

极耐热性阿拉伯糖苷酶基因的表达、纯化及酶学性质研究

薛业敏 毛忠贵 邵蔚蓝*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 采用 PCR 从海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)克隆出编码极耐热稳定性阿拉伯糖苷酶基因,以 pET-20b 为表达质粒,与其 C 末端 6 个组氨酸标签序列融合,在大肠杆菌中得到高效表达。基因表达产物通过热处理和亲和层析柱纯化后,酶纯度达电泳均一。纯化重组酶稳定性检测表明,阿拉伯糖苷酶活性最适作用温度和最适作用 pH 分别为 90~95℃和 pH 5.0~5.5,在 pH 4.2~8.2 之间酶活力稳定,95℃的半衰期为 4h;SDS-PAGE 测得酶的分子量为 56.57 kD,与理论推算值相吻合。在所测定的底物中,阿拉伯糖苷酶仅对对硝基苯-阿拉伯呋喃糖苷(pNPAF)有专一性水解作用,其动力学参数 K_m 值为 0.18mmol/L, V_{max} 为 139 μ mol/min·mg。

关键词 阿拉伯糖苷酶,基因表达,重组酶纯化,酶学性质

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)02-0220-06

木聚糖类半纤维素是仅次于纤维素的植物多糖,其结构比较复杂,含有大量的侧枝取代基。木聚糖的完全降解需要多种酶(即木聚糖酶系统)的协同作用,它包括 β -1,4-内切木聚糖酶(Endo β -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8) β -木糖苷酶(β -1,4-xylosidase, EC 3.2.1.37) α -L-阿拉伯糖苷酶(α -L-arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55) α -D-葡萄糖醛酸酶(α -D-glucuronidase, EC 3.2.1.139)等。 α -L-阿拉伯糖苷酶水解木聚糖非还原末端的阿拉伯糖残基,以减少这些残基在木聚糖酶随机作用木聚糖时所受到的空间阻碍,同时,木聚糖酶水解后产生的带有阿拉伯糖侧枝的寡聚糖必须经过阿拉伯糖苷酶脱侧枝后才能被木糖苷酶进一步分解为单糖,从而成为生物转化的原料^[1~3]。我国每年有大量的秸秆成为环保负担,而约 94%的秸秆半纤维素是阿拉伯糖葡萄糖醛酸木聚糖,利用木聚糖酶水解这类农业废弃物时,阿拉伯糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶的参与对于低聚木糖的生产、废物的生物处理、食品或饲料养份的提高,以及半纤维素的生物转化起着非常重要的作用^[3~5]。同时, α -阿拉伯糖苷酶能够释放以糖苷键连接的非挥发的单萜类物质而使酒和果汁的香味增加,它的生物技术潜力正日益受到人们的关注^[5]。

但是,目前已报道的热稳定性阿拉伯糖苷酶并不多,主要来自 *Thermobacillus xylanilyticus*、*Aureobasidium pullulans*、*Rhodothermus marinus*、*Xylanolytic bacillus pumilus*、*Thermomonospora*

fusca^[6~10]。其中来自 *Rhodothermus marinus* 的阿拉伯糖苷酶是目前报道的极端耐热菌中热稳定性最高的酶,其 85℃半衰期为 8.3h,90℃半衰期为 17min,最适 pH 为 5.5~7.0^[8]。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)是一种生长在 55~90℃的海底火山口附近、严格厌氧的细菌,能够分解和利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖^[11]。在木糖下生长的细胞粗提液中含有降解木聚糖所需的各种酶,包括内 β -1,4-木聚糖酶、 β -D-木糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶和 α -阿拉伯糖苷酶^[11~13],是热稳定性半纤维素酶的重要来源,也是基因工程的理想材料。目前这个菌所产生的两个内切 β -1,4-木聚糖酶 XynA 和 XynB 及该菌的重组 α -葡萄糖醛酸酶已被纯化和定性,其中木聚糖酶 B 在 90℃的半衰期超过 180min^[11~13]。海栖热袍菌降解木聚糖的另一个关键酶—— α -L-阿拉伯糖苷酶在国际上还未见研究报道,本文报道了 α -L-阿拉伯糖苷酶的基因克隆、表达和纯化过程以及酶学性质的研究,为了解极端嗜热菌的热稳定性半纤维素酶系统及特性,并为开发其工业用酶在植物残体的生物转化、清洁生产、食品加工,以及饲料工业的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

T. maritima 编号为 ATCC43589 购自美国菌种收藏中心,大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 JM109

基金项目:国家轻工总局 211 专项基金资助

* 通讯作者。Tel:86-510-5879781;Fax:86-510-5869645;E-mail:wl.shao@pub.wx.jsinfo.net

作者简介:薛业敏(1963-)女,安徽蚌埠人,副教授,博士生,主要从事分子生物学与可再生资源的研究。E-mail:xueyemin@sina.com

收稿日期:2003-05-28,修回日期:2003-09-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

(DE3)购于 Promega (Wisconsin, WI, USA);质粒 pET-20b 是带有 T7 启动子、氨苄青霉素(Amp)抗性基因和组氨酸标签的表达质粒,购于 Novagen 公司。

1.2 主要试剂

限制酶 *Xho* I, *Eco*RV, *Xba* I, T4 DNA 连接酶和 *Pyrobest* DNA 聚合酶购自华美生物工程公司和宝生物工程公司;Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司;蛋白酶 K、溶菌酶、IPTG 和对硝基苯-阿拉伯呋喃糖苷购自 Promega 公司;CTAB、DNA 抽提酚(Tris 饱和酚)购自美国 BBST 公司;质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.3 PCR 引物

基因扩增引物按 GenBank 报道的阿拉伯糖苷酶基因序列设计:引物 1 5'-GGGGGTACCATGTCCTAC-AGGATAGTG-3'内有 *Eco*RV 酶切位点和起始密码子;引物 2 5'-AACTGCAGTCATCTCGAGCAATTCTAC-CTCAAT-3'内含一个 *Xho* I 酶切位点,由上海生物工程技术有限公司合成。

1.4 培养基和培养条件

大肠杆菌培养在 LB 培养基,电转化用 SOC 培养基。转化子的选择用含有氨苄青霉素($10\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基,配方见文献[14]。

培养 *T. maritima* 所用的培养基配方为:每升含可溶性淀粉 0.5g,树脂天青(Resazurin)1mg, NaCl 28g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.5g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.7g, KCl 0.33g, NH_4Cl 0.25g, CaCl_2 0.0855g, 酵母膏 0.1g, 微量元素 15mL, pH7.0。微量元素的制备按如下配方: Nitrilotriacetic acid 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 500mg, NaCl 1.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg, CaCl_2 (无水)100mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (无水)10mg, Boric acid 10mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mg, Na_2SeO_3 (无水)1g。先将 Nitrilotriacetic acid 溶于 500mL 水中,用 2~3mol/L 的 KOH 将 pH 调制 6.5。再加入其他成分,定容至 1L。

T. maritima 的接种和培养:培养基经加热驱氧、充氮、冷却后加还原剂 Na_2S 0.5g/L,并分装于预先充氮的 100mL 血清瓶中,加盖密封并灭菌冷却后,用注射器按 0.5%接种量接入种液,80℃静置培养 8~10h。菌种于 16℃厌氧条件下可保存半年。

1.5 基因操作

基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、

DNA 片段的分离、感受态细胞的制备,以及基因的高效电转化方法均参照文献[14]。质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.6 组氨酸融合表达载体的构建

根据已报道的 *ara* 基因序列设计并合成一对引物 1 和 2。用此引物,以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增参数为 95℃ 5min,加 *Pyrobest* DNA 聚合酶;94℃ 50s,47℃ 1.5min,72℃ 3min,循环 35 次;72℃ 保温 10min。PCR 扩增结束后电泳检测并将 PCR 产物从胶回收后,用 *Xho* I 酶切并经纯化,以适当比例与 *Eco*RV 和 *Xho* I 双酶切的 pET-20b 大片段混合并连接,转化大肠杆菌 JM109 构建含 *ara* 基因片段的原核表达载体 pET-20b-ara。

1.7 *ara* 基因在原核表达载体中的表达

将构建好的重组质粒 pET-20b-ara 转入 *E. coli* JM109(DE3),挑取 1~2 个单菌落接入含有氨苄(Amp)抗性的 LB 培养液中,37℃培养过夜;取 100μL 过夜培养液接入 100mL 含 Amp 抗性的 LB 培养液中,37℃振荡培养至 OD_{600} 达 0.6~0.8,吸出 1mL 未诱导的培养物,剩余培养物中加入 IPTG 至浓度 1mmol/L,并继续培养 4h 后,5000g 离心 10min 收集菌体。SDS-PAGE 检测 *ara* 基因在原核表达载体中的表达情况。

1.8 酶活性测定

阿拉伯糖苷酶活性测定采用分光光度法^[15],测定该酶从底物对硝基苯- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(*p*NPAF)释放对硝基苯酚(*p*NP)的量。反应体系为 200μL,内含 10μL 20mmol/L 底物 *p*NPAF、180μL 50mmol/L pH 6.2 的磷酸钾缓冲液、10μL 粗酶液。于 85℃反应 20min,然后加入 600μL 1mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应并显色,在 405nm 处测量光吸收的增加值。一个酶单位定义为在该反应条件下,1min 内催化产生 1μmol 对硝基苯酚所需要的酶量。用对硝基苯酚作标准曲线。蛋白质浓度用 Bradford 法测定,以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[16]。

1.9 重组酶的分离纯化

1.9.1 重组酶的培养:将含有质粒 pET-20b-ara 的 *E. coli* JM109(DE3)的 LB 平板菌种接种于含有 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl、0.01% Amp 的液体培养基,37℃摇瓶培养过夜,转速 200r/min。液体菌种以 1% 的接种量接入到 5L 发酵罐中。发酵罐培养基组成:每升含胰蛋白胨 10g、酵母提取物

5g、NaCl 10g,调 pH 7.0,灭菌冷却至 30℃后,加入 0.01% Amp。发酵罐起始 pH 7.0,最终 pH 7.9,通气量 1:1,温度为 30℃,转速 250r/min。培养至 OD_{600} 达 0.6~0.8,加 IPTG 至终浓度 0.8mmol/L,继续培养。每隔 1h 取样分析细胞密度 OD_{600} 和酶活,当酶活力高且稳定时下罐。

1.9.2 粗酶液的制备 将收集细胞用 50mL 亲和柱结合缓冲液(5mmol/L 咪唑、20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)重悬,经高压细胞破碎仪(French Pressure, Thermo)破碎细胞,9600g 离心 20min,取上清于 70℃下热处理 20min 后,9600g 离心 30min,上清液为粗酶液。

1.9.3 金属 Ni^{2+} 的亲和层析 将粗酶液经 0.45 μ m 微孔膜过滤后注入亲和层析柱(Novagen, 1.6cm \times 6cm),然后用洗涤缓冲液(60mmol/L 咪唑、20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗涤,最后用洗脱缓冲液(1mol/L 咪唑、20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗脱,流速 0.2mL/min,以每管 2mL 分部收集。收集酶活的峰值部分,用截留分子量为 3 万的超滤膜浓缩后,以 SDS-PAGE 检测纯度。

1.10 重组酶的性质分析

1.10.1 重组阿拉伯糖苷酶的反应时间曲线 反应温度为 85℃,1 μ L 酶液 + 189 μ L pH 5.7 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液 + 10 μ L 底物,反应时间分别为 2、5、10、20、40min,于 405nm 测定吸光度值,并作酶的时间曲线。

1.10.2 温度对酶活力的影响 (1) 纯酶最适反应温度的测定 在 60~100℃范围内每隔 5℃ 分别测定酶活力,反应条件为 pH 6.2,10min。以最高活力为 100%,作温度曲线。(2) 纯酶的热稳定性测定 分别将酶(0.017mg/L)置于温度 90℃、95℃、100℃下保温 0、0.5、1、2、3、4、5 h,加入底物于 85℃,pH 6.2 测定残留活力,以保存于冰浴中的酶活力为 100%,作温度稳定性曲线,找到酶活力半衰期的时间。

1.10.3 pH 对酶活力的影响 (1) 酶促反应的最适 pH 值分析 在 85℃下测定 pH 值的变化对酶活力的影响,以最高活力为 100%,作 pH 曲线。(2) pH 稳定性的分析 酶置于不同 pH 值的缓冲液中,在 37℃保温 30 min,再加入底物测定残留活力,以冰浴保存的酶在相对应的 pH 条件下的活力为 100%,比较酶在不同 pH 的稳定性。所用缓冲液为 100mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液(pH 4.2~8.2),100mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0)。

1.11 相对分子质量

纯酶亚基分子量用 10% 的 SDS-PAGE 在 110V 电压下电泳 85min 后根据相对迁移率计算。

1.12 酶的动力学参数测定

以不同浓度的对硝基苯酚- α -L-阿拉伯呋喃糖苷为底物和 50mmol/L pH 5.0~5.5 的邻苯二甲酸-咪唑缓冲液,在 85℃下反应 10min,采用双倒数作图法,计算 K_m 及 V_{max} 值。

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建

以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板进行 *ara* 基因片段 PCR 扩增,电泳检测结果表明,在 1.5kb 附近有一条很亮的扩增带,与报道的 *ara* 基因序列大小一致,没有明显的非特异带,说明所选 PCR 扩增条件能有效扩增 *ara* 基因片段。将 PCR 产物克隆至载体 pET-20b 中,构建出阿拉伯糖苷酶 Ara 的融合蛋白表达质粒。该重组载体的特点是 T7 启动子控制下的阿拉伯糖苷酶基因和 6 个组氨酸序列融合,这样产生的 His-6 标签的蛋白就能用金属螯合亲和色谱一步纯化。

用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定,pET-20b-*ara* 能被 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切得到一条比 PCR 扩增片段大 100bp 的片段,而在 3.6kb 处存在一条片段与同样双酶切的 pET-20b 大片段大小一致。因此,初步证实 *ara* 基因已插入 pET-20b 载体中。

2.2 *ara* 基因在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pET-20b-*ara* 转化大肠杆菌 JM109(DE3),经 IPTG 诱导 4h 后,并以转入空载体 JM109(DE3) pET-20b 为对照,收集菌体细胞进行 SDS-PAGE(分离胶的浓度为 10%),考马斯亮蓝染色的结果见图 1。从电泳图谱上可以看出,经 IPTG 诱导后,含有质粒 pET-20b-*ara* 的大肠杆菌在分子量 55.27kD 处有明显的蛋白表达带。

两种菌悬液经 French Pressure 破胞后,分别进行酶活性检测,结果重组质粒 pET-20b-*ara* 的无细胞抽提液中检测到明显的活性,而对照菌则均未检测到阿拉伯糖苷酶。

2.3 表达蛋白的纯化

将 IPTG 诱导表达的菌体 JM109(DE3) pET-20b-*ara* 裂解,并经 70℃ 20min 热处理,取上清液上亲和层析柱(Poly-His 亲和层析柱),检测不同柱流份中阿拉伯糖苷酶。结果表明,在洗脱缓冲液中检测到较高的阿拉伯糖苷酶,而在结合缓冲液和洗涤缓冲液

中均未检测到酶活性,因此,证明组氨酸融合表达载体已构建成功。同时,SDS-PAGE 结果表明:Ara 重组酶通过热处理和亲和层析柱纯化后,酶纯度达到电泳均一(图 1)。

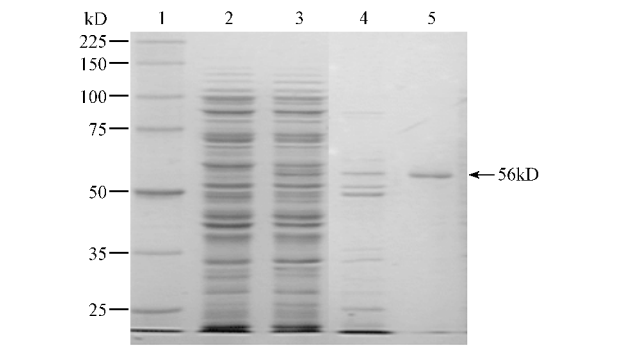


图 1 极端热稳定性阿拉伯呋喃糖苷酶纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE (10%) of thermostable arabinofuranosidase purification steps

M: protein marker; 1: Crude extract of *E. coli* JM109(DE3) pET-20b; 2, 3: Crude extract of *E. coli* JM109(DE3) pET-20b-ara; 4: Crude extract after heat treatment; 5: Purification immobilized metal affinity chromatography.

2.4 酶分子质量的测定

以标准分子量蛋白的迁移率为横坐标,已知蛋白质分子量的常用对数为纵坐标作图(图 2),得出回归方程 $\lg m = -0.9098R_f + 2.2735$,将纯化的重组酶蛋白的迁移率带入方程求得酶亚基分子量约为 56.57kD,比理论推算值 55.27kD 增加了约 2.35%,其可能的原因是在构建工程菌 *E. coli* JM109(DE3) pET-20b-ara 过程中,在 α -阿拉伯糖苷酶基因表达产物的 N 端融合了一个 6 个组氨酸的标签,这样重组酶的分子量就增加 6 个组氨酸的大小,那么实际理论推算值应为 56.08kD,与测定值 56.57kD 吻合。

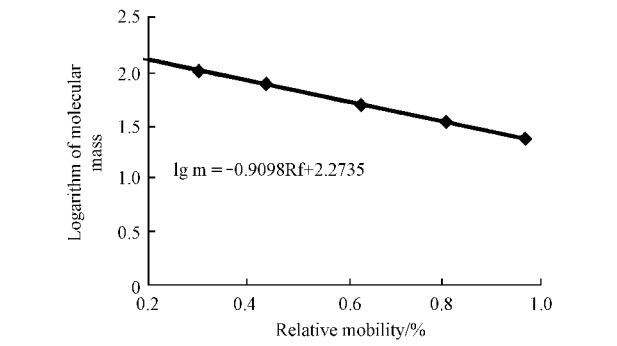


图 2 相对迁移率推算 α -阿拉伯糖苷酶的相对分子质量

Fig.2 Calculation of molecular mass based on the relative mobility of purified arabinofuranosidase

2.5 纯化重组酶的性质

2.5.1 重组 α -L-阿拉伯糖苷酶的最适反应条件:酶促反应的时间曲线(图 3-A)表明:反应条件下为 85℃,pH 6.4,酶浓度为 0.017mg/mL 时,该酶在 10min 内保持了最高反应速度,在 20 ~ 40min 内反应速度略有下降。pH 值在偏酸性的条件下,酶的最高活性峰出现于 90 ~ 95℃ 间;在 60 ~ 75℃ 之间,酶的活性随着温度的提高而迅速上升,而当温度在 75 ~ 90℃ 酶的活性提高缓慢,但是当温度提高到 100℃ 酶活性有所下降,说明酶已经较快地失活(图 3-B)。以邻苯二甲酸氢钾-咪唑为缓冲液,测出酶于 85℃ 时的最适 pH 为 5.0 ~ 5.5 之间(图 3-C),属于酸性酶。

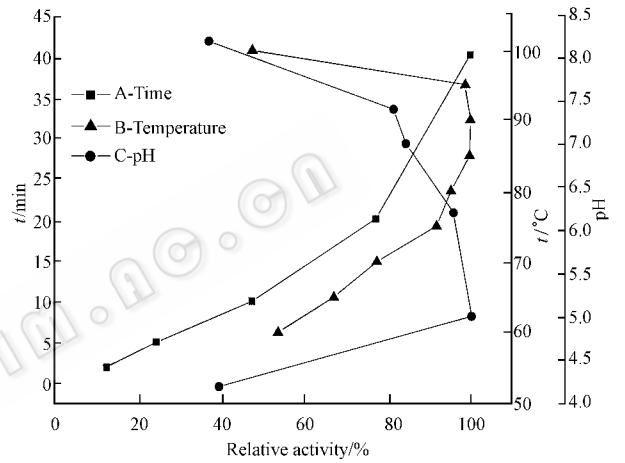


图 3 重组阿拉伯糖苷酶的最适反应条件

Fig.3 The optimum conditions of the recombinant enzyme reaction

A. The time-curve of enzyme reaction at 85℃, pH 6.4; B. Determination of optimum temperature at pH 5.5 with a 10-min assay; C. Determination of optimum pH at 85℃ with a 10-min assay.

2.5.2 酶的稳定性:纯化的 α -L-阿拉伯糖苷酶(0.017mg/mL)。在 pH 4.2 ~ 8.2 之间酶的相对稳定性和残留活性都在 80% 以上,且曲线比较平稳,pH 值超出这一范围后酶活下降较快,说明该酶在过酸或过碱条件下不利于该酶的保存或进行催化反应。pH 偏酸条件下酶在 90℃ 保温 5h,残留活性在 90% 以上,95℃ 的半衰期超过 4h,100℃ 下酶的半衰期为 80min。由此可推断,克隆到的 *ara* 基因是热稳定性阿拉伯糖苷酶的编码基因,该酶具有很高的热稳定性,在工业化应用方面具有非常可观的开发潜力。

2.6 酶促反应的动力学

酶的动力学参数 K_m 及 V_{max} 值是根据 Lineweaver-Burk 作图法计算,本实验算得的 K_m 值为 0.18mmol/L, V_{max} 为 139 μ mol/min \cdot mg。

2.7 酶的底物特异性

重组 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶只对对硝基苯酚- α -L-阿拉伯糖苷有专一性活性,而对对硝基苯酚- α -D-木糖苷、对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷、对硝基苯酚- β -D-木糖苷都未测出活性。

3 讨论

构建合适的极端菌的外源基因表达系统,高效率地表达一些耐热耐碱酶蛋白,一直是人们研究的热点。海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧真细菌,生长在 $55 \sim 90^\circ\text{C}$ 海底火山口处,是极耐热性酶的重要来源^[11~13]。但是该菌在产生复杂的木聚糖降解酶系的同时还产生大量酶学性质比较相近的淀粉酶、纤维素酶,因此,分离纯化木聚糖降解酶系中的某一酶类非常困难。同时,海栖热袍菌 *T. maritima* 生长条件要求苛刻,细胞密度较低,不适合工业化生产。利用基因重组技术,将阿拉伯糖苷酶基因在合适的宿主中表达,可将该酶比较容易地表达。同时,通过提高表达水平可以获得从自然界难以得到的大量阿拉伯糖苷酶。本实验室采用 PCR 技术从海栖热袍菌 *T. maritima* 克隆出编码高度热稳定性阿拉伯糖苷酶的基因,与组氨酸标签融合,以 C 末端带有 6 个组氨酸标签的表达质粒 pET-20b 作为接受载体在大肠杆菌中成功表达。

由于基因表达产物带有一个 6 个组氨酸的标签,可通过金属离子亲和层析法进行纯化。实验过程中,利用在常温菌 *E. coli* 中表达的阿拉伯糖苷酶对热的稳定性,将重组菌细胞破碎后的上清经过 70°C 20min 的热处理后,去除了大量菌体蛋白,再通过一步 Ni^{2+} 亲和层析柱可使酶纯度达到电泳均一,这为下一步的酶学性质鉴定和分析工作提供了便利,也为重组酶的大规模工业化提取奠定了基础。

目前,阿拉伯糖苷酶已从许多微生物中纯化和鉴定,阿拉伯糖苷酶基因也从细菌 *Bacillus polymyxa*、*Butyrivibrio fibrisolvens* 和 *Clostridium Streccorarium* 以及真菌 *Trichoderma reesei* 和 *Aspergillus niger* 中克隆出来^[17~22]。总的来说,不论是细菌性阿拉伯糖苷酶,还是真菌性的阿拉伯糖苷酶大多数属于酸性酶。重组海栖热袍菌的阿拉伯糖苷酶也属酸性酶,在 95°C 的半衰期为 4h,因为如果不需要终止催化反应,酶的半衰期长就意味着效率高,因此,该酶具有可观的工业应用前景。至今已报道的各种阿拉伯糖苷酶的 K_m 值范围在 $0.082^{[23]} \sim 12.5 \text{ mmol/L}^{[24]}$ 之间,该酶的 K_m 为 0.18 mmol/L ,最大反应速度为

$138 \mu\text{mol}(\text{min} \cdot \text{mg})$,表明酶与底物的亲和力较强。有些 α -阿拉伯糖苷酶同时具有微弱的 β -木糖苷酶活性,而从 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 纯化^[15]并克隆的 α -阿拉伯糖苷酶具有很强的 β -木糖苷酶活性。本研究所提纯的重组海栖热袍菌的阿拉伯糖苷酶只能专一地水解对硝基苯酚- α -L-阿拉伯呋喃糖苷,在本试验中未显示其它酶的活性,这种高度专一性在有些生化过程中具有很重要的意义。

总之,阿拉伯糖苷酶作为实现植物残体的生物转化所必不可少的重要酶类,在半纤维素资源开发与利用的领域已成为国外科学家研究的热点。由于它能协同木聚糖酶进一步降解木聚糖类半纤维素,认为开发该酶在植物残体的生物转化、食品加工、饲料营养和清洁生产等方面的应用将获得广泛的效益。因此,进一步开发 α -L-阿拉伯糖苷酶的应用性研究正是本实验室今后需要研究的工作。

参 考 文 献

- [1] 邵蔚蓝,薛业敏. 以基因重组技术开发木聚糖类半纤维素资源. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 88-93.
- [2] Sunna A, Autranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(1): 39-67.
- [3] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 326-338.
- [4] Gunata Z, Brillouet J M, Voirin S, et al. Purification and properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucoside. J Agri Chem, 1990, 38: 772-776.
- [5] Clinche F L, Francisco P, Daniel R, et al. α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus terreus* with Potential application in enology: induction, purification, and characterization. J Agric Chem, 1997, 45: 2379-2383.
- [6] Takoua D, Nicola C, Jan C, et al. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 66(4): 1734-1736.
- [7] Badl C Saka, Rodney J Bothast. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 64(1): 216-220.
- [8] Gomes J, Gomes I I, Terler K, et al. Optimisation of culture medium and conditions for α -L-arabinofuranosidase by the extremophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(6): 414-422.
- [9] Degrassi G, Vindigni A, Venturi V. A thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Xylanolytic Bacillus pumilus* purification and characterization. J Biotechnol, 2003, 101(1): 69-79.

- [10] Tuncer M , Ball A S . Purification and partial characterization of α -L-arabinofuranosidase produced by *Thermomonospora fusca* . *Folia Microbiol (praha)* , 2003 , **48** (2) : 168 – 172 .
- [11] Rober H , Thomas A L , Helmut K , *et al* . *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90°C . *Arch Microbiol* , 1986 , **144** : 324 – 333 .
- [12] Christoph W , Wolfgang L . Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8 . *Appl Environ Microbiol* , 1995 , **61** : 1810 – 1815 .
- [13] Ruile P , Winterhalter C , Liebl W . Isolation and analysis of a gene encoding α -glucuronidase , an enzyme with a novel primary structure involved in the breakdown of xylan . *Mol Microbiol* , 1997 , **23** : 267 – 279 .
- [14] Sambrook J , Frisch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 2nd ed New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [15] Shao W , Wiegel J . Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* . *J Bacteriol* , 1992 , **174** : 5848 – 5853 .
- [16] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding . *Anal Biochem* , 1976 , **72** : 248 – 254 .
- [17] Ioannes P D , Peirano A , Steiner J , *et al* . An α -L-arabinofuranosidase from a *Penillium purpurogenum* production and properties . *J Biotechnol* , 2000 , **76** : 253 – 258 .
- [18] Utt E A , Eddy C K , Keshav K F , *et al* . Sequenceing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities . *Appl Environ Micro* , 1991 , **57** : 1227 – 1234 .
- [19] Morales P , Madarro A , Flors A , *et al* . Purification and characterization of a xylanase and arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa* . *Enzyme and Microbial Technol* , 1995 , **17** : 424 – 429 .
- [20] Sakka K , Yoshikawa K , Kojima Y , *et al* . Nucleotide sequence of the *Clostridium streccarium xylA* gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities and properties of the translated product . *Biosci Biotech Biochem* , 1993 , **57** : 268 – 272 .
- [21] Mmargolles-clark E , Tenkanen M , Nakari-Setälä T , *et al* . Cloning of genes encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae* . *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 3840 – 3846 .
- [22] Crous J M , Pretorius I S , Van Zyl W H . Cloning and expression of the α -L-arabinosidase gene (ABF2) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae* . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1996 , **46** : 256 – 260 .
- [23] Komae K , Kaji A , Sato M . An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389 . *Agric Biol Chem* , 1982 , **46** (7) : 1899 – 1905 .
- [24] Tajana E , Fiechter A , Zimmermann W . Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces diastaticus* . *Appl Environ Microbiol* , 1992 , **58** (5) : 1447 – 1450 .

Expression , Purification and Characterization of Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima*

XUE Ye-Min MAO Zhong-Gui SHAO Wei-Lan *

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : The gene of arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima* was amplified by PCR , and inserted into the plasmid pET-20b with the 6-His tag , and expressed in *E. coli* JM109 (DE3) . The recombinant protein was purified by the heat treatment and immobilized metal affinity chromatography , purified enzyme presented as a single protein band on SDS-PAGE with a molecular weight of 56.57kD . The optimum activity of arabinofuranosidase was found to be at pH 5.0 ~ 5.5 and 90 ~ 95°C and at the pH range of 4.2 ~ 8.2 , the enzyme was stable with an half-life of 4h at 95°C . Among all tested substrates , the enzyme exhibited the specific activity towards p-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside (pNPAF) . The apparent Michaelis constant of the α -L-arabinofuranosidase was 0.18 mmol/L for pNPAF , and V_{\max} was 139 μ mol/min·mg protein .

Key words : Arabinofuranosidase , Gene expression , Purification , Enzyme stability

Foundation item : 211 Foundation of Ministry of Light Industry of Country

* Corresponding author . Tel : 86-510-5879781 ; Fax : 86-510-5869645 ; E-mail : wl.shao@pub.wx.jsinfo.net

Received date : 05-28-2003