

地芽孢杆菌 Y565-5 分离鉴定及其木糖异构酶基因 *xylA* 的克隆表达和酶学性质

张洁^{1,2} 黄志勇^{2*} 王钦宏² 王永莉³ 王硕¹

(1. 天津科技大学 食品营养与安全重点实验室 天津 300457)

(2. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300108)

(3. 中国科学院兰州地质所 甘肃 兰州 730000)

摘要: 从甘肃玉门油田地表土中分离到一株嗜热木糖利用菌, 地芽孢杆菌 Y565-5。利用 PCR 方法从该菌株中克隆得到一个木糖异构酶基因, *xylA*。该基因开放阅读框长 1 182 bp, 编码 394 个氨基酸, XylA 氨基酸序列与 *Geobacillus* sp. Y412MC52 相似性达到 99%。将 *xylA* 基因克隆到原核表达载体 pET-28a(+)上, 得到重组质粒 pET-28a(+)-*xylA*, 然后将此重组质粒转化至 BL21(DE3)中, 经 IPTG 诱导后, 通过 SDS-PAGE 电泳检测出明显的 45 kD (相对分子质量)特异性蛋白质条带, 并且通过半胱氨酸吡唑法检测出表达产物具有木糖异构酶的活性。对其酶学性质的研究发现, XylA 最适温度为 90 °C, 最适 pH 值为 8.0。

关键词: *Geobacillus* sp. Y565-5, 木糖异构酶, 克隆, 表达

Cloning, expression and characterization of xylose isomerase, XylA from *Geobacillus* sp. Y565-5

ZHANG Jie^{1,2} HUANG Zhi-Yong^{2*} WANG Qin-Hong² WANG Yong-Li³
WANG Shuo¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300108, China)

(3. Lanzhou Institute of Geology, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Xylose-utilizing and thermophilic *Geobacillus* sp. Y565-5 was isolated from surface soil of an oilfield in Yumen Town, Gansu Province, China. A xylose isomerase (XylA) gene was cloned from the strain by PCR. The open reading frame of *xylA* (1 182 bp) encoded a protein of 394 amino acids, which showed high sequence homology (99% identity) with that of *Geobacillus* sp. Y412MC52. The intact coding region was subcloned into pET28a(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3).

基金项目: 纤维素乙醇高温发酵与生物炼制子课题(No. KSCX1-YW-11E); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-Q05-05)

* 通讯作者: Tel: 86-22-84861931; 信箱: huang_zy@tib.cas.cn

收稿日期: 2010-12-03; 接受日期: 2011-02-28

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

The molecular weight of the recombinant protein was 45 kD based on SDS-PAGE and its xylose isomerase activity was detected through cysteine welts thiazole method after the induction of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The optimum temperature and pH for the partially purified recombinant XylA activity were 90 °C and pH 8.0, respectively.

Keywords: *Geobacillus* sp. Y565-5, Xylose isomerase, Cloning, Expression

木糖异构酶又称葡萄糖异构酶, 是一种胞内酶, 它能可逆地催化 D-木糖转化为 D-木酮糖以及 D-葡萄糖转化为 D-果糖^[1], 在木质纤维素微生物发酵生产乙醇和葡萄糖转化果糖为高果糖浆的生产过程中起着关键作用^[1-2], 因此它是一种具有重要应用价值的工业用酶。一般来说, 对于嗜热木糖异构酶反应温度在 58 °C, 可以得到 40%–42%的高果糖浆, 经过层析纯化后可以得到 55%的高果糖浆, 而在 95 °C 下进行异构化过程就可以得到 55%糖浆而无需后期的层析过程; 另外反应过程中的温度大于 55 °C 能降低杂菌的污染和底物的粘度^[3]。因此, 提高酶促反应过程中的温度成了一种好的解决方法, 这就促使我们从自然界中筛选出嗜热木糖利用菌株, 从而发现更为耐热的木糖异构酶。

目前, 已从不同种属的嗜热菌中分离到多种热稳定的木糖异构酶, 并进行了比较深入的研究。如 1997 年 Park 等从 *Thermus favus* AT62 中分离纯化了一种木糖异构酶, 该酶为一种四聚体, 其分子量为 185 kD, 最适温度和最适 pH 分别为 90 °C 和 7.0^[4]; Joo 和 Rhee 等从堆肥中分离出一株 *Streptomyces chibaensis* J-59, 克隆了 *xylA* 基因 1 167 bp, 并且在大肠杆菌中表达了 45 kD 蛋白, 该酶的最适温度为 85 °C^[5]; 2010 年 Byoung-Chan Kim 等人从 *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *yonseiensis* 中克隆了 *xylA* 基因, 该基因编码 438 个氨基酸, 重组酶最适温度为 95 °C, Zn^{2+} 对该酶的激活作用最强^[6]; 至今报道的最嗜热的木糖异构酶是来自于 *Thermotoga maritima* 的, 最大的活性表现在 105 °C^[7]。但是, 由于嗜热菌生长速度较慢, 培养条件苛刻, 产酶量低, 作用范围窄并难以进行分离纯化等, 因此利用基因工程技术在中温宿主中表达嗜热酶, 已成为研究热点^[8]。本实验从甘肃玉泉油田地表土中分离到一株嗜热木糖利用菌株, 经 16S rDNA 序列

分析和生理生化实验对该菌株进行鉴定。然后通过对其木糖异构酶开放阅读框的克隆表达和重组酶学性质的研究, 为该酶更好地应用于工业生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

(1) 分离培养基(g/L): K_2HPO_4 4, KH_2PO_4 1, NH_4NO_3 1, NaCl 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, 微量元素 10 mL/L, 木糖 10 g/L, pH 7.0。微量元素(g/L): EDTA 5, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 6, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.15, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.8, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.3, H_3BO_3 0.3, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.25。

(2) TTC 培养基: 木糖 0.5 g/L, 琼脂 20 g/L, 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 0.05 g/L, 做为上层培养基; 分离固体培养基(2%琼脂)做为下层培养基。

(3) 大肠杆菌完全培养基为 LB (蛋白胨 10 g/L; 酵母提取物 5 g/L; 氯化钠 10 g/L, pH 7.0)。质粒转化所用培养基 SOC (蛋白胨 20 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L $MgSO_4$, 20 mmol/L 葡萄糖)。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒, Axygen 公司; pMDTM19-T 载体, Promega 公司; 限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I, Promega 公司; PCR 回收试剂盒, Omega 公司; 质粒提取试剂盒, Axygen 公司。

1.3 菌种分离

从甘肃玉门油田地表土中收集 5 g 样品, 添加到 100 mL 分离培养基中, 60 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 转接 1 mL 培养液到 1%木糖分离培养基中, 60 °C、200 r/min 培养 1 d, 接着以相同的条件再转接一次。然后取 100 μ L 培养液涂布分离固体培养基, 60 °C 恒温培养一段时间后挑选出形态有差异的菌株点接种到 TTC 培养基中, 60 °C 培养 2 h 后, 挑选

上层培养基颜色变深红的菌株进一步划线分离纯化 2 次, 最后将分离纯化的菌株在-80 °C 冰箱保存。对纯化的菌株进行复筛实验, 将菌株接种到 5 mL 1%木糖分离培养基中, 60 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 利用液相色谱检测培养基中木糖剩余量从而挑选木糖利用能力强的菌株做下一步的研究。

木糖浓度分析: 使用安捷伦液相色谱仪测定样品中木糖的含量。色谱条件: 色谱柱 HPX-87H 有机酸分析柱 (300 mm×7.8 mm; Bio-Rad, Hercules), 流动相: 0.05 mol/L H₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 63 °C, 检测波长 280 nm, 示差折光检测器温度 55 °C。

1.4 木糖利用菌的生理生化特征鉴定和 16S rDNA 序列分析

分离菌株的形态与生理生化特征鉴定, 按照细菌鉴定手册的方法进行^[9]。用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为: 正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; 反向引物 5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3'。PCR 反应体系为(25 μL): ddH₂O 12.5 μL, 5×PCR buffer 5.0 μL, dNTP mix (2.5 mmol/L) 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, 正向引物(10 μmol/L) 1.0 μL, 反向引物(10 μmol/L) 1.0 μL, Go Taq Flexi Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, 模板 1.0 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 4 min; 95 °C 30 s, 65 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。用 pMDTM19-T 载体克隆, 测序。16S rDNA 序列同源性分析采用

NCBI 的 BLAST 进行多重序列比对, 利用序列分析软件 Treeconw, 计算 1 000 次以 Neighbor-Joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树。

1.5 木糖异构酶基因 *xylA* 的克隆及测序

提取 *Geobacillus* sp. Y565-5 菌株的基因组 DNA, 首先用木糖异构酶高度保守氨基酸序列的简并引物 *xylA*-F/*xylA*-R (表 1)对该基因的保守序列进行 PCR, PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 25 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物与 pMDTM19-T 载体相连接, 转化后挑选阳性转化子测序。其次, 在 NCBI 上对保守序列进行序列比对, 挑选相似性高的菌株, 利用 ClustalX 软件对这些菌株 *xylA* 进行序列比对, 在开放阅读框的上下游寻找一些保守序列, 利用 Primer 5.0 软件根据 ORF 上游保守序列和 *xylA* 保守序列的下游与 ORF 下游保守序列和 *xylA* 保守序列的上游设计两对引物 *xylA*-F1/*xylA*-R1 和 *xylA*-F2/*xylA*-R2 (表 1)对该菌基因组进行 PCR 扩增, 然后将 PCR 产物与 pMDTM19-T 载体相连接, 转化后挑选阳性转化子送去测序。最后, 参照用 *xylA*-F1/*xylA*-R1 和 *xylA*-F2/*xylA*-R2 引物测出来的基因序列, 设计带酶切位点的 PCR 引物 *xylA*-NCO1/*xylA*-NOT1 (表 1), 从 *Geobacillus* sp. Y565-5 全基因组 DNA 中克隆 *xylA* 基因全长序列, PCR 循环参数为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min 20 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。然后将 PCR 产物与 pMDTM19-T 载体相连接, 转化后挑选阳性转化子测序。

表 1 实验中所用的引物 Table 1 Primers used in this study			
引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	长度 Size (bp)	引物来源 Primers source
<i>xylA</i> -F [※]	TGGGGNGGNGNGA(G/A)GG	16	Reference [10]
<i>xylA</i> -R [※]	NGG(C/T)TC(G/A)TTNGG(T/C)TTNGG(C/T)TC	21	Reference [10]
<i>xylA</i> -F1	CATTCTCGTTATTTAAGG	19	Used in this study
<i>xylA</i> -R1	GTTTGTTTGGCTCGAT	18	Used in this study
<i>xylA</i> -F2	AACGGCTCGGAGCGGAAACTAC	23	Used in this study
<i>xylA</i> -R2	TCATCAAGCAGCACCAACCC	20	Used in this study
<i>xylA</i> -NCO1	CATG <u>CC</u> ATGGCATATTCCCCGAATATCGG	29	Used in this study
<i>xylA</i> -NOT1	TTGCGG <u>CCG</u> CCGAACGGGATACGCTCGGCAC	31	Used in this study

注: 酶切位点以下划线标识。
Note: Restriction sites were underlined.

1.6 表达载体的构建以及木糖异构酶的诱导表达
xyIA 基因片段与质粒 pET28a(+)(本实验室提取)同时用 *Nco* I/*Not* I 双酶切, 然后用 PCR 回收试剂盒进行纯化。纯化后的 pET28a(+)与目的基因进行连接, 构建木糖异构酶表达载体 pET-28a(+)-*xyIA*, 连接反应液转化感受态细胞 DH5 α , 挑取阳性转化子进行 PCR 检测和酶切验证。

将经鉴定后的 pET-28a(+)-*xyIA* 转化到表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 挑取单菌落到含 100 mg/L 卡那霉素(Kana)的 LB 培养液, 37 °C 振荡培养过夜, 然后接种 500 μ L 到新鲜 LB (100 mg/L Kana)培养液中, 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37 °C、200 r/min 诱导表达 4 h, SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。

1.7 表达条件的优化及酶的初步纯化

诱导表达蛋白时, IPTG 浓度分别选择 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0、2.0 mmol/L, 37 °C、200 r/min 诱导表达 4 h, 进行 SDS-PAGE 分析, 从而确定最佳诱导剂浓度。

为了减少包涵体的产生, 进行低温诱导表达, 加入 0.1 mmol/L IPTG 至终浓度, 18 °C、200 r/min 诱导表达 12 h, 取一定体积菌液 6 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 PBS (pH 7.2)缓冲液后于冰浴中超声破碎, 15 000 \times g、4 °C 离心 15 min, 获得的上清液 70 °C 热处理 20 min^[5], 15 000 \times g、4 °C 离心 15 min 去除沉淀物, 初步纯化的酶液用 SDS-PAGE 检测并且用来做下一步的酶活分析。

1.8 木糖异构酶酶活性测定

采用半胱氨酸吡唑法检测木糖异构酶活性^[11]。反应体系: 0.5 mol/L 木糖 30 μ L, 酶液 100 μ L, 10 mmol/L MnSO₄ 50 μ L, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液 820 μ L, 90 °C 反应 1 h, 沸水浴终止反应; 取 170 μ L 立即加入 13 mol/L 的 H₂SO₄ 6 mL, 1.5%的半胱氨酸盐酸盐 0.2 mL, 0.12%的吡唑酒精溶液 0.2 mL, 混匀, 60 °C 反应 10 min 于 560 nm 处测定光吸收, 根据木酮糖标准曲线求得木酮糖量。酶活

力单位(U)定义为每分钟催化产生 1 μ mol 木酮糖所需的酶量。蛋白浓度的测定采用 Bradford 方法^[12]。

1.9 木糖异构酶的酶学性质研究

分别在不同温度、pH 8.0 条件下测定木糖异构酶的酶活性, 确定其作用的最适温度。分别在不同 pH、90 °C 条件下测定木糖异构酶的酶活性, 确定其作用的最适 pH。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

通过 TTC 实验从样品中初步筛选出 30 株菌株, 其中有 7 株菌株使 TTC 上层培养基颜色变得很深, 然后对这 7 株菌株进行以木糖为唯一碳源的液体发酵实验, 发现这 7 株菌株都可以以木糖为唯一碳源生长, 但是生长情况有差异, Y565-5 菌在分离培养基中生长最快, 而且木糖的利用能力更强, 24 h Y565-5 菌对木糖的利用率是 52.14%, 其余菌株则生长缓慢, 木糖的利用能力较低。

分离筛选出的 Y565-5 菌株进行生理生化特性试验。结果表明, 菌株 Y565-5 革兰氏染色阳性, 细胞呈长杆状, 细胞壁较厚, 所表现的生理生化特征见表 2, Y565-5 可以生长的温度范围为 45 °C–65 °C, 在 37 °C 和 70 °C 均不生长, 最适生长温度为 60 °C; Y565-5 的 pH 生长范围在 6.0–8.0, 最适 pH 值为 6.5。氮源利用试验发现, Y565-5 可以利用酵母粉和硝酸铵为唯一氮源生长, 其他氮源均不能使其较好地生长。这株菌株与 *Geobacillus* sp.具有相似的形态和生理生化特征。

扩增 Y565-5 菌株的 16S rDNA 序列后, 进行克隆测序, 然后将获得 16S rDNA 全长序列与 GenBank 数据库中的已有序列进行 BLAST 分析, 从 GenBank 中选择近缘菌株的 16S rDNA 序列, 采用 Treeconw 软件程序进行序列分析, 并用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树(图 1), 从图 1 中可以看出 Y565-5 菌株与地芽孢杆菌属中的许多菌株的 16S rDNA 序列有较高的同源性, 与 *Geobacillus subterraneus* R-35641 相似性达到 99%。根据上述同

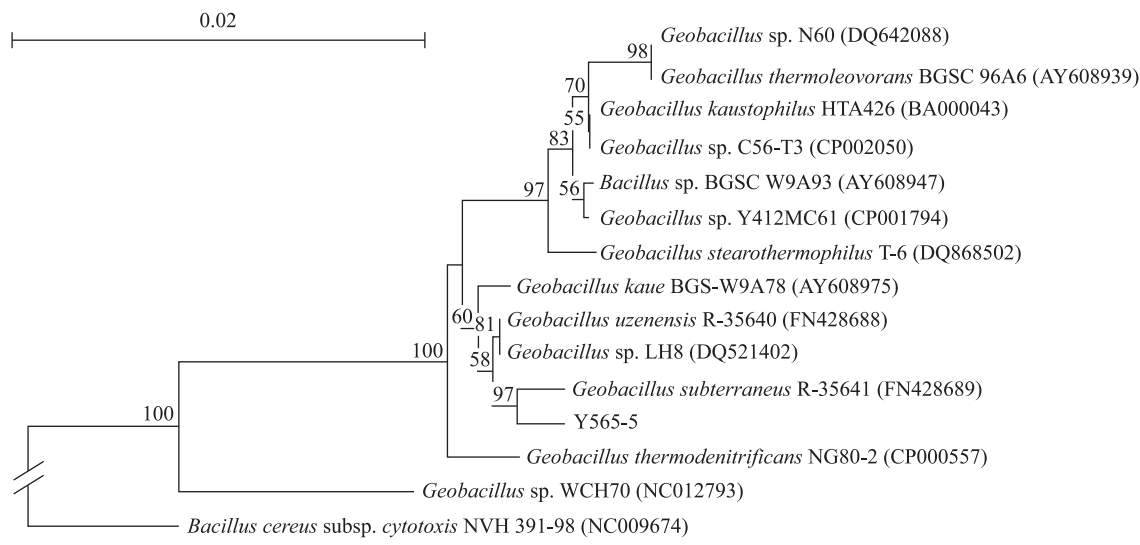


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 16S rDNA gene sequence

源性比较结果, 再结合生理生化特征(表 2), 进一步证明这株菌属于地芽孢杆菌属, 将其命名为 *Geobacillus* sp. Y565-5。

2.2 木糖异构酶基因的克隆及序列分析

(1) 利用简并引物同源克隆方法得到 154 bp 的片段, 该序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,

挑选相似性最高的 6 株菌株, 利用 ClustalX 软件进行序列比对, 发现这些菌株 *xylA* 开放阅读框的上下游有一些保守序列。(2) 根据上下游的保守序列和得到的部分序列设计两对引物从而得到其侧翼序列, 上游 700 bp 和下游 900 bp。经过软件序列拼接得到 *Geobacillus* sp. Y565-5 *xylA* ORF 全长 1 182 bp, 用 BLAST 软件与 GenBank 中的有关序列进行同源性比较, 结果表明与 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 的同源性最高, 为 93%。将它的简并氨基酸序列放在 NCBI 上进行 BLAST 比对(表 3), 结果表明, *Geobacillus* sp. Y565-5 与 *Geobacillus* sp. Y412MC52 的 XylA 氨基酸序列有着极高的相似性, 相似性达到 99%。

表 2 菌株 <i>Geobacillus</i> sp. Y565-5 表型及理化特征			
Table 2 Physiological and biochemical properties of <i>Geobacillus</i> sp. Y565-5			
Items	Results	Items	Results
Cell shape	Long rods	Carbohydrates	
Spores	+	Cellulose	-
Movement	-	Mannitol	+
Catalase	+	Mannose	+
Oxidase	+	Arabinose	+
Growth: 3% NaCl	+	Fucose	+
5% NaCl	-	Glucose	+
Citrate salts	-	Cellobiose	+
Nitrate reduced	+	D-Fructose	+
Starch hydrolysis	+	D-Galactose	+
Casein	+	Maltose	+
Urea hydrolysis	+	Sucrose	+
Catalase	-	Lactose	+
Fat hydrolysis	+	Glycerol	+
Hydrogen sulfide production	-	Anaerobic growth	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

表 3 <i>Geobacillus</i> sp. Y565-5 与其它种属木糖异构酶氨基酸序列的相似性比较		
Table 3 Homology among xylose isomerases from <i>Geobacillus</i> sp. Y565-5 and other xylose isomerases		
菌株 Strain	覆盖度 Query coverage (%)	相似性 Similarity (%)
<i>G. sp.</i> Y412MC52	99	99
<i>G. kaustophilus</i> HTA426	99	98
<i>G. sp.</i> C56-T3	99	98
<i>G. thermodenitrificans</i> NG80-2	99	98
<i>G. thermoglucosidasius</i> C56-YS93	99	94
<i>G. sp.</i> Y4.1MC1	99	93

2.3 木糖异构酶基因在大肠杆菌中的表达

PCR 扩增 *xyIA* 基因序列插入 pET-28a 质粒构建表达载体, 转化受体菌 DH5 α 挑选单克隆进行鉴定。用质粒提取试剂盒从单克隆菌液中提取质粒, 以重组质粒为模板, *xyIA*-NCO1/*xyIA*-NOT1 为引物, 进行 PCR 扩增并对重组质粒进行 *Nco* I/*Not* I 双酶切, 电泳结果(图 2)显示, PCR 扩增得到一条约 1 200 bp 的特异性条带, 且重组质粒酶切也得到同样大小的条带, 表明外源基因已经成功地连接到表达质粒上。

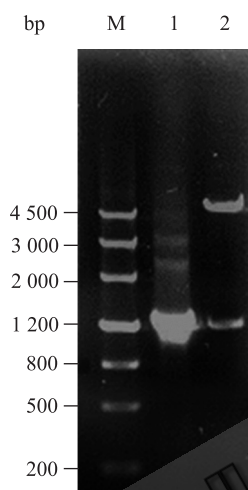


图 2 重组载体的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 PCR and restriction analysis of recombinant plasmids

Note: 1: PCR product of recombinant plasmid; 2: *Nco* I/*Not* I enzyme digestion product of the recombinant plasmid; M: DNA marker.

表达产物经 SDS-PAGE 分析(图 3)。重组 BL21(DE3)菌株在 37 °C 诱导 4 h 后与未经诱导的菌株相比在 45 kD 处出现了明显的特异蛋白条带, 与木糖异构酶的理论值大小一致。

2.4 木糖异构酶表达条件的优化及酶的初步纯化

分别对不同诱导剂的浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0、2.0 mmol/L)表达的蛋白量进行 SDS-PAGE 检测(图 4)。由图 4 可知, 随诱导剂浓度增加, 其诱导量并无明显提高, 所以选取 0.1 mmol/L 为其最佳诱导剂浓度。

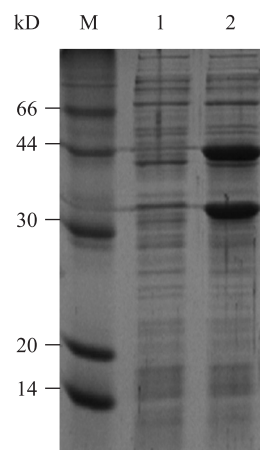


图 3 木糖异构酶基因的重组表达

Fig. 3 Recombinant expression of xylose isomerase gene

Note: 1: Total proteins without IPTG induction; 2: Total proteins of the pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) with IPTG induction; M: Standard protein.

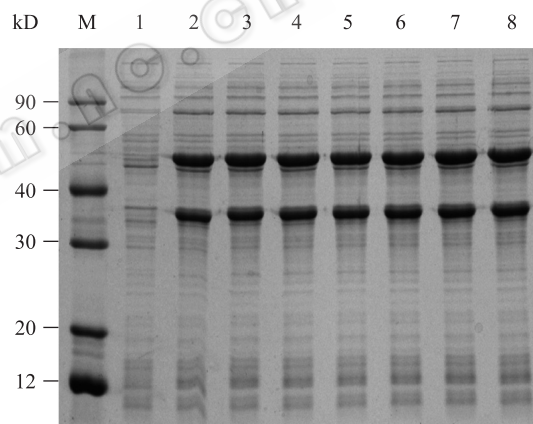


图 4 不同 IPTG 浓度的诱导表达量

Fig. 4 Total proteins of the pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) after IPTG induction with different concentration

Note: 1: Total proteins of *E. coli* BL21(DE3) cells harboring pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) without IPTG induction; 2-8: Total proteins of the pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) induced by IPTG with 0.1 mmol/L to 2.0 mmol/L; M: Standard protein.

为了减少包涵体的产生, 进行低温诱导, 18 °C、200 r/min、0.1 mmol/L IPTG 诱导 12 h, 表达的蛋白量进行 SDS-PAGE 检测(图 5)。然后利用 70 °C 热处理对提取的粗酶液进行初步纯化, 纯化后重组木糖异构酶在 BL21(DE3)表达的蛋白中占 50%左右。这样初步纯化的酶液就可以进一步用来做酶活分析。

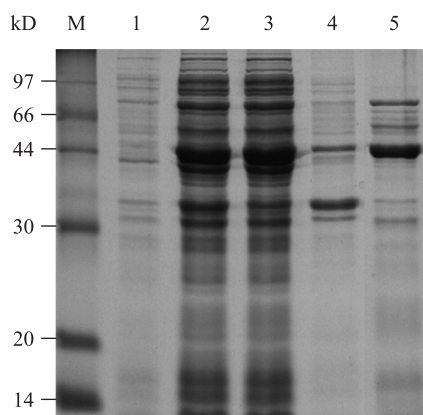


图 5 木糖异构酶基因的低温诱导表达和酶的初步纯化

Fig. 5 Expression of low temperature induction and partial purification of XylA

Note: 1: Total proteins of pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) without IPTG induction; 2: Total proteins of the pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) induced by 0.1 mmol/L IPTG for 12 h at 18 °C; 3: Supernatant of sonicated pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) after being induced by 0.1 mmol/L IPTG; 4: Sediment of sonicated pET-28a(+)-*xyIA*/BL21(DE3) after being induced by 0.1 mmol/L IPTG; 5: Partially purified recombinant xylose isomerase by heat treating at 70 °C for 20 min; M: Standard protein.

2.5 木糖异构酶的酶学性质分析

通过测定各温度和 pH 下初步纯化酶液的酶活(图 6), 可知木糖异构酶的最适温度为 90 °C, 最适 pH 为 7.0。该酶在 75 °C–95 °C 酶活大于 60%, 说明该酶是一种嗜热的耐高温酶。该酶在 pH 4.0–10.0 范围内, 随着 pH 的升高酶活性增强, 在 pH 7.0 时酶活性达到最大值, 在碱性条件下酶的活性下降很快。该酶在 90 °C、pH 7.0 条件下, 比酶活约为 1.4 U/mg 蛋白。

3 讨论

木糖异构酶可以催化 D-木糖转化为 D-木酮糖和 D-葡萄糖转化为 D-果糖, 因此它是一种重要的工业用酶。来源于嗜热菌株的木糖异构酶可以耐高温而且热稳定性强, 它对于高果糖浆的生产有潜在的应用价值。目前, 已经从 *E. coli* (Schellenberg 等, 1984)、*B. subtilis* (Wilhelm & Hollenberg, 1984, 1985)、*Thermus thermophilus* (Dekker 等, 1991)、*S. violaceoniger* (Marcel 等, 1987)、*Streptomyces chibaensis* J-59 (Gil 等, 2005)、*Thermoanaerobacterethanolicus* 39E (Dekker 等,

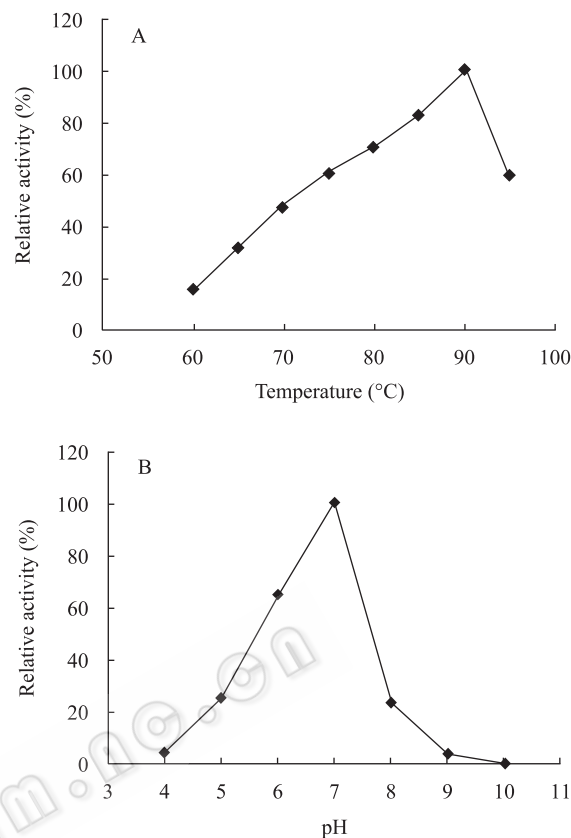


图 6 重组木糖异构酶的酶学性质

Fig. 6 Effect of incubation temperature (A) and solution pH (B) on the activity of the recombinant XylA

1991)、*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *yonseiensis* (Byoung 等, 2010)、*Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Yong 等, 1993)和 *T. thermosulfurigenes* 4B (Lee 等, 1990)等克隆和测序了 *xyIA* 基因。*Geobacillus* 菌株是 2001 年新命名的一类细菌。由于其具有嗜热、兼性厌氧、降解烃和产生表面活性剂的特性, 在微生物采油、环境治理等领域中有潜在应用价值; 同时, 这类细菌具有特殊的功能基因和特种酶, 对构建工程菌具有重要的研究价值^[13]。

目前对 *Geobacillus* 菌株木糖异构酶的研究较少, 本文从玉泉油田地表土中分离到一株产嗜热木糖异构酶的菌株 *Geobacillus* sp. Y565-5, 通过对该菌 *xyIA* 基因的克隆和 NCBI 数据库比对, 发现该菌与 *Geobacillus* sp. Y412MC52 的 XylA 氨基酸序列有着极高的相似性, 相似性达到 99%。*Geobacillus* sp.

Y412MC52 来源于黑曜石温泉, *Geobacillus* sp. Y412MC52 来自于普通地表土样, 虽然它们来自于不同的生境, 但在催化相关的保守氨基酸序列上具有极高的相似性。这说明嗜热木糖异构酶的来源非常广泛, 除了一些极端环境以外, 普通生境中也存在着一些嗜热菌和嗜热酶, 这对于进一步挖掘我国的嗜热微生物及其产酶资源有着一定的借鉴作用。该酶的最适温度为 90 °C, 它比来源于 *T. ethanolicus* 和 *T. thermohydrosulfuricus* 的 85 °C 的木糖异构酶最适温度更高^[14], 因此它具有良好的嗜热稳定性, 可以更好地应用于工业生产。

通过对木糖异构酶表达条件的优化, 可知 IPTG 浓度对 *xylA* 基因的表达没有显著的影响, 而且高浓度 IPTG 对含质粒工程菌的生长具有抑制作用, 再加上 IPTG 本身价格昂贵, 所以将 IPTG 浓度选择为 0.1 mmol/L。37 °C 生长常常会使一些蛋白累积形成无活性的包涵体(如图 4 中所示)^[15], 本文选择诱导温度为 18 °C, 由图 5 可知大部分蛋白以可溶性的形式表达出来。与文献中报道的酶活相比, 该重组木糖异构酶的酶活不高。将来可对该酶的生理生化特性进行更为详尽的研究, 在此基础上, 利用定向分子进化技术改造和筛选具有优良特性的突变体, 提高酶的活性、耐酸碱性和热稳定性等, 为嗜热木糖异构酶在工业领域更好地应用提供广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV, et al. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1996, 60(2): 280–300.
- [2] Chandrakant P, Bisaria VS. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1998, 18(4): 295–331.
- [3] Vieille C, Hess JM, Kelly RM, et al. *XylA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1867–1875.
- [4] Park BC, Koh S, Chang C, et al. Cloning and expression of the gene for xylose isomerase from *Thermus favus* AT62 in *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 62(1): 15–27.
- [5] Joo GJ, Shin JH, Heo GY, et al. Molecular cloning and expression of a thermostable xylose (glucose) isomerase gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59[J]. The Journal of Microbiology, 2005, 43(1): 34–37.
- [6] Kim BC, Yu SN, Kim KY, et al. Cloning, expression and characterization of xylose isomerase, *xylA*, from *Caldan-aerobacter subterraneus* subsp. *yonseiensis*[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(7): 929–933.
- [7] Wang YF, Pei JJ, Shao WL, et al. Expression and characterization of a thermostable glucose isomerase from the hyperthermophile, *Thermotoga maritima*[J]. Microbiology, 2008, 35(10): 1587–1592.
- [8] 李淑彬, 陆广欣, 林如妹, 等. 嗜热菌-工业用酶的新来源[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 67–71.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 267–295.
- [10] 沈煜. 木酮糖激酶对酿酒酵母代谢工程菌木糖利用的影响及木糖异构酶基因的胞外表达[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2005.
- [11] Dische Z, Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 192(2): 583–587.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [13] 周卫民, 杨世忠, Nazina TN, 等. *Geobacillus* 研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 46–49.
- [14] Dekke K, Yamagata H, Sakaguchi K, et al. Xylose (Glucose) isomerase gene from the thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*; cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(1): 221–227.
- [15] 刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 172–175.