

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00356

产碱性木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质

单志琼, 周峻岗, 周宇飞, 袁汉英, 吕红

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 从青海盐碱湖土壤中筛选到 25 株产碱性木聚糖酶的菌株, 其中编号为 QH14 的菌株产酶量达 648.79 U/mL, 纯化后比活可达 1148.56 U/mg。16 SrDNA 鉴定表明菌株 QH14 属于短小芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus* sp. QH14。从该菌株的基因组中克隆获得了碱性木聚糖酶编码基因 *XynQH14*, 并在大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3) 中获得重组表达。通过 Ni-NTA 亲和层析分离纯化后的重组 QH14 木聚糖酶比活达 700.47 U/mg。该碱性木聚糖酶的酶促反应最适温度为 60℃, 最适 pH 为 9.2; 55℃ 处理 1h 仍保持 50% 的活力; 在 pH7.0~11 条件下 37℃ 处理酶液 24 h 后均保持 80% 以上的活力, 且在 pH11 缓冲溶液中 50℃ 处理 24 h 仍保持 31.02% 的酶活, 显示了该碱性木聚糖酶较好的热稳定性和碱稳定, 提示该碱性木聚糖酶在制浆造纸、纺织等行业的应用潜力。

关键词: 木聚糖酶; 短小芽孢杆菌; 耐热性; 耐碱性

Isolation and characterization of an alkaline xylanase from a newly isolated *Bacillus* sp. QH14

SHAN Zhi-Qiong, ZHOU Jun-Gang, ZHOU Yu-Fei, YUAN Han-Ying, LV Hong

State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Twenty-five alkaline xylanase producing strains were isolated from Qinghai Lake side soil samples. Among these strains, QH14 produced 648.79 U/mL xylanase, and the enzymatic specific activity was 1148.56 U/mg after purification. This alkaline xylanase producing strain belongs to genus *Bacillus* based on 16S rDNA sequencing analysis and then was designated as *Bacillus* sp. QH14. The alkaline xylanase encoding gene, *XynQH14*, was cloned from *Bacillus* sp. QH14 and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The specific activity of the recombinant xylanase XynQH14 was 700.47 U/mg⁻¹ after purification by Ni-NTA affinity chromatography. The optimal temperature and pH of XynQH14 were 60 and pH9.2, respectively. Its activity was 50% of initial activity after incubation at 55 for 1h, 80% at pH7-11 at 37 for 24 h, and 31.02% at pH11 at 50 after 24 h, indicating that XynQH14 is thermostable and alkali-stable. These properties of XynQH14 suggest its favorable potential applications in pulp and paper industries.

Keywords: xylanase; *Bacillus* sp; thermostable; alkali-stable

收稿日期: 2011-09-14; 修回日期: 2011-02-04

基金项目: 国家高技术研究发展规划项目(863 计划)(编号: 2007AA021302, 2008AA02Z311)资助

作者简介: 单志琼, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: 09210700047@fudan.edu.cn

通讯作者: 吕红, 教授, 研究方向: 遗传学。E-mail: honglv@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2012-2-13 16:44:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120213.1644.002.html>

木聚糖是植物半纤维素的主要成份,是自然界中最为丰富的可再生资源之一。木聚糖酶(Xylanase, EC3.2.1.8)是将木聚糖催化水解成低聚木糖或木寡糖的酶系总称,包括多种木聚糖内切酶和外切酶,广泛分布于细菌、真菌、酵母、放线菌、反刍动物瘤胃、蜗牛、甲壳动物、陆地植物组织和各种无脊椎动物中,其中细菌来源的中性或碱性木聚糖酶具有较高的耐碱性和热稳定性。木聚糖酶具有广泛的应用,在造纸工业中,可应用于纸浆漂白、废纸脱墨^[1,2],在饲料行业中,木聚糖酶可降低小麦型日粮水溶性木聚糖导致的食糜黏性增高,从而提高消化酶对底物的作用效率,同时木聚糖酶可作用于不溶性非淀粉多糖,破碎植物细胞壁,并释放出营养物质^[3-6],在酿酒和食品行业中应用也非常广泛,如木聚糖酶添加到面粉中,可以改善面团的持水性、稳定性和对过度发酵的耐受性,提高入炉急胀性能,增大烘烤后面包的体积,改善面包心质地,降低面包的老化速率,延长货架寿命^[7-9]。本研究从我国青海盐碱湖边的土壤采样筛选获得了一株分泌表达碱性木聚糖酶的短小芽孢杆菌,并对该菌株产生的碱性木聚糖酶的酶学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品采集及处理

土样于2010年9月采自青海盐碱湖湖边。称取土壤样品10 g,放入含有50 mL生理盐水的三角瓶中,充分搅拌后静置,用3层灭菌的纱布过滤,再静置,上清液即土壤菌液,用于后续土壤细菌的分离筛选。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)以及质粒 pET21a(+)均为本室保存;质粒 pMD18-T 购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要试剂

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量、ExTaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;蛋白质分子质量 marker 购自 MBI Fermentas 公司;梓木木聚糖(birchwood xylan)、羧甲基纤维素钠(CMC)、普鲁兰多糖(Pullulan)及 Guar gum 等购于 Sigma 公司,地衣多糖(Lichenan)和大麦葡聚糖(β -glucan)购于

Megazyme 公司。小量质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒等购自上海博大泰克生物工程有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海申能博彩公司;镍柱琼脂糖填料(Ni-NTA agarose)购自 Novagen;10KD Amicon-Ultra 超滤管购自 Millipore; Superdex G75 (10 × 300 mm)分子筛层析柱购自 GE healthcare。

1.1.4 培养基

LB 培养基:1.0% Polypeptone(Oxoid), 0.5% Yeast Extract(Fermtech), 0.5% NaCl, pH 7.0。

活化培养基:1.0% Glucose, 0.5% Polypeptone(Oxoid), 0.5% Yeast Extract(Fermtech), 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% MgCl_2 , 5.0% NaCl, 1.0% Na_2CO_3 , pH 9.0。

筛选培养基:0.5% NaCl, 0.5% NH_4NO_3 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% MgSO_4 , 1.0% birchwood xylan, pH 9.0。

基础产酶培养基:0.5% Yeast Extract(Fermtech), 0.5% NaCl, 0.5% NH_4NO_3 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% MgSO_4 , 1.0% birchwood xylan, pH 9.0。

1.2 方法

1.2.1 土壤细菌分离

将土壤菌液稀释至适当浓度,取0.2 mL 稀释液涂布于细菌活化培养基平板,37℃培养2 d,挑取单菌落至含0.2 mL 活化培养基的96孔板中,37℃培养2 d,每孔加入50 μL 80%甘油混匀后保存于-80℃,即为土壤细菌菌种库。

1.2.2 产木聚糖酶菌种筛选

将96孔板格式化保存的土壤细菌菌种库对应接种于含200 μL /孔筛选培养基的96孔板,37℃培养2 d。对能生长的菌株采用DNS方法测定培养发酵液中的木聚糖酶活力^[10,11],初筛选取产酶活力高的菌株。对初筛高产菌株进一步划线分离,挑取单菌落用同样方法复筛,得到不同高产细菌的纯菌群。

1.2.3 细菌的16S rDNA序列分析

菌株的鉴定采用16S rDNA方法^[12-14]。通过细菌16S rDNA通用引物27F(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)和1492R(TACGGYTACCTTGTTACGACTT),从产酶菌株的基因组DNA中PCR扩增16S rDNA序列,PCR扩增条件为:95℃ 5 min; 95℃ 30s, 50℃ 30

s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用回收试剂盒回收 PCR(1.5 kb)片段, 纯化的 PCR 扩增产物送至上海桑尼生物科技有限公司测序, 测序结果通过 BLAST 在 GenBank 中进行序列比对分析, 利用 Mega3.1 软件中的 Kimura 2-parameter 距离模型, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 并用重复 1000 次的自展 (Bootstrap) 检验计算各分支的信度值。

1.2.4 菌株 QH14 产木聚糖酶的制备及纯化

菌株 QH14 产木聚糖酶粗酶液的制备: 将产木聚糖酶菌种接种于 3 mL LB 培养基中, 37 °C、230 r/min 振荡培养 24 h, 然后以 1:100 转接于基础产酶培养基中, 37 °C、230 r/min 振荡培养 48 h 后 5000 r/min 离心 15 min 收集上清。

菌株 QH14 木聚糖酶的纯化: 取 50 mL 粗酶液, 用 10KD Amicon-Ultra 超滤管 (Millipore) 浓缩至 1 mL, 然后用 15 mL 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗涤一次, 最后超滤浓缩至 1 mL。取 500 μ L 超滤浓缩样品上 Superdex G75(10 \times 300 mm) 分子筛层析柱 (GE healthcare) 进行纯化, 用 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗脱, 分管收集蛋白峰测定酶活 (U/mL), 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量 (mg/mL) 计算比活 (U/mg), 同时 SDS-PAGE 电泳分析。

木聚糖酶活性测定: 将酶液作梯度稀释, 取 5 μ L 稀释酶液与 95 μ L 含 1% 木聚糖的 20 mmol/L glycine-NaOH 溶液 (pH9.0) 混合, 60 °C 反应 10 min, 加入 100 μ L DNS 溶液终止反应, 煮沸 10 min 显色, 然后冷却后测定 570 nm 吸光值。一个酶活力单位 (IU) 定义为每分钟释放 1 μ mol 还原糖。

木糖标准曲线绘制: 配制 10 mmol/L 木糖标准溶液, 分别量取 0、20、40、80、100 μ L 木聚糖标准溶液, 用蒸馏水补至 100 μ L, 再加入 100 μ L DNS, 沸水浴 10 min, 然后冷却至室温, 在 570 nm 进行光吸收测定, 绘制木糖标准曲线。

1.2.5 木聚糖酶酶学性质分析

1.2.5.1 pH 对木聚糖酶酶活力的影响 以 20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液为缓冲体系, 配制 pH7.0 到 pH12.0 的 1% 木聚糖溶液, 然后加入适量的木聚糖酶液, 60 °C 反应 10 min 后用 DNS 法测定木聚糖酶活力。

1.2.5.2 温度对木聚糖酶酶活力的影响 取适量的

酶液加入到含 1% 木聚糖底物的 20 mmol/L 甘氨酸-NaOH (pH 9.2) 溶液中, 分别在 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、75 °C 的水浴中反应 10 min 后, 测定木聚糖酶活力。

1.2.5.3 木聚糖酶的 pH 稳定性分析 用 pH5.5~7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH7.0~11.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液分别稀释酶液, 然后放置于 37 °C 或 50 °C 水浴中, 在 pH9.2 和 60 °C 条件下测定不同处理时间后的剩余酶活力。

1.2.5.4 木聚糖酶的热稳定性分析 用 20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.2) 配置酶液, 然后分别放置在 50 °C 和 60 °C 水浴中, 每隔 10 min 取样, 在 pH 9.2 和 60 °C 条件下测剩余酶活力。

1.2.5.5 表面活性剂对木聚糖酶的影响 将酶液经适当稀释后, 取 5 μ L 酶液与 95 μ L 20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 溶液 (pH9.2) 配制的 1% 木聚糖底物混合, 同时分别加入表面活性剂 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS 及不同浓度吐温 20, 60 °C 反应 10 min 后测定木聚糖酶活力。

1.2.6 底物特异性及木聚糖水解产物分析

用 20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 溶液 (pH9.2) 配制底物 1% 桦木木聚糖溶液、1% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 溶液、1% 普鲁兰多糖 (Pullulan) 溶液、1% Lichenan、1% β -glucan、1% Guar gum, 取 5 μ L 酶液与 95 μ L 底物混合, 60 °C 反应 10 min 后加入 100 μ L DNS 溶液, 沸水浴 10 min 显色后测定 OD_{570} 吸光值。

木聚糖水解产物薄层层析分析: 5 μ L 酶液与 95 μ L 1% 桦木木聚糖底物溶液混合, 60 °C 反应 3 h 后取 2 μ L 点在 60 F254 硅胶上, 采用正丁醇: 乙酸: 水 (5: 3: 2, v/v/v) 为展开剂进行层析, 至展开剂前沿达到距板上缘约 2~3 mm 停止, 展开 3 次干燥后均匀喷上显色剂 (5% H_2SO_4 +95% ethanol), 110 °C 烘烤 5 min 显色。

1.2.7 木聚糖酶基因的克隆及表达

木聚糖酶基因的克隆: 根据已报道的 *Bacillus pumilus* 木聚糖酶基因序列, 设计 PCR 扩增简并引物 Xyl-F (ATGAATTTGARAARATTRAGRCTG) 和 Xyl-R (CCAATMAWCAGCTGRTTGGTCATC)。利用引物 Xyl-F 和 Xyl-R 从菌株 QH14 的基因组中扩增木聚糖酶基因, PCR 扩增产物插入 pMD18-T 中进行测序分析。

木聚糖酶基因表达载体的构建:根据测序得到的QH14木聚糖酶基因序列设计分别带有 *Bam*H、*Xho* 酶切位点的引物 Xylanase2-F(CGCGGATCCGAAACGATTTATGATAATAGAATAG)和 Xylanase2-R(CCGCTCGAGACGTCCAATCATCAGCTGGTTGGT)。利用 *Bam*H、*Xho* 酶切 QH14 木聚糖酶基因 PCR 产物, 连接到表达载体 pET21a(+)的 *Bam*H、*Xho* 酶切位点之间, 得到重组表达质粒 pET21a-Xylanase。转化大肠杆菌表达菌株 *E.coli* BL21(DE3), 筛选阳性重组子, 用于表达研究。

木聚糖酶基因在 *E.coli* BL21 中的诱导表达:将重组菌接入到 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37、220 r/min 培养过夜, 次日, 取 1 mL 过夜菌至 50 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37、220 r/min 培养至菌液 OD_{600nm} 为 0.4~0.6 左右, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 32、220 r/min 培养 6 h, 离心收集菌体。利用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液重悬诱导后的菌体, 超声仪破碎细胞, 高速离心后, 取上清加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液平衡好的 Ni-NTA 柱内, 4℃ 结合 30 min, 依次用 2 倍柱体积的不同咪唑浓度 (20~300 mmol/L) 的系列洗脱缓冲液 (50 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液配置) 洗脱蛋白, 收集每组分洗脱缓冲液, SDS-PAGE 检测这些组分的蛋白质的纯度。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶高产菌株的筛选

从青海湖边采集的土壤样本中筛选出产木聚糖

酶较高的细菌 25 株, 其中菌株 QH14 摇瓶发酵木聚糖酶活达 648.79 U/mL。16S rDNA 分析表明菌株 QH14 与 *Bacillus pumilus* (短小芽孢杆菌) 16S rDNA 同源率为 99%。将菌株 QH14 在固体 LB 平板上培养过夜, 菌落为圆形较大, 菌落形态白色略带乳黄色, 不透明, 表面光滑有光泽, 显微镜观察发现该菌株呈短小杆状。同时我们构建了菌株 QH14 的系统发育树, 结果表明菌株 QH14 与短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* SB3002 和 *Bacillus subtilis* GZUB14 的亲缘关系最近, 如图 1 所示, 因此初步鉴定菌株 QH14 属于 *Bacillus* 属, 并且命名为 *Bacillus* sp. QH14。

2.2 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶的纯化

将 QH14 接种于 3 mL LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 24 h, 然后以 1:100 转接于含 1% 木聚糖的基础产酶培养基中, 37℃ 振荡培养 48 h 后 5000 r/min 离心 15 min 收集发酵上清液即粗酶液。上清液中的木聚糖酶的活力达到 648.79 U/mL, 比活为 260.31 U/mg 蛋白。然而在没有添加木聚糖的培养基发酵上清液中没有检测到木聚糖酶活, 表明 QH14 木聚糖酶为底物诱导酶。粗酶液 SDS-PAGE 检测发现 20 kDa 大小处有一蛋白条带 (图 2)。在已报道的木聚糖酶中, 最低分子量为 8.5 kDa, 最大可达 145 kDa, 绝大多数细菌木聚糖酶的分子量在 20~30 kDa 之间, 因此我们推测该条带可能是 *Bacillus* sp. QH14 分泌的木聚糖酶。随后我们对 QH14 发酵上清液进行超滤浓缩 (图 2), 浓缩后的木聚糖酶的比活提高到 430.31 U/mg 蛋白。超滤浓缩后样品经 Superdex G75 分子筛纯化,

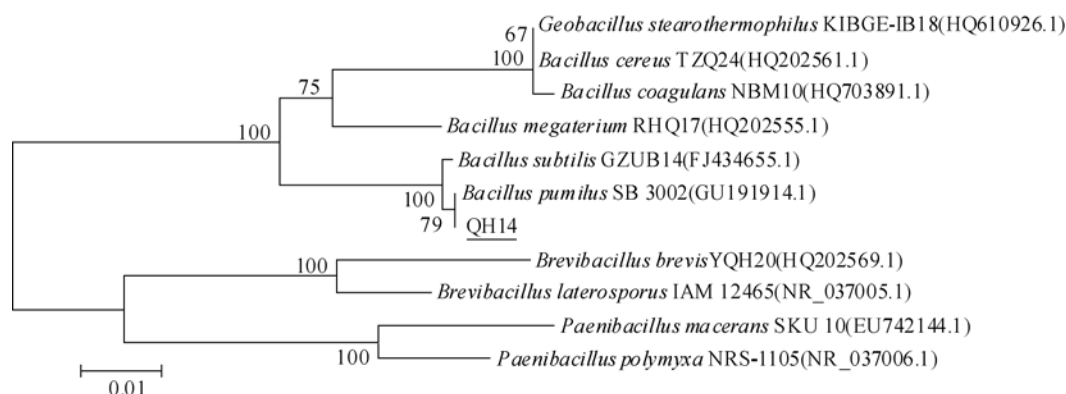


图1 木聚糖酶产酶菌株 QH14 的系统发育树

利用 Mega3.1 软件构建系统发育树, 括号内的编号代表 GenBank 序列号, 分支点的数字表示置信度值 (重复 1 000 次的结果)。

SDS-PAGE 蛋白电泳检测 22 kDa 大小的蛋白条带纯度达 90%以上(图 2), 木聚糖酶比活提高到 1148.56 U/mg 蛋白, 分别是超滤浓缩和粗酶液酶比活的 2.67 倍和 4.4 倍, 结果说明 *Bacillus* sp.QH14 分泌的 20 kDa 大小的蛋白是木聚糖酶。

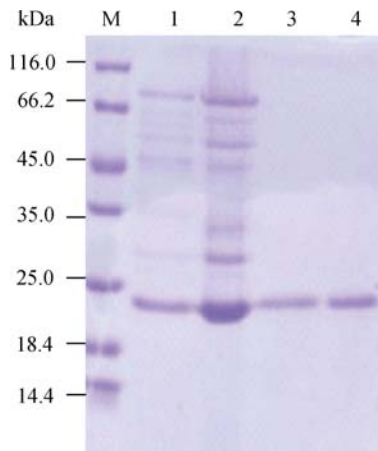


图 2 SDS-PAGE 分析 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶的表达和纯化

M: 蛋白标准分子量; 1: 发酵粗酶液; 2: 浓缩后粗酶液; 3 和 4: 纯化后酶液。

2.3 木聚糖酶的酶学特性分析

2.3.1 木聚糖酶最适反应 pH 和温度

在不同 pH 缓冲液条件下测定 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶酶活, 结果表明其最适 pH 为 9.2 左右, 如图 3A 所示。*Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶在 pH7.0~10.0 条件下具有较高的酶活, 其中在 pH10 条件下保持

73.76%的酶活, 而在 pH11.0 只有 34.84%的酶活。

Bacillus sp.QH14 木聚糖酶在 40~70 范围内有较高的酶活, 且在 60 时最高, 70 时仍能保持 59%的活性, 但 75 时的相对酶活性降低至 35%(图 3B)。

2.3.2 木聚糖酶的 pH 稳定性和热稳定性

Bacillus sp.QH14 木聚糖酶的 pH 稳定性分析发现该酶在 pH7.0~11 范围内较稳定(如图 4A), 在 pH7.0~11 条件下 37 处理酶液 24 h 后均保持 80% 以上的活力。而且, 在高温强碱(50 , pH11)条件下处理 24 h 仍保持 31.02%的活力(如图 4B)。

Bacillus sp.QH14 木聚糖酶在中温条件下较稳定, 55 和 60 分别处理 1 h 后, 木聚糖酶的残余酶活仍保持在 50%左右, 结果如图 5 所示。

2.3.3 表面活性剂对木聚糖酶的影响

表面活性剂通过界面活性作用能够提高酶与底物间的吸附性, 促进酶与底物易接触或不易接触位点迅速而紧密地接触, 因而能够提高酶的催化效率。本研究检测了几种常用表面活性剂对 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶的影响, 结果如图 6 所示。吐温 20 和 Triton X-100 对 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶具有激活作用, 当添加 1%吐温 20 时, 木聚糖酶酶活提高约 43.5%, 而 SDS 则具有明显的抑制作用。

2.4 底物特异性及水解方式分析

利用不同类型糖苷键连接多糖, 检测了 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶底物特异性, 结果表明该酶能够

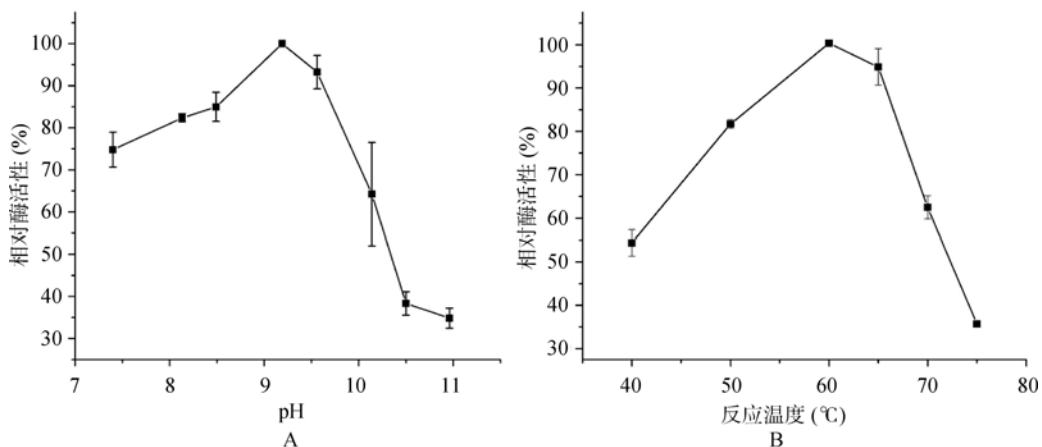


图 3 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶酶学特性分析

A: *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶的最适 pH; B: *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶的最适温度。

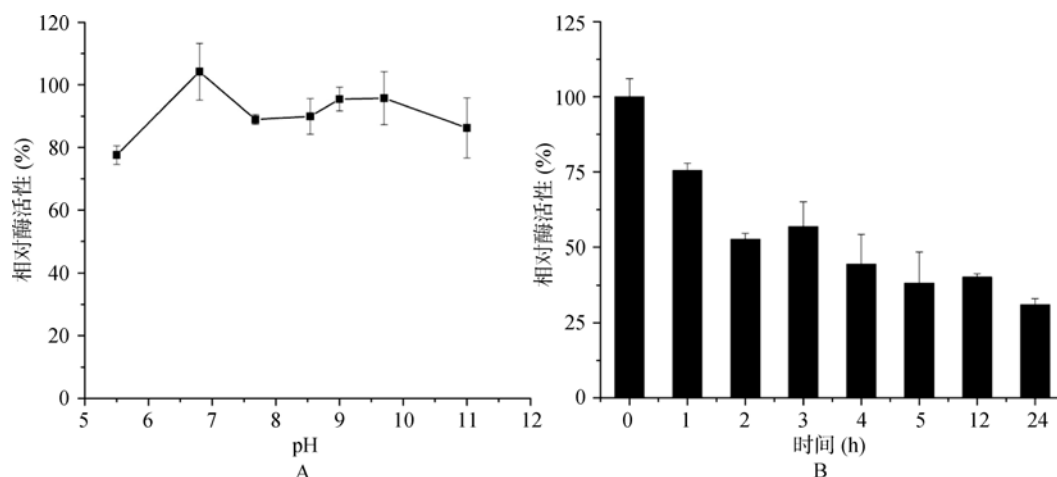


图4 *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶的 pH 稳定性

A: *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶置于 37 不同 pH 的 20mmol/L glycine-NaOH buffer 中处理 24h, 取样于最适条件测剩余酶活, 未处理酶活设为 100%; B: *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶置于 50 及 pH11 glycine-NaOH buffer 中处理。如图时间取样于最适条件测剩余酶活。0 时刻设为 100%。

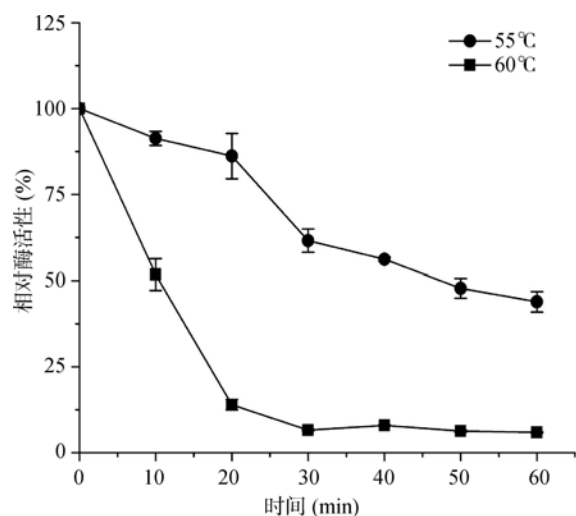


图5 *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶的热稳定性

Bacillus sp. QH14 木聚糖酶置于 55°C、60°C 处理, 每隔 10 min 取样于最适条件测剩余酶活, 0 时刻设为 100%。

水解木聚糖、地衣多糖和大麦葡聚糖, 但不能降解普鲁兰多糖、纤维素、瓜尔胶(图 7A), 其中水解木聚糖的活性最高。为了进一步分析 *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶水解方式, 用 TLC 分析了 *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶水解木聚糖的产物, 发现木聚糖酶水解 3h 后, 有不同聚合度的木寡糖产生(图 7B), 结果表明该酶是通过内切方式降解木聚糖。

2.5 *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶基因的克隆及重组表达

通过简并引物从 *Bacillus sp.* QH14 的基因组扩

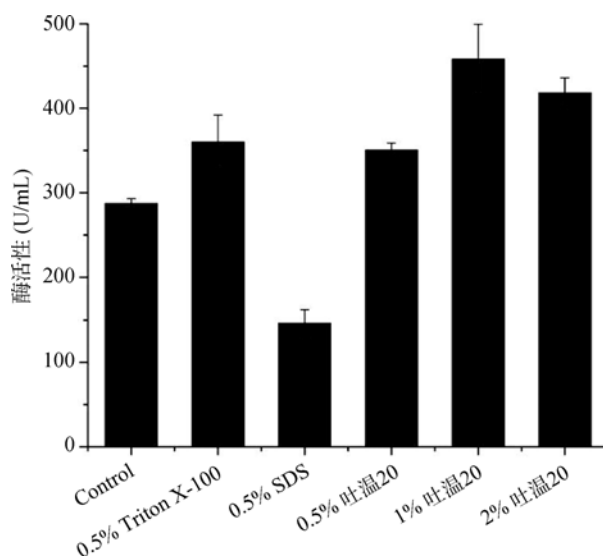


图6 表面活性剂对木聚糖酶活性的影响

Control 为不添加表面活性剂时, *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶的酶活; 其余为添加相应浓度表面活性剂时, *Bacillus sp.* QH14 木聚糖酶的酶活。

增到 700 bp 左右条带(图 8A), 序列分析表明该基因的编码区为 687 bp, 编码了 229 个氨基酸, 前 27 个残基是预测的分泌信号肽, 与 *Bacillus pumilus* 来源的木聚糖酶基因序列(GenBank 登录号: EU421717.1) 同源性最高, 相似性达到了 99%, 与 *Bacillus pumilus* SAFR-032 来源的木聚糖酶基因序列(GenBank 登录号: CP000813.1) 相似性 96%, 并命名为 *XynQH14*。通过把 *XynQH14* 插入到表达载体 pET21a(+) 中, *XynQH14* 在表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中得到了

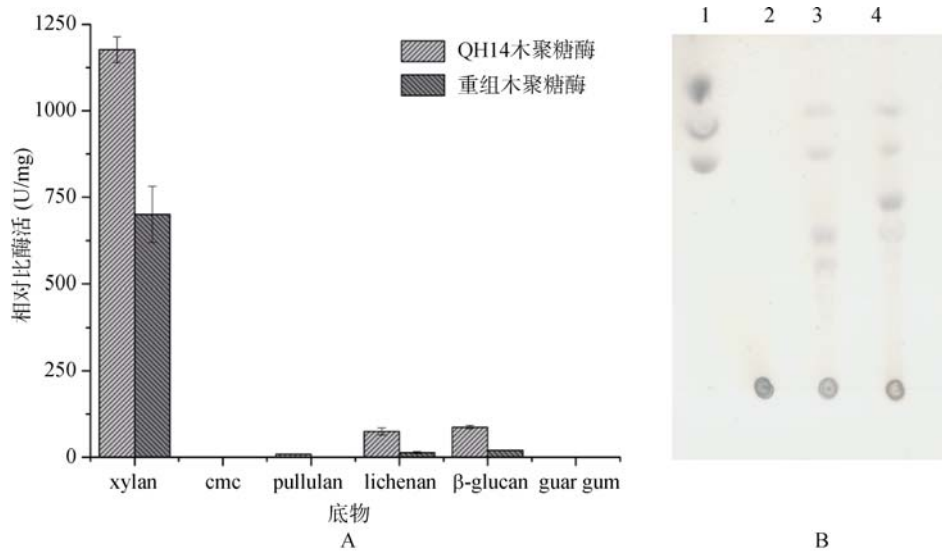


图 7 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶底物特异性及水解模式的 TLC 分析

A: *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶底物特异性分析; B: *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶水解模式的 TLC 分析。1: 木糖、木二糖、木三糖, 2: 1%梓木木聚糖底物, 3: 重组木聚糖酶 3h 水解产物, 4: QH14 木聚糖酶 3h 水解产物。

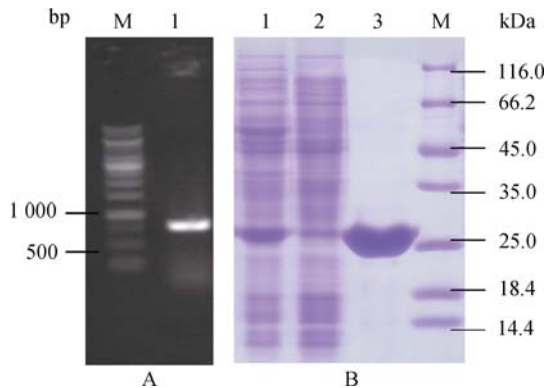


图 8 木聚糖酶基因 QH14 的扩增及在大肠杆菌中的重组表达和纯化

A: 木聚糖酶基因的扩增。M: 1 kb DNA 标准分子量, 1: PCR 扩增产物; B: 木聚糖酶基因 QH14 在大肠杆菌中的重组表达及纯化。1: IPTG 诱导后重组表达菌株细胞裂解菌液上清, 2: IPTG 诱导前重组表达菌株细胞裂解液上清, 3: 纯化的重组木聚糖酶 QH14, M: 蛋白标准分子量。

很好的重组表达(图 8B), 重组蛋白相对分子质量约为 25 kDa。前面已证实*Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶约 22 kDa, 但在重组克隆到PET21a载体过程中, 重组木聚糖酶的N端增加了 14 个氨基酸(载体上的T7 tag)、C端增加了 6 个His标签, 因此重组表达木聚糖酶的分子量大小与理论值相符。重组木聚糖酶纯化后酶活高达 1766.97 U/mL, 比活达 700.47 U/mg(图 7A), 比原始酶低, 这可能与重组酶N端融合了非本

身的多个氨基酸以及C末端融入了His标签对酶活性构象有一定影响有关^[15,16]。重组表达的碱性木聚糖酶的酶学特性与天然菌株*Bacillus* sp. QH14 产生的木聚糖酶的特性一致, 同时底物专一性强(图 7A)。

Bacillus sp. QH14 木聚糖酶的酶学特性在耐热性和耐碱性方面均优于已有酶学性质报道的同源度最高(同源度 88%)的碱性木聚糖酶XynBYG (GenBank登录号ACH67614.1)^[17]。比对两种木聚糖酶氨基酸序列(图 9), 可以看出QH14 木聚糖酶的精氨酸和谷氨酸含量高于XynBYG, 而目前已有众多研究证实精氨酸和谷氨酸的含量与热稳定性及碱稳定性有关^[18~21]。

3 讨论

木聚糖酶可广泛应用于食品、饲料、医药、能源、造纸、纺织等行业。近年来, 碱性木聚糖酶在造纸工业中更是日益显示出了它巨大的应用潜力, 采用碱性木聚糖酶进行生物漂白, 能减少化学漂白剂的用量和有毒化学物质的排放量, 是一项环境友好技术, 而且能显著提高纸浆白度, 改善纸张性能。多数细菌能够产生中性或碱性木聚糖酶, 这些酶在耐碱性和热稳定性方面要优于真菌来源的木聚糖酶, 是近来国内外碱性木聚糖酶筛选、研究的重点。已

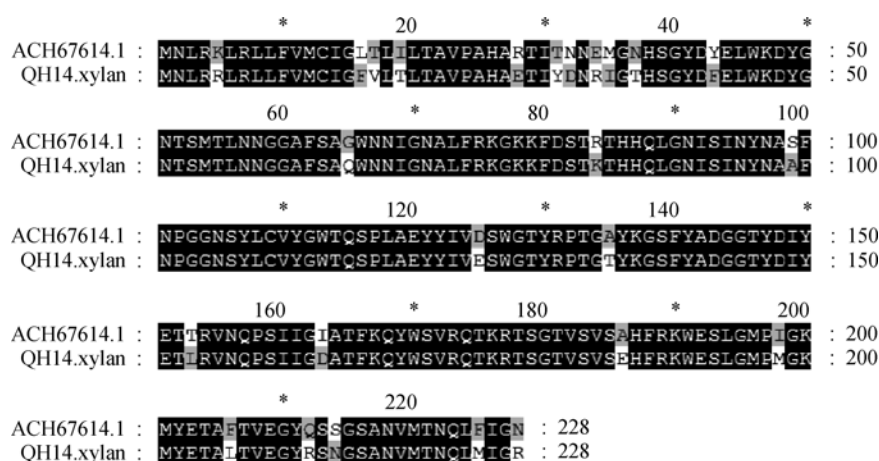


图 9 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶氨基酸序列与木聚糖酶氨基酸序列 ACH67614.1 比对

利用 Vector NTI Suite 软件进行序列比对分析, ACH67614.1 木聚糖酶谷氨酸和精氨酸含量分别为 3.07%和 4.39%, *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶谷氨酸和精氨酸含量分别为 3.95%和 5.26%。

报道的绝大多数细菌所产木聚糖酶的最适温度通常都在 50 左右, 最适 pH 值在中性范围内^[22-29]。

在纸浆漂白过程中, 纸浆温度一般在 60 左右, pH 为 9.0 左右, 因此用于生物漂白的木聚糖酶既要具有耐碱性又要在 50~60 温度下具有稳定酶活的特性。本研究在青海盐碱湖采集样品, 采用唯一碳源法筛选到 25 株高产耐碱嗜高温木聚糖酶的菌株, 其中编号 QH14 的一株短小芽孢杆菌产木聚糖酶最高酶活可达 648.79 U/mL, 具有良好的温度稳定性和适应性, 40~75 稳定, 同时高度耐碱, 在 pH7.0~11 范围内稳定。通过 BLAST 进行氨基酸序列比对, 与 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶同源度高的木聚糖酶氨基酸序列依次为 ACA00160.1 (99%)、AAX54695.1(99%)、YP_001487058.1(98%)、AAF32359.1(98%)、ZP_03055362.1(90%)、P00694.2(90%)及 ACH67614.1(89%), 其中尚只有 ACH67614.1 (89%)有酶学属性及酶相关功能报道^[17]。而 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶在耐热性和耐碱性方面均优于碱性木聚糖酶 XynBYG(GenBank 登录号: ACH67614.1), 这可能与 QH14 木聚糖酶的精氨酸和谷氨酸含量高于 XynBYG 有关, 分析原因一方面氢键是稳定蛋白折叠构象的一个重要因素, 而耐热酶中往往形成极性氢键的氨基酸残基(如谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸)总数量出现增加, 可使靠近蛋白催化残基的 2 个-桶状域(barrel domains)之间, 以及 C-末端螺旋与 N-末端域之间的连接更紧密^[30]; 另一方面离子对

(主要为盐桥, salt bridge)是蛋白构象最有力的稳定因素, 而胍盐基团的电荷共振为精氨酸形成 1 个以上的盐桥提供了可能性, 同时还成倍增加了与主链羧基氧之间的氢键^[30], 这些都增强蛋白结构的稳定性。*Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶这些优良的酶学特性非常适用于造纸、纺织工业生物漂白过程。

为了避免在漂白过程中对纸浆的损害, 使用的木聚糖酶不能具有降解纤维素的酶活。*Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶的底物特异性较高, 能作用木聚糖的 β -1,4 木糖苷键, 但不能水解纤维素的 β -1,4 葡萄糖键和瓜尔胶的 β -1,4 甘露糖键, 同时能水解地衣多糖和大麦葡聚糖中的 β -1,3/1,4 葡萄糖苷键, 这可能与 β -1,3 和 β -1,4 交替连接形成的地衣多糖和大麦葡聚糖在空间构象上与木聚糖相似, 因而一些木聚糖酶能够同时识别这两种类型的底物^[31]。此外, 纸浆制造过程常需要添加多种表面活性剂, 而一些表面活性剂能够提高酶解过程的催化效率, 因此我们分析了表面活性剂对 *Bacillus* sp. QH14 木聚糖酶的影响, 结果发现添加 1%吐温 20 能有效提高木聚糖酶酶活, 这一性质有利于 *Bacillus* sp.QH14 木聚糖酶在造纸工业中的应用。

参考文献(References):

- [1] Gupta S, Bhushan B, Hoondal GS. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(2): 325-334. DOI

- [2] Ziaie-Shirkolaee Y, Talebizadeh A, Soltanali S. Comparative study on application of *T. lanuginosus* SSBP xylanase and commercial xylanase on biobleaching of non wood pulps. *Bioresource Technol*, 2008, 99(16): 7433–7437. [DOI](#)
- [3] Hew LI, Ravindran V, Mollah Y, Bryden WL. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech*, 1998, 75(2): 83–92. [DOI](#)
- [4] Almirall M, Francesch M, Perez-Vendrell AM, Brufau J, Esteve-Garcia E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and beta-glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J Nutr*, 1995, 125(4): 947–955. [DOI](#)
- [5] Choct M, Annison G. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora. *Br Poult Sci*, 1992, 33(4): 821–834. [DOI](#)
- [6] Inbarr J, Puhakka J, Bakker JGM, van der Meulen J. β -glucanase and xylanase activities in stomach and ileum of growing pigs fed wheat bran based diets with and without enzyme treatment. *Arch Tierernahr*, 1999, 52(3): 263–274. [DOI](#)
- [7] Romanowska I, Polak J, Bielecki S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(6): 665–671. [DOI](#)
- [8] Autio K, Härkönen H, Parkkonen T, Frigård T, Poutanen K, Siika-aho M, Åman P. Effects of purified endo- β -xylanase and endo- β -glucanase on the structural and baking characteristics of rye doughs. *Food Sci Technol*, 1996, 29(1–2): 18–27. [DOI](#)
- [9] Camacho NA, Aguilar OG. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. *Appl Biochem Biotech*, 2003, 104(3): 159–171. [DOI](#)
- [10] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 1992, 23(3): 257–270. [DOI](#)
- [11] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426–428. [DOI](#)
- [12] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697–703. [DOI](#)
- [13] von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21(3): 213–229. [DOI](#)
- [14] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong SX, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ, SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953–1966. [DOI](#)
- [15] 李业. 谷氨酰胺合成酶的表达、纯化、酶学性质及腺苷化现象的研究[学位论文]. 北京: 清华大学, 2009. [DOI](#)
- [16] Liu D, Schmid RD, Rusnak M. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm—a screening system for a frequently used biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 1024–1032. [DOI](#)
- [17] Wang J, Zhang WW, Liu JN, Cao YL, Bai XT, Gong YS, Cen PL, Yang MM. An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(7): 3297–3302. [DOI](#)
- [18] Turunen O, Vuorio M, Fenel F, Leisola M. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1, 4- β -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng*, 2002, 15(2): 141–145. [DOI](#)
- [19] Masui A, Fujiwara N, Imanaka T. Stabilization and rational design of serine protease AprM under highly alkaline and high-temperature conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(10): 3579–3584. [DOI](#)
- [20] Mrabet NT, van den Broeck A, Van den Brande I, Stanssens P, Laroche Y, Lambeir AM, Matthijssens G, Jenkins J, Chiadmi M, van Tilbeurgh H, Rey F, Janin J, Quax WJ, Lasters I, Maeyer MD, Wodak SJ. Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochem*, 1992, 31(8): 2239–2253. [DOI](#)
- [21] Shirai T, Suzuki A, Yamane T, Ashida T, Kobayashi T, Hitomi J, Ito S. High-resolution crystal structure of M-protease: phylogeny aided analysis of the high-alkaline adaptation mechanism. *Protein Eng*, 1997, 10(6): 627–634. [DOI](#)
- [22] Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. A thermostable alkaline active endo- β -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme Microb Tech*, 2006, 39(7): 1492–1498. [DOI](#)

- [23] Pérez-Avalos O, Sánchez-Herrera LM, Salgado LM, Ponce-Noyola T. A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr Microbiol*, 2008, 57(1): 39–44. [DOI](#)
- [24] Maalej I, Belhaj I, Masmoudi NF, Belghith H. Highly Thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Appl Biochem Biotech*, 2009, 158(1): 200–212. [DOI](#)
- [25] Bourgois TM, Nguyen DV, Sansen S, Rombouts S, Beliën T, Fierens K, Raedschelders G, Rabijns A, Courtin CM, Delcour JA, Van Campenhout S, Volckaert G. Targeted molecular engineering of a family 11 endoxylanase to decrease its sensitivity towards *Triticum aestivum* endoxylanase inhibitor types. *J Biotechnol*, 2007, 130(1): 95–105. [DOI](#)
- [26] Damiano VB, Ward R, Gomes E, Alves-Prado HF, Da Silva R. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl Biochem Biotech*, 2006, 129(1–3): 289–302. [DOI](#)
- [27] Manikandan K, Bhardwaj A, Gupta N, Lokanath NK, Ghosh A, Reddy VS, Ramakumar S. Crystal structures of native and xylosaccharide-bound alkali thermostable xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27: structural insights into alkalophilicity and implications for adaptation to polyextreme conditions. *Protein Sci*, 2006, 15(8): 1951–1960. [DOI](#)
- [28] Li N, Shi PJ, Yang PL, Wang YR, Luo HY, Bai YG, Zhou ZG, Yao B. Cloning, expression, and characterization of a new *Streptomyces* sp. S27 xylanase for which xylobiose is the main hydrolysis product. *Appl Biochem Biotech*, 2009, 159(2): 521–531. [DOI](#)
- [29] Dutta T, Sengupta R, Sahoo R, Sinha Ray S, Bhattacharjee A, Ghosh S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44(2): 206–211. [DOI](#)
- [30] Feller G, Arpigny JL, Narinx E, Gerday CH. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118(3): 495–499. [DOI](#)
- [31] Shi PJ, Tian J, Yuan TZ, Liu X, Huang HQ, Bai YG, Yang PL, Chen XY, Wu NF, Yao B. *Paenibacillus* sp. Strain E18 bifunctional xylanase-glucanase with a single catalytic domain. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(11): 3620–3624. [DOI](#)

•综合信息•

中国地衣学现状与潜力——祝贺魏江春院士八旬地衣学文集

刘华杰 等

定价: 118 元 书号: 978-7-03-032529-7/Q · 2791

内容简介

本书是研究生物资源、植物区系地理、系统发育生物学、生物多样性、环境保护的重要参考资料, 适合从事微生物学、植物学、生态学、农林牧和医药研究的科研工作者, 以及大专院校有关师生教学、科研参考之用。

本书介绍了中国科学院院士魏江春先生的简历及其学术活动, 收录了来自全国 12 家单位的 19 位撰稿人为第一作者的 23 篇学术文章。研究内容涵盖了地衣学的绝大多数研究领域, 是中国地衣学研究的最新成果和近期研究进展的总结。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇

电话: 010-64017301 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com