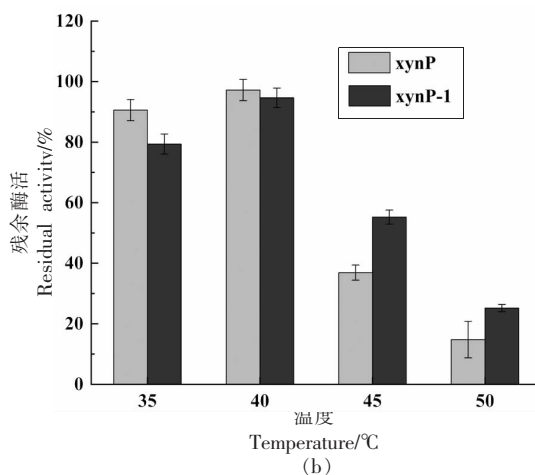


注:M. 蛋白质 Marker;1. xynP 粗酶液;2 和 3. xynP 纯酶液;4. xynP-1 粗酶液;5 和 6. xynP-1 纯酶液。

图 5 木聚糖酶 xynP 及其突变体的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.5 SDS-PAGE gel electrophoresis of xylanase xynP and its mutants

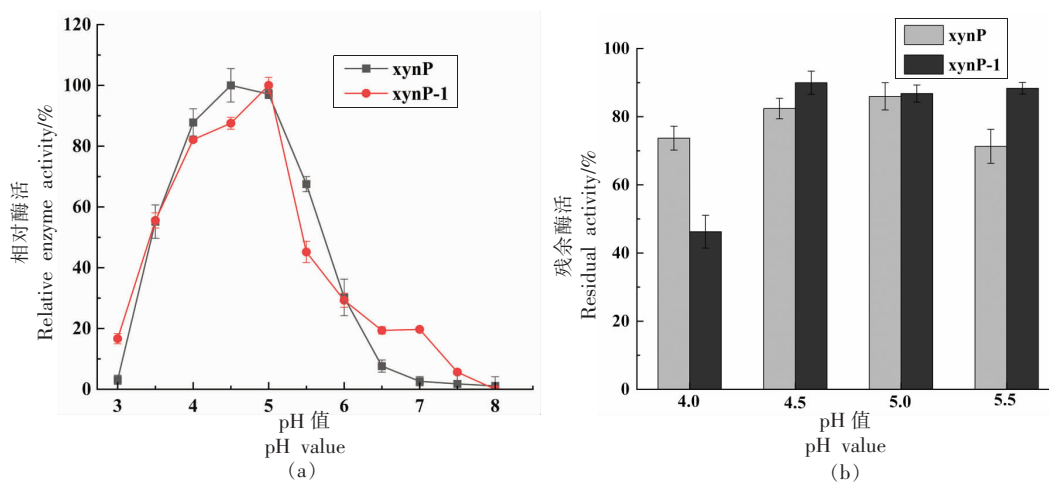
热处理 30 min 后,于各酶的最适条件下测定温度对重组木聚糖酶稳定性的影响,结果如图 6b 所示,木聚糖酶 xynP 和突变酶在 35 °C 和 40 °C 下热稳定性较好,均达到 70% 以上,当温度再升高时,2 个酶的残余酶活均显著下降,而在 45 °C 和 50 °C 时,突变酶 xynP-1 的热稳定性均优于原酶,这可能是由于 N-末端关联木聚糖酶的热稳定性^[25],导致突变酶的耐热性提高,这也与 Yin 等^[26]的研究结果一致。



xynP 及其突变酶的最适反应 pH 值。结果如图 7a 所示,从该结果可以看出木聚糖酶 xynP 的最适 pH 值为 4.5,pH 4~5 范围,木聚糖酶活性均在

80%以上,pH 值超过 6.0 后,酶活性下降很快,说明该酶属于典型的酸性木聚糖酶。经 N-末端替换后的木聚糖酶 xynP-1 最适 pH 值升高为 5.0。在最适温度条件下,测定不同 pH 值(4.0~5.5)对木聚糖酶 xynP 及突变酶稳定性的影响,结果如图 7b 所示,野生型木聚糖酶 xynP 和突变酶 xynP-1 在 pH 4.5~5.0 范围有良好的耐酸性,残余酶活达到 85%以上。较初始酶活相比,原酶的残余酶活在 pH 5.0 的时候最高为 85.95%;突变重组酶的残余酶活在 pH 4.5 的时候最高为 89.95%。在 pH 值为 4.0 的时候,木聚糖酶 xynP 的残余酶活为 73.7%,

而替换 N-末端后的突变酶 xynP-1 残余酶活只有 46.24%,说明在较酸的环境下,突变酶的酸稳定性不如野生型木聚糖酶。然而,在 pH=5.5 时,突变酶的残余酶活远高于原酶,野生型木聚糖酶残余酶活出现下降趋势为 71.2%,而突变酶 xynP-1 的残余酶活为 88.8%只略低于在 pH=4.5 的时候。简而言之,经过 N-末端替换后,突变酶 xynP-1 在较酸的环境下(pH=4.0)稳定性略弱于原酶 xynP,而随着 pH 值的增加(pH 4.5~5.5)其酸稳定性均高于原酶 xynP,说明 N-末端对木聚糖酶的酸稳定性具有一定影响。



注:a 图中最高酶活力定义为 100%;b 图中没有进行保温处理的样品酶活定义为 100%。

图 7 xynP 及其突变体最适反应 pH 值(a)和 pH 值稳定性(b)

Fig.7 The optimal reaction pH value (a) and pH stability (b) of xynP and its mutants

2.4.3 金属离子和化学试剂对木聚糖酶 xynP 的影响 大部分金属离子作为辅助因子影响酶的催化作用,从而促进或者抑制酶的反应速率。在适量酶液中分别加入一定体积的金属离子溶液,于 40 °C 反应 5 min 后测定其酶活力。以不加金属离子时测得的酶活力为对照组,结果如图 8a 所示。从该结果表明,Pb²⁺能明显抑制两个酶的酶活性。所有金属离子对野生型木聚糖酶 xynP 均有一定的抑制作用,而进行 N-末端置换后,金属离子对突变酶 xynP-1 的抑制效果减弱,说明经过改造后的木聚糖酶对金属离子的耐受性增强。在适量酶液中分别加入一定体积的化学试剂,化学试剂浓度为 5 mmol/L,加入的 EDTA 浓度分别为 5 mmol/L 和 10 mmol/L。以不加化学试剂时测得的酶活力为对照组,结果如图 8b,可以看出不管是高浓度还是

低浓度的 EDTA 对 2 种酶均存在较强的抑制作用,其中对野生型木聚糖酶 xynP 的抑制效果更显著。除了在尿素、DTT、CATB、EDTA 这 4 种化学试剂的作用下,突变酶 xynP-1 的相对酶活高于野生型木聚糖酶 xynP 外,在其它化学试剂的作用下其酶活均不及野生型木聚糖酶 xynP,说明 N-末端替换使木聚糖酶的化学试剂耐受性下降。

2.4.4 木聚糖酶 xynP 的动力学参数 以榉木木聚糖为底物的木聚糖酶 xynP 的动力学参数如表 5 所示,野生型木聚糖酶 xynP 和突变酶木聚糖酶 xynP-1 的 K_m 分别为 1.72 mg/mL 和 2.57 mg/mL,说明突变酶与底物的亲和力较野生型有所降低,由此推测可能是因为 N-末端替换后使得酶的对象发生改变,这种变化可能不利于底物与酶的结合,从而影响酶对底物的亲和力^[27]。就催化效率而

言,木聚糖酶 xynP 的 k_{cat}/K_m 值为 $2.34 \text{ mL}/(\text{s}\cdot\text{mg})$, 而突变酶的 k_{cat}/K_m 值为 $1.77 \text{ mL}/(\text{s}\cdot\text{mg})$, 经改造

后催化效率降低,这可能是由于产物释放速率减慢所致。

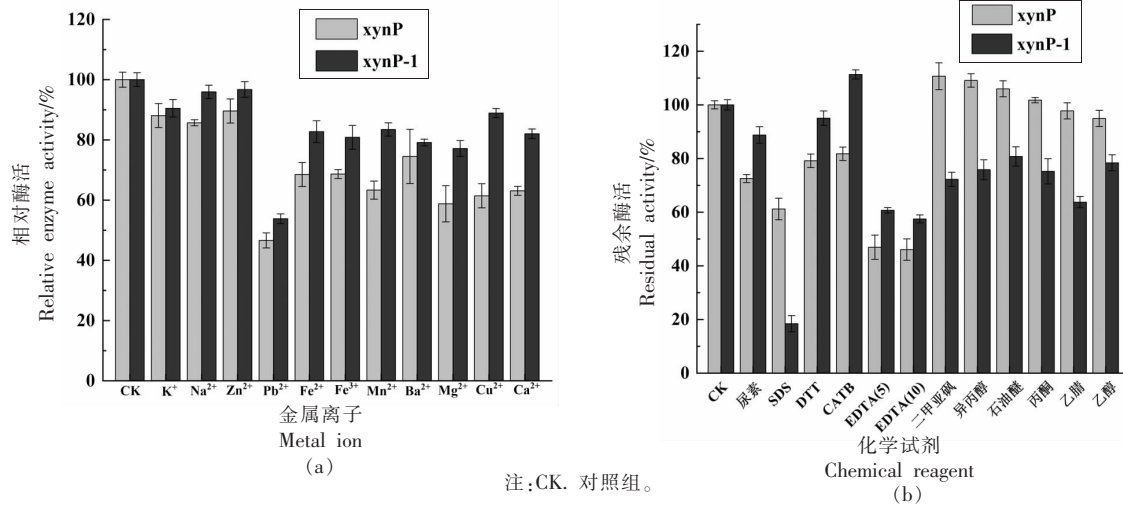


图8 金属离子(a)及化学试剂(b)对 xynP 及其突变酶的影响

Fig.8 Effects of metal ions (a) and chemical reagents (b) on xynP and its mutant

表5 木聚糖酶 xynP 及其突变体的动力学参数

Table 5 Kinetic parameters of xylanase xynP and its mutants

木聚糖酶	$v_{max}/[\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})]$	$K_m/(\text{mg}/\text{mL})$	k_{cat}/s^{-1}	$k_{cat}/K_m/[\text{mL}/(\text{s}\cdot\text{mg})]$
xynP	0.93 ± 0.1	1.72 ± 0.2	4.02 ± 0.6	2.34 ± 0.2
xynP-1	1.15 ± 0.5	2.57 ± 0.4	4.56 ± 0.1	1.77 ± 0.1

2.5 重组酸性木聚糖酶对苹果汁澄清中的应用

采用酶制剂处理果汁提升果汁澄清度已被行业所认可并广泛应用。木聚糖为半纤维素主要成分之一,广泛存在于植物中^[28]。目前,许多报道了各种木聚糖酶对果汁提取和澄清过程的影响^[29-31]。由于大多数果汁天然 pH 值为酸性,所以该重组酶在果蔬汁加工行业中存在一定的应用潜力^[27]。本试验采用重组木聚糖酶处理苹果汁($\text{pH}=4.0$),结果如表 6 所示,加酶处理后的果汁透光率提高,加入木聚糖酶 xynP 后透光率从 24.33% 提高到 90.03%, 加入木聚糖酶 xynP-1 后透光率从 24.33% 提高到 95.70%, 说明木聚糖酶对苹果汁具有显著的澄清效果。还原糖含量变化不大,可溶



注:MH. 加入等量灭活酶处理果汁;P. 加入木聚糖酶 xynP 处理果汁;P-1. 加入木聚糖酶 xynP-1 处理果汁。

图9 添加木聚糖酶处理果汁效果图

Fig.9 Effects picture of fruit juice treatment with xylanase

表6 重组木聚糖酶及突变体在苹果汁澄清中的影响

Table 6 Effects of recombinant xylanase and mutant on clarification of apple Juice

	澄清度/%	还原糖/(mg/mL)	可溶性固形物/°Bx
对照组	34.33 ± 0.85	0.23 ± 0.09	7.54 ± 0.18
xynP 酶处理组	90.03 ± 0.60	0.22 ± 0.09	8.26 ± 0.19
xynP-1 酶处理组	95.70 ± 0.88	0.29 ± 0.12	8.38 ± 0.16

性固形物有所增加,这可能是由于酶解后苹果细胞壁受到破坏,结构疏松多,呈分散状态造成总可溶性固形物含量增高^[32]。

3 结论与讨论

本论文以 pET-28a(+)为表达载体,成功将木聚糖酶 xynP 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行异源表达。得到最佳表达条件为:在 100 mL 的 TB 培养基中接入质量分数 1.5%种子液,诱导时机为 3.5 h,添加诱导剂 500 mmol/L IPTG 为 200 μ L,在 20 $^{\circ}$ C 诱导 21.6 h 时,得到最佳的酶活力为 1 884 U/mL;通过 N-末端替换成功构建突变酶 xynP-1。比较酶学性质发现,xynP 和 xynP-1 的最适温度均为 40 $^{\circ}$ C、最适 pH 值分别为 4.5 和 5.0;经不同 pH 值处理后,发现突变酶 xynP-1 在酸性条件下(pH=4.0)稳定性略弱于野生型木聚糖酶 xynP,而随着 pH 值的增加(pH 4.5~5.5)其酸稳定性均高原酶 xynP,说明 N-末端对木聚糖酶的酸稳定性有影响。所有金属离子对野生型木聚糖酶 xynP 均有一定的抑制作用,而经过 N-末端置换后,金属离子对 xynP-1 的抑制效果小于 xynP,说明经 N-末端替换后的木聚糖酶对金属离子的耐受性增强。以榉木木聚糖为底物时测得原酶 xynP 和突变酶 xynP-1 的 K_m 值分别为分别为 1.72 mg/mL 和 2.57 mg/mL; v_{max} 值分别为 0.93 nmol/(mg \cdot min) 和 1.15 nmol/(mg \cdot min),突变酶的底物亲和力和催化效率均不及原酶。最后将 2 种酶应用于苹果汁中,加原酶 xynP 和突变酶 xynP-1 后,果汁透光率分别由 24.33%提高到 90.03%和 95.70%,说明添加木聚糖酶 xynP 对苹果汁具有显著澄清效果,且加酶处理后的还原糖含量变化不大,可溶性固形物含量略有增加。本研究优化了重组木聚糖酶 xynP 的最佳诱导表达条件,为大量生产酸性木聚糖酶奠定理论基础,通过 N-末端替换构建突变酶发现 N-末端对木聚糖酶酸稳定性有一定的影响,不仅为木聚糖酶的分子改造提供了思路,还为木聚糖酶耐酸机制的阐明提供理论依据,此外,木聚糖酶在苹果汁中具有显著澄清效果也为后续探究木聚糖酶在果汁加工中的应用提供支持。

参 考 文 献

- [1] BEG Q, KAPOOR M, MAHAJAN L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56: 326-338.
 - [2] WALIA A, GULERIA S, MEHTA P, et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: A review[J]. 3 Biotech, 2017, 7: 11.
 - [3] POLIZELI M, RIZZATTI A, MONTI R. Xylanases from fungi properties and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67: 577-591.
 - [4] SAVITHA S, SADHASIVAM S, SWAMINATHAN K. Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper pulp[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2007, 78: 217-221.
 - [5] ZHAO J, LI X Z, QU Y B. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(13): 1470-1476.
 - [6] AMIN F, BHATTI H N, BILAL M, et al. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exopolysaccharonase enzyme and its application in fruit juice clarification[J]. Food Engineering, 2017, 13(2): 1-14.
 - [7] LEE W C, YUSOF S, HAMID N S A, et al. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology[J]. Food Engineering, 2006, 73(1): 55-63.
 - [8] ROSMINE E, SAINJAN N C, SILVESTER R, et al. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice[J]. Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(2): 393-401.
 - [9] NARNOLIYA L K, JADAUN J S, CHOWNK M, et al. Enzymatic systems for the development of juice clarification strategies[M]// Biomass, Biofuels, Biochemicals, Amsterdam: Elsevier, 2020: 397-412.
 - [10] 秦星, 张华方, 张伟, 等. 酶制剂在果汁生产中的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 39-45.
- QIN X, ZHANG H F, ZHANG W, et al. Advance of the enzyme application in fruit juice processing[J].

- Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(5): 39–45.
- [11] MOHAMMADI M, MOKARRAM R R, SHAHVALIZADEH R, et al. Immobilization and stabilization of pectinase on an activated montmorillonite support and its application in pineapple juice clarification[J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100625.
- [12] GRASSIN C, FAUQUEMBERGUE P. Application of pectinases in beverages[J]. Progress in Biotechnology, 1996, 14: 453–462.
- [13] YU J, LIU X Q, GUAN L Y, 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.
- [14] LI X T, SHE Y L, SUN B G, et al. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces raneus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 52(1): 71–78.
- [15] LI C Y, ASHOK K, XUAN L, et al. Highly alkali-stable 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.
- [16] ADIGUZEL G, FAIZ O, SISECIOGLU M, et al. A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 571–578.
- [17] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [18] 吴蓉, 曹佳睿, 曹君, 等. 南极假丝酵母脂肪酶B基因在大肠杆菌中的表达和发酵优化[J]. 生物技术通报, 2021, 37(2): 138–148.
- WU R, CAO J R, CAO J, et al. Expression and fermentation optimization of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(2): 138–148.
- [19] 任玉文, 任媛媛, 刘雅祯, 等. 抗植物软腐病枯草芽孢杆菌的高密度发酵优化[J]. 河北科技大学学报, 2020, 41(5): 433–441.
- REN Y W, REN Y Y, LIU Y Z, et al. Optimization of high-density fermentation for *Bacillus subtilis* resistant to plant soft rot[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2020, 41(5): 433–441.
- [20] 夏瑛, 李良, 董孝元, 等. 源于解淀粉芽胞杆菌酚酸脱羧酶的克隆与表达[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2060–2071.
- XIA Y, LI L, DONG X Y, et al. Cloning and expression of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2060–2071.
- [21] 王涛, 冯君瑞, 李姝璇, 等. 葡萄糖胺-6-磷酸合成酶的异源表达及其酶学性质表征[J]. 高校化学工程学报, 2021, 35(3): 500–506.
- WANG T, FENG J R, LI Z X, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of glucosamine-6-phosphate synthase[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2021, 35(3): 500–506.
- [22] KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E.coli*: Roadblocks and reinforcements[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 803–822.
- [23] 佟超男, 李苏红, 孙晓, 等. 乳二糖磷酸化酶的表达优化[J]. 食品工业, 2018, 39(11): 172–175.
- TONG C N, LI S H, SUN X, et al. Optimization of expression of lactobiose phosphorylase[J]. The Food Industry, 2018, 39(11): 172–175.
- [24] CHEN Y H, LI L L, LONG L K, et al. High cell-density cultivation of phenolic acid decarboxylase-expressing *Escherichia coli* and 4-vinylguaiacol bioproduction from ferulic acid by whole-cell catalysis[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2018, 93(8): 2415–2421.
- [25] WANG J Q, TAN Z B, WU M C, et al. Improving the thermostability of a mesophilic family 10 xylanase, AuXyn10A, from *Aspergillus usamii* by *in silico* design [J]. Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(8): 1217–1225.
- [26] YIN X, LI J F, WANG J Q, et al. Enhanced thermostability of a mesophilic xylanase by N-terminal replacement designed by molecular dynamics simulation[J]. Science of Food and Agriculture, 2013, 93(12): 3016–3023.
- [27] KARBALAEI M, REZAEI S A, FARSIANI H.

- Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235 (9): 5867–5881.
- [28] PUCHART V, SUCHOVA K, BIELY P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 –An overview [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107704.
- [29] PAL A, KHANUM F. Efficacy of xylanase purified from *Aspergillus Niger* DFR-5 alone and in combination with pectinase and cellulase to improve yield and clarity of pineapple juice[J]. *Food Science and Technology*, 2011, 48(5): 560–568.
- [30] ULLAH S, IRFAN M, SAJJAD W, et al. Production of an alkali –stable xylanase from *Bacillus pumilus* K22 and its application in tomato juice clarification[J]. *Food Biotechnol*, 2019, 33(4): 353–372.
- [31] OLFA E, MONDHER M, ISSAM S, et al. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2007, 31(1): 96–107.
- [32] YI J J, KEBEDE B T, DANG D N H, et al. Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2017, 75: 85–92.

Effects of Recombinant Xylanase xynP N-terminal on Acid Stability and Application in Clarification of Apple Juice

Qin Chi, Liu Shuliang, Li Jianlong, Hu Kaidi, Zhao Ning, Li Qin*

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, Sichuan)

Abstract In order to explore the effects of N-terminal on acid stability of xylanase, this paper cloned and expressed a gene sequence screened from NCBI database, designed response surface test to obtain the best expression conditions, and constructed N-terminal displacement mutants from N-terminal by overlapping extension SORPCR technology, characterized its enzyme activity and related enzymatic properties, and finally applied it to apple juice to explore the clarification effect. The results showed that the optimal xylanase xynP expression condition was 1 884 U/mL by adding 1.5% seed solution into 100 mL TB medium, the induction time was 3.5 h, 200 μ L of 500 mmol/L isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) was added, and the enzyme activity was induced at 20 $^{\circ}$ C for 21.6 h. The optimum temperature of xylanase xynP and mutant xynP-1 was 40 $^{\circ}$ C, and the optimum pH value was 4.5 and 5.0, respectively. After different pH value treatments, it was found that the stability of mutant enzyme xynP-1 was slightly weaker than that of wild type xylanase xynP under acid conditions (pH=4.0), but with the increase of pH (pH 4.5~5.5), its acid stability was all plateau enzyme xynP, indicating that N-terminal had an impact on the acid stability of xylanase. Metal ions Pb^{2+} and chemical reagents sodium dodecyl sulfate (SDS) and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) have a significant inhibitory effect on the activity of the two enzymes. When beechwood xylan was used as substrate, the K_m values of the two enzymes were 1.72 mg/mL and 2.57 mg/mL, respectively. The v_{max} values were 0.93 nmol/(mg \cdot min) and 1.15 nmol/(mg \cdot min), respectively, indicating that the substrate affinity and catalytic efficiency of the mutant enzyme were lower than those of the original enzyme. Two enzymes were applied to apple juice. After the addition of the original enzyme xynP and the mutant enzyme xynP-1, the light transmittance of the juice increased from 24.33% to 90.03% and 95.70%, respectively, indicating that the addition of xylanase xynP had a significant clarifying effect on apple juice. The results provided a reference for further research on the application of xylanase in fruit juice processing.

Keywords xylanase; N-terminal replacement; enzymatic properties; juice clarification