

卷须链霉菌木聚糖酶 B 的纯化

丁长河 江正强 李里特 李秀婷 张 艳

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘 要 为了进一步研究链霉菌木聚糖酶的酶学性质,探讨了卷须链霉菌一种木聚糖酶的纯化方法。粗酶液经硫酸铵饱和度为 20%~50%的分级沉淀和 Q-sephrose FF 离子交换柱层析 2 步纯化,得到一种电泳纯的木聚糖酶,定名为 XynB;酶蛋白纯化倍数达到 10.0 倍,酶活力回收率达到 24.0%。SDS-PAGE 结果表明,该木聚糖酶的分子质量为 22.0 ku,属于低分子质量的木聚糖酶。

关键词 卷须链霉菌;木聚糖酶;纯化;硫酸铵沉淀;离子交换层析

中图分类号 Q 55

文章编号 1007-4333(2003)06-0001-04

文献标识码 A

Purification of XynB from *Streptomyces cirratus*

Ding Changhe, Jiang Zhengqiang, Li Lite, Li Xiuting, Zhang Yan

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract To study further the property of xylanases from *Streptomyces*, purification of a xylanase from *Streptomyces cirratus* D-10 was investigated. A xylanase, named XynB, was purified by stepwise ammonium sulphate precipitation (20% - 50% saturation) and Q-sephrose FF ion exchange chromatography. After two-step treatment, tenfold purification was obtained with 24.0% activity recovery. The purified XynB showed as a single protein band on SDS-PAGE that molecular weight of the enzyme was estimated to be 22.0 ku by SDS-PAGE, and belonged to one of lower molecular weight xylanases.

Key words *Streptomyces cirratus*; xylanase; purification; ammonium sulphate precipitation; ion exchange chromatography

微生物木聚糖酶的酶系一般比较复杂,大部分微生物都可产生 1 种以上的木聚糖酶。链霉菌一般产生 2 种以上木聚糖酶:分子质量为 20~27 ku 的低分子质量木聚糖酶和分子质量为 30~55 ku 的高分子质量木聚糖酶。虽然同一菌株所产木聚糖酶的物理和化学性质有很多是相近的,但是仍然存在显著的差异^[1~3]。

从文献报道可知,纯化酶的方法很多,最常用的有硫酸铵沉淀、离子交换层析、分子筛层析和亲和层析等。国内对木聚糖酶的纯化研究大多集中于黑曲霉、木霉等真菌产木聚糖酶,也有少量的对假单胞菌、芽孢杆菌等细菌产木聚糖酶纯化的报道^[4~10],但尚未见到链霉菌木聚糖酶纯化的研究报道。一般

而言,需要几种方法的组合,才能由木聚糖酶粗酶得到纯酶,但也有经过简单的 1 步或 2 步纯化即得到纯酶的报道。

有研究结果表明链霉菌(*Streptomyces cirratus* D-10)产生的木聚糖酶粗酶分解木聚糖的水解产物以木二糖为主,但作用机理尚待进一步研究。本研究采用硫酸铵沉淀和离子交换柱层析纯化卷须链霉菌所产的木聚糖酶,得到一种电泳纯的木聚糖酶,为进一步研究纯酶的性质奠定了基础。

1 实验材料与方法

1.1 菌种、主要仪器与试剂

菌种为卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus* D-

收稿日期:2003-05-10

基金项目:国家“十五”攻关课题(2001BA708B04-06),教育部研究重点项目

作者简介:丁长河,博士研究生;江正强,博士,副教授,主要从事酶与发酵工程方面的研究

10) ,是本实验室筛选并保存的菌种。

电泳仪和电泳槽 ,AE-6400 Dual Mini Slab Kit , ATTO company , Japan ;恒流泵及部分自动收集器 ,上海沪西仪器厂。

低分子质量标准蛋白质 Pharmacia Biotech , No. 11-B-036-20 ;离子交换剂为 Q-sepharose Fast flow , Pharmacia Biotech。

1.2 木聚糖酶粗酶液的制备

液体摇瓶发酵培养基 :玉米芯木聚糖 15 g ,酵母提取物 (Oxiod) 3 g ,蛋白胨 10 g , KH_2PO_4 10 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g , Tween 80 5 g ,定容至 1 L。

摇瓶培养条件 :250 mL 三角瓶装液量 50 mL ,接入 0.5 cm^2 平板培养基上生长 5~6 d 的孢子 ,旋转式摇床 140 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 32 振荡培养 7 d ,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min ,取上清液待用。

1.3 木聚糖酶活力及蛋白质含量的测定

木聚糖酶活力的测定参照文献 [11] (DNS 法) 。以质量分数为 1% 的梓木木聚糖溶液为底物 (用 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 5.3 的柠檬酸钠缓冲液溶解) 。酶溶液也用相同的缓冲液适当稀释。0.9 mL 底物溶液加 0.1 mL 稀释过的酶溶液 55 反应 5 min ,添加 1 mL DNS 试剂终止反应 ,沸水中煮沸 15 min ,再加 1 mL 质量分数为 40% 的四水合酒石酸钾钠溶液 ,流动水冷却 15 min ,540 nm 处测吸光度。测定过程以木糖做标准。在以上条件下 ,以每 min 产生相当于 1 μmol 木糖的还原糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U) 。本文中酶活力数据均为 2 次以上实验结果的平均值。

蛋白质含量的测定 [12] :以牛血清白蛋白为标准 ,测量 280 nm 处的吸光度 ,计算蛋白质含量。

1.4 木聚糖酶的纯化方法

1) 硫酸铵分级沉淀。在室温 (20 左右) 条件下 ,将硫酸铵制成饱和硫酸铵溶液 ,保留一些硫酸铵晶体为不溶解状态 ,并平衡 1~2 d ,备用。粗酶液若干 ,缓慢搅拌 ,同时缓慢添加饱和硫酸铵溶液至 10% 饱和度 ,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液 ,测上清液酶活力和蛋白质含量 ;再缓慢搅拌上清液并添加饱和硫酸铵溶液至 20% 饱和度。重复以上操作至上清液硫酸铵饱和度分别达 30% ,40% ,50% 和 70% ,测量各饱和度条件下离心后上清液的木聚糖酶活力和蛋白质含量。

2) 离子交换柱层析 [9] 。层析条件 :离子交换剂 Q-sepharose Fast Flow ,柱直径 10 mm ,柱长 60 mm ;

用梯度混合仪梯度洗脱离子交换柱 ,起始洗脱液 Tris-HCl 浓度 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 8.5 ;终止洗脱液 NaCl 浓度 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液溶解 ;洗脱速度 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分部收集每管 180 滴。

1.5 酶纯度的鉴定及分子质量的测定 [8]

分离凝胶质量分数为 12.5% ,以 Pharmacia 低分子质量标准蛋白质为标准 ,按照 Laemmli (1970) 方法进行蛋白质电泳。电泳条件为恒电流 30 mA ,电泳结束后用考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue G250) 染色。根据样品和标准蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 图 ,测定样品和标准蛋白质的相对迁移率 R_f 值 ,用标准蛋白质的 R_f 值对其分子质量的对数做标准曲线。由纯酶样品的 R_f 值 ,可以求得分子质量 m 。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵分级沉淀

图 1 示出不同硫酸铵饱和度条件下上清液木聚糖酶活力和蛋白质质量浓度的变化曲线。可以看出 ,当粗酶液硫酸铵饱和度低于 20% 时 ,酶活力下降较缓慢 ;其饱和度为 20%~50% 时 ,酶活力下降较快 ;其饱和度为 50%~70% 时 ,酶活力下降速度又变得缓慢 ;当其饱和度为 70% 时 ,木聚糖酶活力降为 0。粗酶液中蛋白质质量浓度为 58.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,添加饱和硫酸铵溶液至硫酸铵饱和度为 10% 时 ,蛋白质质量浓度快速下降至 41.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;继续添加饱和硫酸铵溶液至硫酸铵饱和度分别达 20% ,30% ,40% ,50% 和 70% ,蛋白质质量浓度呈缓慢下降趋势。

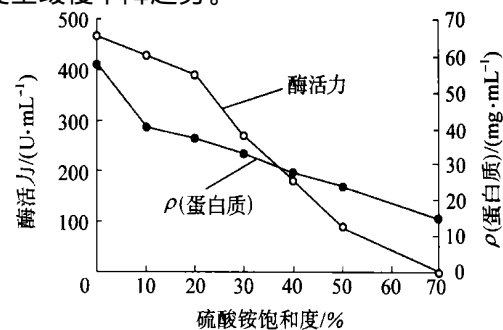


图 1 不同硫酸铵饱和度条件下上清液木聚糖酶活力和蛋白质质量浓度 (蛋白质) 的变化曲线

Fig. 1 Changes of xylanase activity and protein content after different concentration ammonium sulphate precipitation

综合考虑硫酸铵沉淀过程中木聚糖酶活力和蛋白质质量浓度的变化情况,选取粗酶液硫酸铵饱和度 20%和 50%做为本研究中硫酸铵分级沉淀的起始和终止饱和度。

硫酸铵分级沉淀的操作步骤为:粗酶液加饱和硫酸铵溶液至 20%硫酸铵饱和度,缓慢搅拌充分混合,再于 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,弃去沉淀取上清液;上清液再添加饱和硫酸铵溶液至 50%硫酸铵饱和度,缓慢搅拌充分混合,再于 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,弃去上清液,收集沉淀并用少量 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.5 Tris-HCL 缓冲液溶解备用。粗酶液经过硫酸铵分级沉淀之后,纯化后的酶活力为粗酶液总酶活的 63.5%,蛋白质质量为粗酶液的 23.3%,纯化倍数为 2.7 倍。

2.2 离子交换柱层析

离子交换柱层析的最佳实验条件是根据酶蛋白质的电学性质制定的,且要考虑溶液 pH 值与酶蛋白质的等电点不要相差太远。

图 2 示出木聚糖酶的 Q-sepharose 离子交换柱层析图。第 9~11 管的位置出现一个尖锐的蛋白质峰,该峰与木聚糖酶的活力峰相一致,显示该蛋白质为木聚糖酶。SDS-PAGE 电泳结果(图 3)显示该木聚糖酶为单一电泳带,即达到了电泳纯,命名为 XynB。这样通过 1 步离子交换柱层析就得到了电泳纯的木聚糖酶。

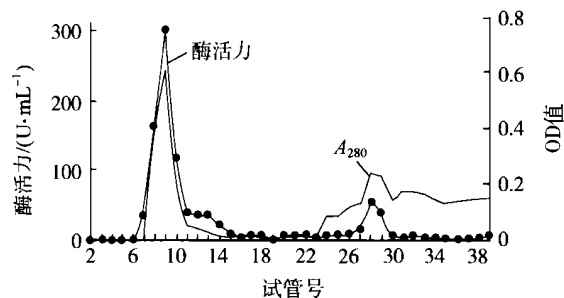


图 2 木聚糖酶 Q-sepharose 离子交换柱层析图

Fig. 2 Q-sepharose FF ion exchange chromatography of the enzyme protein

另外,值得注意的是,在图 2 的 30 管位置也出现了酶的活力峰,可能是另一个木聚糖酶。因其蛋白质质量和酶活力都较小,未做进一步研究。

木聚糖酶的纯化总结见表 1。可以看出,粗酶液经过硫酸铵分级沉淀,酶活力回收率达到 63.5%,纯化倍数 2.7 倍。经透析后上离子交换柱层析,酶活力回收率为 24.0%,纯化倍数 10.0 倍。

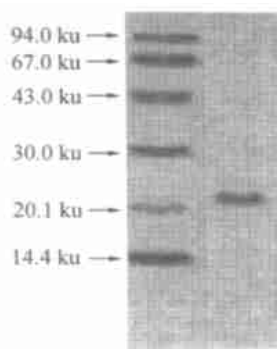
表 1 木聚糖酶 XynB 纯化表

Table 1 Summary of XynB purification

纯化步骤	蛋白质质量/mg	酶总活力/U	比活力/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	116.8	941.4	8.06	1.0	100
硫酸铵沉淀	27.2	597.8	22.00	2.7	63.5
离子交换层析	2.8	226.0	80.70	10.0	24.0

2.3 酶纯度的鉴定和分子质量的测定

图 3 示出纯酶的 SDS-PAGE 电泳图。可以看出,离子交换柱层析后的木聚糖酶峰在 SDS-PAGE 电泳图中显示为单一蛋白质带,表明该酶已经达到电泳纯。



标准蛋白质:Lactalbumin (14.4 ku); Trypsin Inhibitor (20.1 ku); Carbonic Anhydrase (30 ku); Ovalbumin (43 ku); Albumin (67 ku); Phosphorylase b (94 ku).

图 3 纯酶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of the purified XynB

因纯酶分子质量偏低,取 4 种分子质量较小的标准分子质量蛋白质及其各自相对迁移率 R_f 做图,结果见图 4。将纯酶的相对迁移率 0.574 代入标准分子质量蛋白质质量 m 的对数与相对迁移率 R_f 的回归方程:

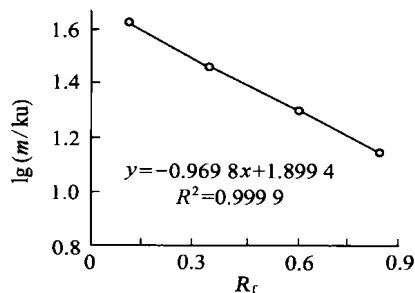


图 4 SDS-PAGE 测定 XynB 的分子质量

Fig. 4 Molecular weight determination of XynB by SDS-PAGE

$$\lg m = -0.9698 R_f + 1.8994$$

计算得到的木聚糖酶分子质量为 22.0 ku。该酶属于低分子质量木聚糖酶,与其他链霉菌所产低分子质量木聚糖酶的分子质量相近^[1~3]。

3 结 论

1)对卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus* D-10)木聚糖酶粗酶而言,硫酸铵分级沉淀仍然是一种高效率的初步纯化方法。选取硫酸铵饱和度 20%~50%为分级沉淀条件,分级沉淀后木聚糖酶的回收率可达到粗酶的 63.5%,纯化倍数为 2.7 倍。经透析后上离子交换柱层析,回收率为 24%,纯化倍数 10.0 倍。经 2 步纯化得到一种电泳纯的木聚糖酶,命名为 XynB。

2)SDS-PAGE 分析表明该木聚糖酶的分子质量为 22.0 ku,该酶属于低分子质量木聚糖酶,与很多微生物所产低分子质量木聚糖酶的分子质量相近。

参 考 文 献

- [1] Lumba F L, Penninckx M J. Characterization of multiple forms of α -xylanase produced by a *Streptomyces* sp. growing on lingo-cellulose [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36: 733~738
- [2] He L, Bicherstaff G H, Paterson A, et al. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions[J]. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 13~18
- [3] Elegir G, Szakacs G, Jeffries T W. Purification, characterization, and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. Stain B-12-2 [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2609~2615
- [4] 陈红歌,朱 静,梁改芹,等. 黑曲霉木聚糖酶的纯化与性质[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 111~116
- [5] 邹永龙,桑月婵,彭建新,等. α -1,4-内切木聚糖酶的分离纯化及其性质 [J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1212~1216
- [6] 江均平,严自正,张树政. 海藻曲霉木聚糖酶的纯化及末端序列研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(2): 159~164
- [7] 刘瑞田,曲音波,姜英辉,等. 假单孢菌碱性木聚糖酶的纯化与性质[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 132~136
- [8] 陈士成,曲音波,刘相梅,等. 短小芽孢杆菌 A-30 耐碱性木聚糖酶的纯化及性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(5): 698~701
- [9] 毛连山,宋向阳,勇 强,等. 里氏木霉木聚糖酶的分离纯化及其性质[J]. 南京林业大学学报, 2002, 26(6): 13~16
- [10] 江正强,李里特,林 清,等. 海栖热孢菌极端耐热木聚糖酶 B 的提纯[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(6): 32~36
- [11] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. Laboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. J Biotechnol, 1992, 23: 257~270
- [12] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2001. 189~210