

## 假单胞菌碱性木聚糖酶的纯化及性质

刘瑞田 曲音波 姜英辉 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**提 要** 假单胞菌(*Pseudomonas*)G6-2 可产生两种胞外木聚糖酶,即 XynA 和 XynB。经过硫酸铵沉淀、阴离子和阳离子交换层析、分子筛色谱,最终得到两种电泳纯酶。XynA 的分子量及等电点分别为 4.2kD 和 9.1, XynB 的分子量和等电点分别是 2.0kD 和 8.8。经薄层色谱分析证明,两酶以不同的方式水解木聚糖,但都不产生木糖,即两酶都为内切酶,它们的最适作用温度均为 50℃。XynA 的最作用 pH 为 7.0~9.8,而 XynB 的为 7.0~7.5。在 65℃ 时的半寿期 XynA 为 6 min, XynB 为 140 min。XynA 的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别是  $5.56 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  和  $543 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , XynB 的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别是  $7.72 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  和  $819 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。两酶受  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Hg}^{2+}$  强烈抑制。化学修饰的初步结果表明,两酶的活性位点氨基酸均含有色氨酸和羧基氨基酸。

**关键词** 假单胞菌 碱性木聚糖酶 纯化 酶学性质

**分类号** Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0132-36

木聚糖广泛存在于自然界,其含量仅次于纤维素,通常约占高等植物干重的 15%~30%。它由木糖经  $\beta$ -1,4 糖苷键连接起来形成主链,并由阿拉伯糖、乙酰基、葡萄糖醛酸、甘露糖等复杂侧链共同组成。在许多降解木聚糖的酶中,分解木聚糖主链的内切木聚糖酶占最重要的地位。它在饲料、食品和纺织工业中具有潜在的应用价值。1986 年芬兰科学家发现用该酶处理纸浆,可降低漂白时氯的用量,减少环境污染。这一发现已迅速应用于工业生产,从而极大地加快了该酶的研究进程,使木聚糖酶的研究成为生物技术领域研究的热点之一。人们选育出了许多产生木聚糖酶的菌株,但这些菌株产生的木聚糖酶最作用 pH 多在酸性范围,而造纸工业中纸浆漂白的环境是碱性的,为了更好地发挥木聚糖酶的作用且不使漂白工艺复杂化,这就需要该酶具有耐碱性。我们实验室从实用出发,分离出一株可产生碱性木聚糖酶的假单胞菌 G6-2<sup>[1]</sup>,该菌所产酶液对于纸浆助漂和草浆改性具有重要的潜在应用价值<sup>[2]</sup>。本文介绍从该菌的发酵液中分离纯化木聚糖酶组分及其性质研究的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Sephadex G-100, Bio-gel P-10, DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, 燕麦木聚糖,牛血清白蛋白, SDS-分子量标准蛋白,两性电解质载体(pH3.5~10.0),硅胶板。

### 1.2 菌种及培养方法

菌种为本实验室分离得到的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)G6-2。

培养基及培养条件同文献 [1]。

### 1.3 木聚糖酶活力测定

同文献 [1]。

### 1.4 蛋白质含量测定

按 Lowry 等人<sup>[3]</sup>的方法进行,以牛血清白蛋白为标准。

### 1.5 酶谱分析

对粗酶液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,按 Satoshi 等人<sup>[4]</sup>的方法进行活性染色。

### 1.6 酶的纯化

**1.6.1 硫酸铵沉淀** 在假单胞菌 G6-2 培养液中加入硫酸铵至 35% 饱和度,离心弃沉淀,在上清液中继续加入硫酸铵至 56% 饱和度,离心收集沉淀。

**1.6.2 Sephadex G-100 层析** 将上述沉淀溶解后,以 Sephadex G-25 柱(2.6cm×30cm)除盐,将酶液上 Sephadex G-100 柱(2.6cm×100cm),以 pH8.0 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液洗脱,合并含有木聚糖酶活的洗脱液,并超滤浓缩。

**1.6.3 DEAE-Sephadex A-50 层析** 将酶液加样至 DEAE-Sephadex A-50 柱(26cm×20cm)上,以 pH8.6 的 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱,收集穿过峰并浓缩。

**1.6.4 CM-Sephadex C-50 层析** 将上述浓缩后的洗脱液加样到 CM-Sephadex C-50 柱(2.6cm×20cm)上,以含有 NaCl 的 pH6.2 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液洗脱,NaCl 浓度梯度为 0~0.8mol/L。收集具酶活的洗脱液并浓缩。

**1.6.5 Bio-gel P-10 层析** 将酶液加到 Bio-gel P-10 柱(1.6cm×100cm)上,以 pH8.5 的 0.02mol/L Tris 缓冲液洗脱,收集并浓缩具酶活的洗脱液。以上的每一步层析后都用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

### 1.7 木聚糖酶的性质

**1.7.1 酶蛋白分子量及等电点测定** 分子量测定以 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[5]</sup>,等电点测定按 Vesterberg 方法<sup>[6]</sup>在 Pharmacia LKB 多功能电泳仪上进行。

**1.7.2 水解产物薄层色谱** 将适量的酶与木聚糖底物混合,封闭状态下 50℃ 水解,不同时间取样,100℃ 沸水浴中加热 10min,然后按 Kubata 等人的方法在硅胶板上进行薄层色谱<sup>[7]</sup>。

**1.7.3 酶的动力学特征** 用 Lineweaver-Burk 作图法,以燕麦木聚糖为底物,分别求出两酶的动力学常数  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

### 1.8 酶的化学修饰

以 NBS(N-bromosuccinimide)、DTNB(dithionitrobenzoate)、Phenylglyoxal、PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)和 WRK(N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate)为化学修饰剂,在一定浓度下与两酶分别作用 10min(WRK 为 50min),以不加修饰剂为对照,测定残余酶活<sup>[8~10]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 酶谱分析

原酶液经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后复性染色,可见有两条清晰的透明带,表明此

原酶液中含有两种木聚糖酶。

### 2.2 酶的纯化

原酶液经硫酸铵沉淀和 Sephadex G-100 ,DEAE-Sephadex A-50 和 CM-Sephadex C-50 柱层析后 ,经 SDS-PAGE 检测仍见有两条蛋白带。经酶的活性染色知两蛋白均为木聚糖酶。将洗脱液进一步经 Bio-gel P-10 柱层析后两酶才可分开。经 SDS-PAGE 及等电聚焦电泳检验 ,两部分洗脱液都分别呈现单一的蛋白带 ,证明两木聚糖酶( 简称为 XynA 和 XynB)已被纯化。纯化过程中酶的活力及蛋白含量变化见表 1 ,酶的分子量测定见图 1。在酶的纯化过程中 ,我们经前几步的纯化首先除去杂蛋白 ,于最后一步将两酶分开 ,这样就比一开始单独提纯每一组省去不少工作量。

表 1 从假单胞菌 G6-2 发酵液中纯化木聚糖酶的试验结果

Table 1 Purification of xylanases from *Pseudomonas* G6-2

步骤 Step	总蛋白 Total protein/mg	总活力 Total activity/u	比活力 Specific activity/( u/mg)	活力回收 Activity recovery/%	纯化倍数 Purification fold
Crude extract	1404.0	75000	53.4	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	1247.0	71827	57.6	95.8	1.1
Sephadex G-100	183.0	49090	268.3	65.5	5.2
DEAE A-50	104.0	36998	355.4	49.3	6.7
CM C-50	62.0	25730	415.0	34.3	7.8
Bio-gel P-10 XynA	20.6	10598	514.5	14.1	9.6
XynB	13.2	9390	711.3	12.5	13.3

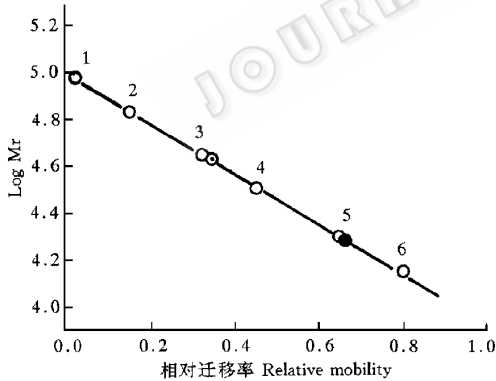


图 1 SDS-PAGE 测定 XynA 和 XynB 的分子量  
Fig. 1 Molecular weight determination of XynB by SDS-PAGE Standard protein :

1. Rabbit phosphorylase ( 97400 ) ;
2. Bovine serum albumin( 66200 ) ;
3. Rabbit actin( 43000 ) ;
4. Bovine carbonic anhydrase( 31000 ) ;
5. Trypsin inhibitor( 20100 ) ;
6. Hen egg white lysozyme( 14400 ).

○ :XynA ; ● :XynB.

### 2.3 XynA 和 XynB 的酶学性质

#### 2.3.1 两酶的分子量、等电点、酶学动力学常数 :见表 2。

表 2 XynA、XynB 的 Mr、pI、K<sub>m</sub>、V<sub>max</sub>

Table 2 The Mr ,pI ,K<sub>m</sub> ,V<sub>max</sub> of XynA and XynB

	分子量 kD	等电点 pI	K <sub>m</sub> / ( mg/ml)	V <sub>max</sub> / ( μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )
XynA	4.2	9.1	5.56	543
XynB	2.0	8.8	7.72	819

2.3.2 温度对酶活力及稳定性影响 :于不同温度下用常规方法测定相对酶活 ,求得 XynA 和 XynB 酶反应时最适温度都为 50℃。适当稀释的酶液于 65℃ 分别保温不同时间 ,取出后立即冷却 ,按常规方法测定相对酶活。结果表明 ,65℃ 时 XynA 的半寿期为 6min ,而 XynB 的半寿期为 140min。XynA 的耐热性能远不如 XynB 好。

**2.3.3 pH 对酶活力的影响** :用 pH4.0~6.4 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH7.0~9.2 的巴比妥缓冲液, pH9.4~10.6 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液分别配制反应体系,以常规方法测定酶的相对活力,测得 XynA 和 XynB 的最适 pH 分别为 7.0~9.8 和 7.0~7.5。可见,两者的最适 pH 都在碱性范围内,前者的最适范围可延伸到 9.8,而后的相对较窄,碱性范围内的酶活性不如前者。从微生物发酵液中提纯酸性或中性木聚糖酶国外虽有不少报道<sup>[7]</sup>,但对碱性木聚糖酶的提纯及性质研究报道不多。我们纯化出的两种碱性木聚糖酶 XynA 和 XynB 耐碱性都较强,特别是 XynA 其耐碱程度与国外报道的几种耐碱性较好的木聚糖酶相似<sup>[11]</sup>。与 XynB 相比,分子量较大的 XynA 耐碱性较好而耐热性较差。这种现象在其它文献中也有发现,其机理尚需进一步研究。

**2.3.4 pH 对酶稳定性的影响** :以 2.3.3 节中不同 pH 的缓冲液将酶适当稀释,置 4℃ 冰箱 24 h,以常规方法测定酶的相对活力。测得 XynA 的 pH 稳定范围为 6.5~10.0,而 XynB 为 7.0~11.0。

**2.3.5 酶的水解产物薄层色谱分析** :由结果可知, XynA 对木聚糖的降解是随机地切开木聚糖的主链,最初的酶降解产物主要为链较长的寡聚糖,随着时间的延长,产生的短链寡聚糖越来越多,但最终也不能产生木糖,这与一些报道相一致<sup>[11]</sup>。XynB 对主链的降解是从靠近末端进行的,降解开始就主要产生几种短链木寡糖,随着时间的延长产生的木寡糖的量越来越多,但种类没有变化,产物中也不含木糖,此种方式并不多见。可见两酶都为内切木聚糖酶,但两者的作用方式有所不同,这可能与其活性中心的结构有关,用纯化的两酶可进一步研究木聚糖酶的作用机理。

表 3 金属阳离子对酶活性的影响

Table 3 Effect of metal ions on XynA and XynB

试剂 <sup>*</sup> Reagent	相对酶活 Relative activity/%	
	XynA	XynB
Control	100.0	100.0
LiSO <sub>4</sub>	103.7	90.4
BaCl <sub>2</sub>	99.6	92.3
CaCl <sub>2</sub>	98.1	98.6
MgCl <sub>2</sub>	89.3	96.8
EDTA	85.2	90.4
CoCl <sub>2</sub>	84.2	92.6
SDS	47.5	66.6
SnCl <sub>2</sub>	45.0	60.3
MnCl <sub>2</sub>	36.8	78.4
AgNO <sub>3</sub>	14.8	22.7
ZnSO <sub>4</sub>	4.4	38.5
FeCl <sub>2</sub>	2.0	2.8
PI(Ac) <sub>2</sub>	0	15.5
FeCl <sub>3</sub>	0	0
CuCl <sub>2</sub>	0	0
HgCl <sub>2</sub>	0	0

\* 7.5mmol/L

**2.3.6 不同金属阳离子对两酶的影响** 结果见表 3。多种金属阳离子对两酶都有不同的影响,其中 Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 和 Ag<sup>+</sup> 对两酶均有强烈的抑制作用, Mn<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对 XynA 的抑制作用比对 XynB 强。

**2.4 化学修饰对两种酶组分的影响** (表 4)  
用多种不同的化学修饰剂对两种酶组分

表 4 化学修饰剂对酶活性的影响

Table 4 Effect of chemical modification reagents on activity of XynA and XynB

修饰剂 Reagents	浓度 Concentration/ (mmol/L)	相对酶活 Relative activity/%	
		XynA	XynB
NBS	1	0	0
WRK	40	6.3	10.8
PMSF	10	85.2	91.7
DTNB	10	95.3	91.6
Phenylgloxal	10	102.1	84.2

进行了修饰,结果看出,NBS和WRK对两酶的活性影响很大,表明两酶的活性中心可能与色氨酸及羧基氨基酸有关,而DTNB、PMSF和Phenylglyoxal对酶的活性影响不大,表明半胱氨酸、丝氨酸和精氨酸不在酶的活性中心。因而,两酶的活性位点氨基酸与酸性或中性酶的并无多大差异<sup>[8-10]</sup>。这样看来,该酶的耐碱性是与活性位点氨基酸以外的因素有关。有人通过对酸性和碱性纤维素酶的氨基酸序列进行比较分析<sup>[12]</sup>,发现了在碱性纤维素酶中有8个保守性氨基酸,其中有丙氨酸、丝氨酸、色氨酸和脯氨酸等。通过基因的定点突变表明<sup>[13]</sup>,碱性纤维素酶的耐碱性与其分子中的丙氨酸和丝氨酸有关,它们可与活性位点氨基酸形成氢键。由于纤维素酶和木聚糖酶都为 $\beta$ -1,4-聚糖酶,活性中心相似,因而推测其耐碱机理可能也有相似之处。

### 参 考 文 献

- [1] 杨建云,曲音波,刘瑞田等. 迎接21世纪的挑战. 北京: 化工出版社, 1996. 715~719.
- [2] Chen J, Yang J, Qu Y *et al.* ACS Symp Ser, 1996, **655**: 308~316.
- [3] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951, **193**: 265~275.
- [4] Satoshi N, Kenji W, Rywichihiro N *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 2311~2316.
- [5] 王重庆, 李云兰, 李德昌等. 高级生物化学实验指导. 北京: 北京大学出版社, 1994. 194~198.
- [6] Vesterberg O. Biochim Biophys Acta, 1972, **257**: 11~19.
- [7] Kubata B K, Suzuki T, Horitsu H *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 531~535.
- [8] Bray M R, Clarke A J. Biochem J, 1990, **270**: 91~96.
- [9] Bray M R, Clarke A J. Eur J Biochem, 1994, **219**: 821~827.
- [10] Zhu H, Paradis W, Kreu P J *et al.* J Bacteriol, 1994, **176**: 3885~3894.
- [11] Hitomi T, Park J S, Nishijiyama M *et al.* J Biochem, 1994, **116**: 554~559.
- [12] Ozaki K, Shikata S, Kawai S *et al.* J General Microbiol, 1990, **136**: 1327~1334.
- [13] Park J S, Hitomi J, Horinouchi S *et al.* Protein Eng 1993, **6**: 921~926.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALINE XYLANASES FROM *PSEUDOMONAS* G6-2

Liu Ruitian Qu Yinbo Jiang Yinghui Gao Peiji

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** *Pseudomonas* G6-2 produced two extracellular xylanases, named XynA and XynB. The enzymes were purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex and Bio-gel P-10 chromatographies. Both enzymes were indicated to be endoxylanases, which produced oligomers of xylose from xylan and did not hydrolyze it to xylose. They had same temperature optimum (50°C) and different pH optimum (pH 7.0~9.8 for XynA and pH 7.0~8.0 for XynB). At pH 7.6 and 65°C, XynA and XynB possessed the half life of 6 min and 140 min respectively. Their activities were strongly inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ . The results of chemical modification indicated that tryptophan and carboxy group were related to active center.

**Key words** *Pseudomonas*, Alkaline xylanase, Purification, Characterization