

嗜碱菌(*Bacillus* sp.) ZBAW6 的木聚糖酶的分离纯化及其性质

曾 艳 刘铁汉 周培瑾 马延和*

(中国科学院微生物研究所极端环境微生物实验室 北京 100080)

摘 要 通过硫酸铵分级沉淀,阴离子交换层析,凝胶过滤 3 步从嗜碱菌 *Bacillus* sp. ZBAW6 纯化了木聚糖酶。结果表明该酶分子量为 45kD。N 末端序列为 DPFAAAVAPL。在 pH5.5~10.5 范围内均具有较高酶活性和稳定性,最适反应温度为 65℃,酶活力基本不变。该酶作用于 Beech-xylan 的 K_m 为 0.11mg/mL, V_{max} 为 23.89 μ mol/(min·mg), Hg^{2+} 对该酶有强的抑制作用。

关键词 嗜碱菌 ZBAW6, 木聚糖酶, 纯化, 性质

中图分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)01-0075-04

β -1,4-木聚糖酶(E.C.3.2.1.8)是降解木聚糖的主要酶,降解木聚糖为木聚寡糖或木糖。已经在细菌^[1]、真菌^[2]、放线菌^[3]、酵母菌^[4]中都发现了木聚糖酶。木聚糖酶有很多实际应用和潜在价值,包括增加植物青饲料产率^[5]、果汁及酒类澄清^[6]、用于麻等植物纤维脱胶^[7]、用做禽畜饲料添加剂^[8]等。木聚糖酶最重要的用途是应用于造纸工业中代替氯化物进行生物制浆和生物漂白^[9],可以降低大量有害有机氯化物如氯化二恶英、呋喃的排放,减少环境污染。工业应用的木聚糖酶期望在高温(60℃)、高 pH(>8.0)条件下具有酶活性。但是已经得到的木聚糖酶最适反应 pH 在碱性同时反应温度高于 60℃的极少。即使是从嗜碱微生物中纯化的木聚糖酶,最适 pH 也多接近中性,不符合工业应用的要求。在碱性(>pH8.0)高温($\geq 60^\circ\text{C}$)条件下有最适酶活性的木聚糖酶目前有 Beg 等^[2]从 *Streptomyces* sp. QG-11-3 分离到的木聚糖酶,最适 pH 为 7.0~8.4,最适温度为 70℃;Gessesse 等^[1]从 *Bacillus* sp. AR-009 分离到的木聚糖酶,最适 pH 为 9.0~10.0,最适温度为 60~75℃;Gupta 等^[10]从 *Staphylococcus* sp. SG-13 分离到的木聚糖酶,最适为 pH9.5~10.0,最适温度为 50℃等。我们从西藏扎布耶茶卡盐碱湖中分离到一株产木聚糖酶的嗜碱菌(*Bacillus* sp.) ZBAW6。该菌株分离到的木聚糖酶在高温、高盐、碱性条件下具有较高的酶活性,是研究蛋白质的耐盐碱机理的极有价值的材料。本文描述此酶的纯化过程及酶的性质。

质。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

菌种 嗜碱菌(*Bacillus* sp.) ZBAW6 分离自中国西藏扎布耶茶卡盐碱湖(Na^+ 含量 4.70mol/kg, $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 含量为 3.34mol/kg, pH 为 9.46)。

培养基:每升含 polypeptone 5g, yeast extract 5g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, Na_2CO_3 10g, xylan 10g (Sigma Chemical Co. From Beechwood), pH10.0。

1.2 木聚糖酶活力测定

DNS 法测定酶活^[11]。酶活力单位定义为:每分钟释放 1 μ mol 木糖所需的酶量。

1.3 酶的分离纯化

1.3.1 粗酶液制备:将 400mL 发酵液 10000g 离心 15min,除去菌体即得粗酶液。

1.3.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀:向粗酶液中加入硫酸铵至 40% 饱和度,离心去除沉淀,在上清中继续加入硫酸铵至 80% 饱和度。离心收集沉淀。

1.3.3 Cellulose DE-52 离子交换层析:将沉淀物用 pH7.6 的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,透析脱盐,脱盐后用 PEG-8000 浓缩。然后将酶液加到 Cellulose DE-52 柱(2.5cm \times 25cm)上,用 0~1.0mol/L NaCl (50mmol/L Tris-HCl pH7.6)进行线形梯度洗脱。测定各收集管洗脱液的酶活力。

1.3.4 Bio-Gel p-100 凝胶过滤:将上一步酶活峰收

基金项目 国家 863 计划(2001AA214101)

* 通讯作者。Tel 86-10-62627951; E-mail: mayanghe@sun.im.ac.cn

作者简介 曾 艳(1977-),女,硕士研究生,主要从事微生物学和分子生物学研究。

收稿日期 2003-05-14,修回日期 2003-08-26

集并用 PEG-2000 浓缩 ,然后将样品加到 50mmol/L Tris-HCl(pH7.6)预平衡的 Bio-Gel p-100 分子筛 ,用相同的缓冲液洗脱。测定各收集管酶活力及蛋白含量。

1.4 蛋白含量测定

参照 Lowry 等^[12]的方法进行 ,以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.5 电泳分析

Native-PAGE 及 SDS-PAGE 参照 Laemmli 等^[13]的方法。

1.6 酶 K_m 及 V_{max} 的测定

按照 Lineveaver-Burk 的双倒数作图法求 K_m 及 V_{max} 。

1.7 N-末端序列测定 :由北京大学生命科学中心协助测定。

2 结果和分析

2.1 菌种

ZBAW6 为革兰氏阳性芽孢杆菌 ,最适生长 pH10.0 ~ 11.0 ,为一株嗜碱菌。经过 GenBank 数据库对比 ,该菌 16srRNA 序列与 *Bacillus agaradhaerens* DSM 8721 同源性为 98%。

2.2 酶的分离纯化

400mL 粗提酶液经硫酸铵分级沉淀后 ,用 Cellulose DE-52 离子交换层析 ,Bio-Gel P-100 凝胶过滤 ,测定各管的蛋白含量和酶活力 ,SDS-PAGE 检测 ,最终样品已达电泳纯。纯化过程中的酶活及蛋白变化见表 1。经 SDS-PAGE 测定 ,木聚糖酶分子量大于 45kD(图 1)。

表 1 *Bacillus* sp. ZBAW6 木聚糖酶的分离纯化

Table 1 A summary of the purification of xylanase from *Bacillus* sp. ZBAW6

	Total Protein/ μ g	Total Activity/U	Specific activity(U/mg)	Recovery/%	Purification fold
Culture supernatant	32739	243.25	7.51	1.00	1.0
Ammonium sulfate treatment	7504	206.34	27.51	84.83	3.66
Cellulose DE-52	877	73.21	83.51	30.1	11.12
Bio-Gel P-100 gel filtration	510.2	54.08	106.0	22.23	14.11

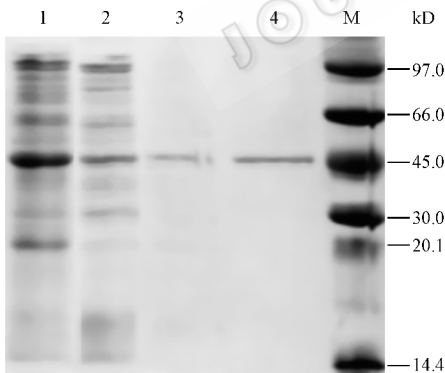


图 1 纯化过程中 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of samples from different steps of purification.

1. Culture supernatant 2. Ammonium sulfate ;

3. Cellulose-DE52 ; 4. Bio-Gel p100 ; M. Marker.

2.3 酶的性质

2.3.1 pH 对酶活性的影响 :在标准反应条件下 ,于 50mmol/L 不同缓冲液的条件测定酶活性 ,所用缓冲液为 pH4.0 ~ 8.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸 , pH8.0 ~ 9.5 Tris-HCl , pH9.5 ~ 11.0 Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH11.5 ~ 12.0 Na_2HPO_4 -NaOH。结果表明该酶在 pH5.5 ~ 10.0

范围内均具有较高酶活 ,而小于 pH5.5 及大于 pH10.0 时酶活迅速下降。

2.3.2 pH 稳定性 :将酶液与 pH4.0 ~ 12.0 的缓冲液混合 ,室温放置 4h ,测定酶活性 ,结果表明酶在 pH5.5 ~ 10.0 的范围内比较稳定。

2.3.3 温度对酶活性的影响 :标准反应条件下 ,在不同温度下测定酶活性 ,结果表明该酶在 50℃ ~ 75℃ 具有较高的活性 ,最适反应温度为 65℃。

2.3.4 酶的热稳定性 :将酶液分别在 60℃、65℃、70℃ 保温 30、60、90、120min ,测定酶活性。结果表明该酶在 60℃、65℃ 保温 120min 活性基本没有丧失 ,70℃ 酶失活较快 ,30min 后仅剩 40% 酶活 ,90min 后基本上没有酶活。

2.3.5 金属离子和其他化合物对酶活性的影响 :酶反应液中加入不同的金属离子 ,使其终浓度为 2mmol/L ,测定酶活性 ,以未加入金属离子的酶活性为 100% ,计算加入不同金属离子后的残余酶活性。结果表明大部分金属离子和 EDTA、SDS 对酶活性的影响不显著 , Mn^{2+} 略有抑制作用 ,而 Hg^{2+} 对酶活性有强烈的抑制作用(表 2)。

2.3.6 不同底物对酶活性的影响 :分别以淀粉 ,纤维素 ,木聚糖 ,CMC 为底物进行反应 ,结果表明该酶仅对木聚糖有降解作用。

2.3.7 NaCl 浓度对酶活性的影响 :在标准反应条件下 ,在不同 NaCl 浓度下测定酶活性 ,结果表明 NaCl 浓度小于 20% 时对酶活性有一定促进作用 ,当 NaCl 浓度大于 20% 后随着盐浓度增高酶活性逐渐下降。

2.3.8 酶 K_m 及 V_{max} 的测定 :按照 Lineveaver-Burk 作图法 ,以木聚糖为底物 ,测得该木聚糖酶的 $K_m = 0.11\text{mg/mL}$, $V_{max} = 23.89\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ (图 2)。

表 2 二价金属离子对酶活性影响

Table 2 Effect of different metal ions on *Bacillus* sp. ZBAW6 xylanase activity

Metalion	Relative activity/ %
FeSO ₄ (2mmol)	104.95
MnSO ₄ (2mmol)	71.42
MgSO ₄ (2mmol)	106.80
CaCl ₂ (2mmol)	103.53
ZnCl ₂ (2mmol)	87.95
CuSO ₄ (2mmol)	110.12
AgNO ₃ (2mmol)	98.14
HgCl ₂ (2mmol)	0.39
CoCl ₂ (2mmol)	88.48
SDS(5mmol)	80.21
EDTA(5mmol)	99.66

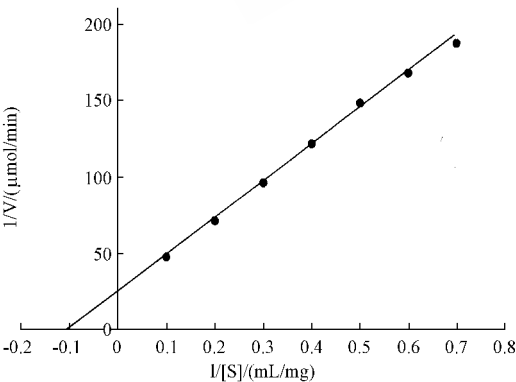


图 2 酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.2 The pattern of the Lineweaver-Burk of the *Bacillus* sp. ZBAW6 xylanase

2.3.9 N 末端序列测定 :纯化后木聚糖的 N-末端氨基酸序列为 Asp-Pro-Phe-Ala-Ala-Ala-Val-Ala-Pro-Leu。序列比较说明该酶与 F10 木聚糖酶序列较为相似(图 3)。

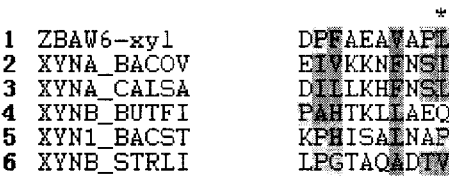


图 3 几种木聚糖酶的 N 末端序列比较

Fig.3 The homology of N-terminal sequence of xylanase in some strains

1. *Bacillus* sp. ZBAW6 ; 2. *Bacteroides ovatus* ;
3. *Caldocellum saccharolyticum* ; 4. *Butyrivibrio fibrilvolens* ;
5. *Bacillus stearothermophilus* ; 6. *Streptomyces lividans* .

3 讨论

近年来关于木聚糖酶的研究很多 ,但是现有的酶性质都不能完全满足造纸等工业实际应用的要求^[14~17]。我们从 *Bacillus* sp. ZBAW6 中分离到的木聚糖酶在反应温度和 pH 条件上都很好的满足了工业应用的条件。已有的木聚糖酶报道中与本文描述的酶性质较为相似的有 Gessesse 等^[1]报道的来自菌株 AR-009 的木聚糖酶 XylB ,在 pH 9.0 ~ 10.0 ,60℃ ~ 75℃ 具有最适酶活性 ,但在大于 60℃ 条件下稳定性较差。本文木聚糖酶在耐盐性和耐热性上优于同类的其它酶 ,尤其是高于 25% 的耐盐性这一性质在同类酶中很少有报道。同时此酶完全不具有纤维素酶的活性 ,仅对木聚糖起作用 ,具有严格的底物专一性 ,从而非常适合于应用在造纸和制浆工业 ,不会带来纤维素的损失。

目前寻找新酶的重点已经从得到高产高活性的酶转向寻找具有新特性的酶 ,ZBAW6 的木聚糖酶与同类酶在 N 端序列和性质上的差异说明此酶为具有较高应用价值的新酶。虽然其比活力较低不适于直接应用 ,可以通过基因工程的手段进行改造提高。同时此酶更重要的价值在于通过对其序列的生物信息学研究 ,有助于找到极端酶耐盐碱特性和蛋白质结构之间的关系 ,从而为蛋白质的改造积累资料。

参 考 文 献

[1] Gessesse A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. . *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** 3533 - 3535 .
[2] Sunna A ,Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* , 1997 , **17** 39 - 67 .
[3] Beg Q K ,Bhushan B ,Kapoor M , *et al.* Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme Microb Technol* , 2000 **27** (7) 459 - 466 .
[4] Wen L , Yanling L , Guirong M. Induction and glucose repression of endo-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SI409 . *Process* .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- Biochem* ,1999 **34** 67 – 72.
- [5] Wong K K Y , Saddler J N. Teichoderma xylanases :Their properties and application. In : Visser J , *et al.* ed. Xylans and xylanases. Elsevier :Amsterdam ,1992 ,171 – 186.
- [6] Biely P. Microbiol xylanolytic systems. *Trends Biotech* ,1985 **3** 288 – 290.
- [7] Kapoor M ,Beg Q K ,Bhushan B , *et al.* Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. *Process Biochem* 2001 **36** 803 – 807.
- [8] Barry V. Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int J Biol Macromol* ,1986 **8** 349 – 356.
- [9] Jager A ,Sinner M ,Purkharthofer H , *et al.* Biobleaching with xylanase from a thermophilic fungus. In :Kuwahara M , *et al.* ed. Biotech in the pulp and paper industry. Tokyo : UNI Tokyo press. 1992 ,115 – 121.
- [10] Gupta S ,Bhushan B ,Hongda G S. Isolation , purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J Appl Microbio* 2000 **88** 325 – 334.
- [11] Ghose T K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem* , 1987 **59** 257 – 268.
- [12] Lowry O H ,Rousebrough N J , Farr A L , *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* ,1951 **193** 265 – 275.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* ,1970 **227** 680 – 685.
- [14] Nakamura S ,Wakabayashi K ,Nakai R , *et al.* Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl Envi Microbio* ,1993 **59** 2311 – 2316.
- [15] Gessesse A , Mamo G. Purification and characterisation of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. *J Ind Microbiol Biotechnol* , 1998 **20** 210 – 214.
- [16] Lin J ,Ndlovu L M ,Singh S ,*et al.* Purification and biochemical characteristics of beta-D-xylanase from a thermophilic fungus , *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnol Appl Biochem* ,1999 **30** 73 – 79.
- [17] Inagaki K ,Nakahira K ,Mukai K , *et al.* Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. *Biosci Biotechnol Biochem* ,1998 **62** 1061 – 1067.
- [18] Salles B C ,Cunha R B ,Fontes W , *et al.* Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J Biotech* , 2000 **81** 199 – 204.

Purification and Properties of Xylanase from *Bacillus* sp. ZBAW6

ZENG Yan LIU Tie-Han ZHOU Pei-Jin MA Yan-He*

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : A xylanase produced by *Bacillus* sp. ZBAW6 was purified to electrophoretic homogeneity by three steps including (NH_4)₂SO₄ , Cellulose DE-52 and Bio-gel P100. Its molecular weight is around 45kD by SDS-PAGE. Its N-terminal sequence was DPFAAAVAPL. The optimal pH and temperature of the enzyme activity were 5.5 ~ 10.0 and 65°C. Michaelis constant of the enzyme was 0.11mg/mL and $V_{\text{max}} = 23.89 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ with beech-xylan as the substrate. The activity was completely inhibited by Hg^{2+} .

Key words : Alkaliphilic ZBAW6 , Xylanase , Purification , Properties