

一株产木聚糖酶嗜热菌的鉴定及酶学性质

陈学敏 刘培培 张波*

(北京联合大学应用文理学院 北京 100191)

摘要: 从云南腾冲热泉水样中分离筛选得到一株产木聚糖酶的菌株。通过细菌形态观察、生理生化特性并结合 16S rDNA 序列分析, 经鉴定, 该菌为地芽孢杆菌(*Geobacillus* sp.), 命名为 *Geobacillus* sp. PZH1。对该菌株所产嗜热木聚糖酶及酶学特性进行了初步研究。SDS-PAGE 和酶谱分析测得该酶分子量约为 69 kD; 酶的最适反应 pH 和最适反应温度分别为 7.0 和 70 °C, 在 pH 5.0–11.0 和 40 °C–100 °C 范围内均有较高酶活; 该酶在 pH 5.0–12.0 范围内和 70 °C 以内具有较高的稳定性; 40 °C–100 °C 范围内, 该木聚糖酶没有被检测到纤维素酶活性。

关键词: 嗜热菌, 嗜热木聚糖酶, 酶谱分析, 纤维素酶活性

Identification of a thermophilic bacterium and preliminary characterization of the secreted xylanase

CHEN Xue-Min LIU Pei-Pei ZHANG Bo*

(College of Applied Sciences and Humanities, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: The bacterium isolated from a water sample of Yunnan tengchong hot spring can secrete a kind of thermophilic xylanase. It was identified and named as *Geobacillus* sp. PZH1 by morphologic observation, physio-biochemical characteristics and 16S rDNA sequence alignment. Subsequently, its secreted xylanase and the xylanase's characteristics were researched preliminarily. SDS-PAGE electrophoresis and zymogram analysis suggested that the xylanase's molecular mass was 69 kD; the optimum pH and temperature of the partially purified enzyme were 7.0 and 70 °C respectively, and it performed noted activities from pH 5.0 to pH 11.0 and from 40 °C to 100 °C; it had high stability from pH 5.0 to pH 12.0 and under 70 °C; from 40 °C to 100 °C, no cellulase activity was detected for the partially purified xylanase.

Keywords: Thermophilic bacterium, Thermophilic xylanase, Zymogram analysis, Cellulase activity

木聚糖是自然界中一种丰富的再生资源, 是最具代表性的半纤维素, 约占半纤维素的 1/3–1/2, 是

自然界中仅次于纤维素的最丰富的多糖^[1]。木聚糖酶是水解木聚糖的关键酶, 水解产物为不同聚合度

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2007CB707805)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62004564; 信箱: zhangbo@ygi.edu.cn

收稿日期: 2010-08-03; 接受日期: 2010-11-30

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

的木聚寡糖。木聚寡糖由于其低热量、难被人体消化吸收、有润肠通便功能以及具有显著的双歧杆菌增殖能力等作用,成为目前倍受关注的一种功能性寡糖,可广泛用于食品、饲料工业,具有广泛的应用价值^[2]。另外,嗜热、耐碱、热稳定性好,且无(低)纤维素酶活的木聚糖酶也可应用在造纸工业纸浆漂白和制浆方面^[3]。

目前,国内对嗜热细菌产木聚糖酶的研究很少。本实验室从云南腾冲热泉水样中分离到一株产木聚糖酶的嗜热细菌,对其进行了菌种鉴定并对其所产木聚糖酶的性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株分离自腾冲热泉水样。

1.2 试剂

3,5-二硝基水杨酸(DNS)、桦木木聚糖、羧甲基纤维素(CMC)购自 Sigma 公司,其他均为国产分析纯。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 培养基:种子培养基(g/L): NH_4Cl 1, NaNO_3 1, MgSO_4 0.2, KCl 0.1, Na_2HPO_4 0.21, NaH_2PO_4 0.1, CaCl_2 0.1, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 酵母提取物 3, 蛋白胨 15, 葡萄糖 10, 微量元素液 10 mL, 调 pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。发酵培养基:与种子培养基其他组分相同,仅碳源改为桦木木聚糖 10 g/L。微量元素液(g/L): MnSO_4 0.5, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.042, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5。

1.3.2 培养条件:从斜面接入种子培养基, 50 °C、180 r/min 恒温培养 12 h, 再以 2% 的接种量将种子接入发酵培养基, 50 °C、200 r/min 恒温培养 3 d, 装液量均为 250 mL 摇瓶装 50 mL 培养基。

1.4 菌种鉴定

通过形态学观察、生理生化特性和 16S rDNA 序列对比(北京三博远志生物有限责任公司)对其进行菌种鉴定,生理生化试验参考文献[4]。

1.5 酶活性和蛋白的测定

DNS 液配制和木糖含量测定参考文献[5]。

酶活性测定^[6]:取适当稀释的酶液 0.5 mL, 加入 1.5 mL 1%木聚糖溶液, 70 °C 恒温水浴, 精确反应 10 min, 立即加入 3 mL DNS 溶液, 沸水浴 12 min, 冰浴、定容至 50 mL, 于 490 nm^[7]处测吸光度并参照木糖标准曲线求得木糖含量, 计算酶活, 空白组不经过 70 °C 恒温水浴直接加入 DNS 溶液反应。酶活性单位定义:每分钟产生 1 μmol 还原糖(以木糖计)所需的酶量为 1 个酶活性单位, 以 IU/mL 表示。

酶活计算公式: $E = nC \times 1\,000 / MT$ 。

E: 酶活(IU/mL);

n: 稀释倍数;

C: 木糖含量(g/L);

M: 木糖分子量(150);

T: 反应时间(min)。

蛋白测定:参照 Bradford 法^[8]测定蛋白含量, 标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。

1.6 粗酶的制备与部分纯化

从斜面挑取菌落接种于种子培养基, 培养至对数期, 以 2% 接种量转接于发酵培养基, 50 °C、200 r/min 培养 3 d 后, 菌液经纱布过滤, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min。上清即为粗酶液。

1.6.1 硫酸铵沉淀:取 6 支试管, 编号 1-6, 各加入 10 mL 粗酶液, 分别加硫酸铵至饱和度 30%、40%、50%、60%、70%、80%和 90%, 置于 4 °C 过夜后, 于 10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀溶于 20 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液, 测酶活和蛋白含量。

1.6.2 粗酶纯化:参照 1.6.1 中确定的硫酸铵浓度进行分级沉淀, 收集饱和度 40%-60%之间的沉淀, 沉淀再用 20 mmol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解并置于相同缓冲液 4 °C 透析过夜, 冻干备用。

1.7 SDS-PAGE 电泳和酶谱分析

SDS-PAGE电泳^[9]:采用不连续分离系统, 3% 的浓缩胶, 10% 的分离胶, 浓缩胶和分离胶均含有 0.2%木聚糖, 样品溶于含有 2% β -巯基乙醇和 2% SDS 的样品缓冲液中, 加样前 50 °C 处理 15 min。

酶谱分析^[10]:电泳完毕, 将带有样品的胶部分

切下, 用 20 mmol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液冲洗 3–5 遍, 将胶浸没 25% 异丙醇中 30 min, 恢复酶的活性, 再用 20 mmol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液漂洗 20 min, 将胶浸没在同样缓冲液中, 70 °C 水浴 3 min, 0.1% 刚果红染色 15 min, 1 mol/L NaCl 溶液脱色, 酶带处因木聚糖被水解而被脱成透明带, 透明带即为酶带。

1.8 酶最适反应条件和稳定性研究

1.8.1 酶最适反应条件研究: 分别于不同缓冲体系配制 1% 木聚糖溶液: 使用柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲体系(50 mmol/L)配制 pH 3.0–6.0 缓冲液; 使用 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲体系(50 mmol/L)配制 pH 7.0–8.0 缓冲液; 使用甘氨酸-NaOH 缓冲体系(50 mmol/L)配制 pH 9.0–10.0 缓冲液; 使用 Na_2HPO_4 -NaOH 缓冲体系(25 mmol/L) pH 11.0–12.0 缓冲液。70 °C 测不同 pH 缓冲体系下的相对酶活, 以最高酶活为 100%。用 pH 7.0 磷酸缓冲液配制 1% 木聚糖溶液, 分别于不同温度(40 °C–100 °C)测相对酶活, 以最高酶活为 100%。

1.8.2 酶稳定性研究: 取适量酶, 分别溶于浓度为

50 mmol/L 的不同 pH 缓冲液中, 4 °C 保温 3 h 后, 测定相对剩余酶活, 以保温前酶活为 100%。取适量酶, 溶于 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 于不同温度下保温(50 °C–90 °C), 1 h 和 3 h 后取 2 次样, 分别测定相对剩余酶活, 以保温前酶活为 100%, 绘制曲线。

1.9 纤维素酶活性测定

取等量适当稀释的酶液, 分别于不同温度(40 °C–100 °C)测量木聚糖酶活性和纤维素酶活性。本实验测量纤维素酶活性采用羧甲基纤维素(CMC)作为底物, 溶于 pH 7.0 PBS 缓冲液中。测量纤维素酶活性步骤和测量木聚糖酶活性步骤基本相同, 反应时间为 20 min。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

形态学特征: 该菌是一株兼性厌氧杆菌, 长约 1 μm , 革兰氏阴性, 有芽孢, 半固体培养基穿刺试验显示无运动能力; 菌落呈淡黄色油煎蛋状, 表面扁平、湿润, 边缘完整, 粘性易挑取。革兰氏染色和芽孢染色见图 1, 右图箭头所指即为芽孢。

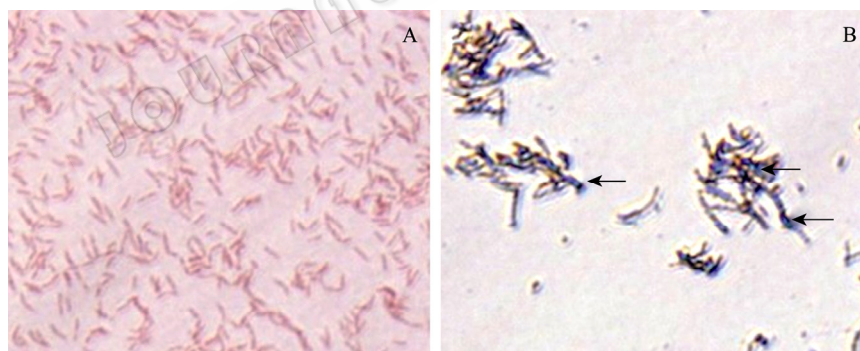


图 1 革兰氏染色图(A)和芽孢染色图(B)

Fig. 1 Photos of Gram staining (A) and spore staining (B)

扩增菌株的 16S rDNA 全长序列, 测序后在 GenBank 中进行同源性比对分析(GenBank 登录号为 HM596428)。通过 GenBank 中的 BLAST 软件分析, 该菌株与地芽孢杆菌属的 3 个菌株(*Geobacillus* sp. YMTC1049、*Geobacillus* sp. GXS1 和 *Geobacillus kaustophilus*)的核苷酸序列的同源性均达到 99%。综合菌株的形态、生理生化特性(表 1), 将其初步鉴定为 *Geobacillus* sp., 命名为 *Geobacillus* sp. PZH1。

2.2 硫酸铵饱和度对酶提取的影响

由图 2 可以看出, 硫酸铵饱和度为 40% 的时候, 有一定含量的蛋白质但基本没有酶活; 硫酸铵饱和度为 60% 的时候显示最大酶活值, 随着硫酸铵饱和度增加, 蛋白含量增加但酶活并没有增加。因此, 本实验通过分级沉淀, 收集硫酸铵饱和度 40%–60% 之间的组分, 可以去除部分蛋白和非蛋白杂质, 达到部分纯化的效果, 纯化效果见表 2。

表 1 *Geobacillus* sp. PZH1 生理生化特性
Table 1 The physio-biochemical characteristics of *Geobacillus* sp. PZH1

实验名称 Test	结果 Result
葡萄糖发酵 Glucose fomentation test	+, 产酸不产气
果糖发酵 Fructose fermentation test	+, 产酸不产气
木糖发酵 Xylose fermentation test	+, 产酸不产气
乳糖发酵 Lactose fermentation test	-
脂肪水解 Lipase test	-
石蕊牛奶实验 Lacmus-Milk test	-
淀粉水解 Amylase test	+
木聚糖水解 Xylanase test	+
尿素实验 Urease test	-
甲基红实验 Methyl red test	+
V.P 实验 V.P test	+
吡哌实验 Indole test	-
硫化氢实验 H ₂ S test	+
柠檬酸盐实验 Citrate test	+

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果。
Note: +: Positive result; -: Negative result.

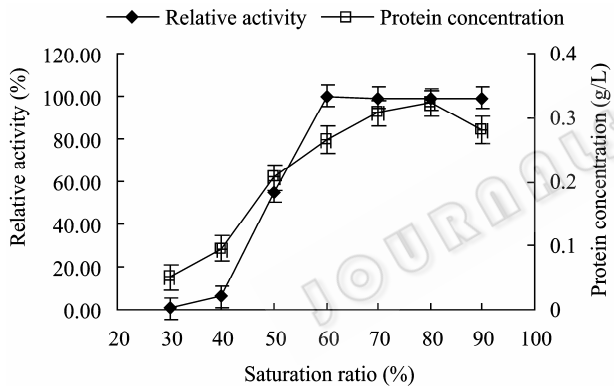


图 2 饱和度-酶活-蛋白含量曲线
Fig. 2 Effects of saturation on xylanase activity and protein concentration

表 2 木聚糖酶部分纯化
Table 2 The partial purification of xylanase

参数 Parameters	粗酶 Rude enzyme	40%–60%组分 Fraction of 40%–60%
总酶活 Total xylanase (IU)	771.1	568.8
总蛋白 Total protein (mg)	348.5	111.3
比活 Specific activity (IU/mg)	2.21	5.11
纯化倍数 Purification	1	2.31
回收率 Yield (%)	100	73.8

2.3 电泳和酶谱分析

SDS-PAGE 电泳结果见图 3。左图为电泳图, 泳道 1 为蛋白标准, 泳道 2–4 为酶样, 上样蛋白量分别为 3、6 和 9 μg ; 右图为酶谱分析图, 上样量与电泳图相对应, 分别为 3、6 和 9 μg 。从图中可以看出, 此酶的分子量约为 69 kD。

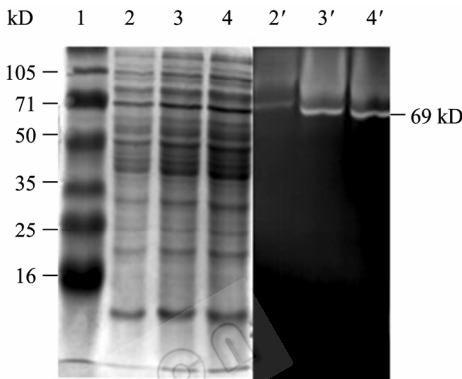


图 3 SDS-PAGE 电泳和酶谱分析
Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis and zymogram

注: 1: Marker; 2–4: 酶样; 2'–4': 其对应的酶谱分析。
Note: 1: Marker; 2–4: Xylanases; 2'–4': The zymogram analysis.

2.4 pH 和温度对酶反应活性的影响

如图 4 所示, 该酶最适反应 pH 为 7.0, 但在 pH 5.0–11.0 范围内酶活均保持在 40%以上, 即该酶有较宽的 pH 适用范围。如图 5 所示, 该酶在 70 $^{\circ}\text{C}$ 处有最大酶活, 且温度高达 80 $^{\circ}\text{C}$ 时仍保持 95%以上的酶活, 该酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ –100 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均能保持较高的酶反应活性, 具有较宽的温度适用范围。

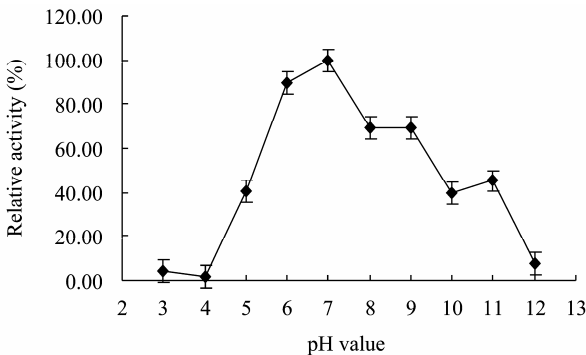


图 4 pH 对酶活性的影响
Fig. 4 Effect of pH value on activity

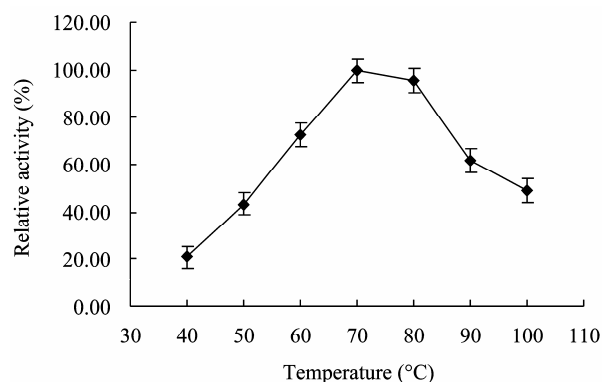


图5 温度对酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activity

2.5 pH 和温度对酶稳定性的影响

如图 6 所示, 该酶在 pH 5.0–12.0 范围内保温 3 h 后, 剩余酶活均保持在 85% 以上, 即使在 pH 3.0 时, 剩余酶活仍然保持在 45% 左右, 即该酶有较强的耐酸碱能力。如图 7 所示, 该菌对温度的稳定性较高, 在 50 °C 保温 1 h 和 3 h 后, 酶活均能保持几乎 100%, 在 60 °C 和 70 °C 保温 1 h 和 3 h 后酶活也均能保持在 60% 以上, 但在 80 °C 经过 1 h 保温后, 酶活损失达 70% 左右, 经 3 h 保温后酶活仅剩 20% 左右, 90 °C 保温 1 h 和 3 h 后几乎没有检测到木聚糖酶活性。

2.6 纤维素酶活性

如图 8 所示, 该木聚糖酶在 40 °C–100 °C 范围内, 具有高的木聚糖酶活性而无纤维素酶活性。

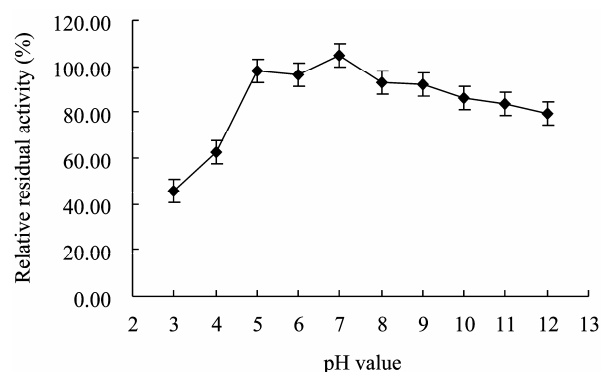


图6 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH value on stability

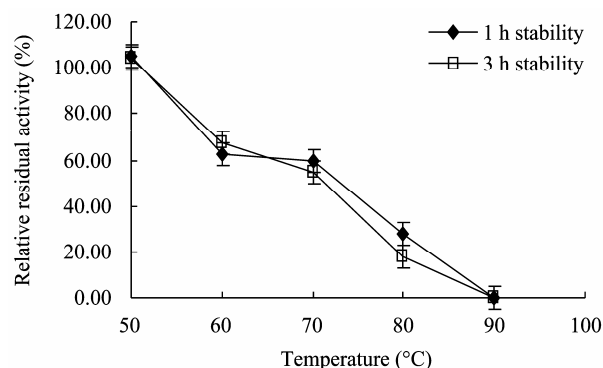


图7 温度对酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on stability

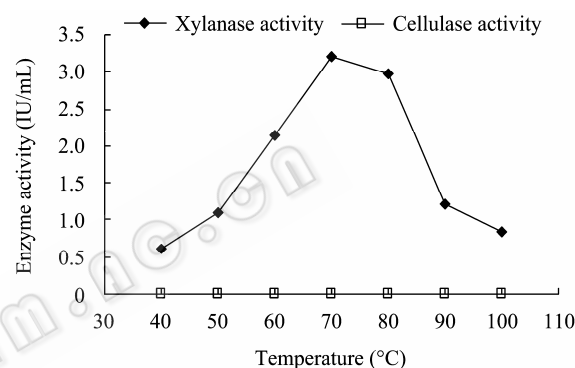


图8 木聚糖酶活性和纤维素酶活性比较

Fig. 8 Contrast of xylanase activity and cellulase activity

3 讨论

地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)是 2001 年新命名的一个高温菌新属, 由从芽孢杆菌属(*Bacillus*)中分出来的 6 个种 *Bacillus kaustophilus*、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus thermocatenulatus*、*Bacillus thermodenitrificans*、*Bacillus thermoglucosidasu*、*Bacillus thermoleovorans* 以及新发现的菌种等组成^[1]。该属的特征主要是活体细胞为杆状, 运动或不能运动, 革兰氏染色阳性, 但可以在阳性和阴性之间变化, 芽孢端生或亚端生, 好氧或兼性厌氧, 专性嗜热, 最适合温度为 55 °C–65 °C^[11]。国内外很少有这类细菌产木聚糖酶的研究, 本研究的木聚糖酶来源于嗜热细菌 *Geobacillus* sp. PZH1, 是一种嗜热耐碱木聚糖酶, 在较高的温度范围(50 °C–100 °C)和较宽泛的 pH 范围(5.0–11.0)中均能发挥作

用, 且不具有纤维素酶活性, 较一些真菌木聚糖酶具有更大的优势^[12-14], 研究这类细菌产生的木聚糖酶可能具有一定的理论价值。此外由于其具有耐热耐碱的特性, 可作为一种重要的工业用酶应用在食品、造纸和饲料等工业领域中^[15-18]。

参 考 文 献

- [1] 胡晓瑜, 周文美, 田永峰, 等. 毛壳菌产木聚糖酶条件的研究[J]. 贵州工业大学学报: 自然科学版, 2007, 36(5): 44-48.
- [2] Vázquez MJ, Garrote G, Alonso JL, et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies[J]. Biore-source Technology, 2005, 96(8): 889-896.
- [3] 刘超纲, 勇强, 余世袁. 低(无)纤维素酶活的木聚糖酶制备途径与潜在应用[J]. 纤维素科学与技术, 2001, 9(2): 1-7.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 116-123.
- [5] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.
- [6] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. J Biotechnol, 1992, 23(3): 257-270.
- [7] 蔡惠梅, 蒋俊树, 刘斌, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定木糖含量的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(5): 219-221.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化试验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 138-140.
- [9] Dimitrov PL, Kamboruova MS, Mandeva RD, et al. Isolation and characterization of xylan-degrading alkali-tolerant thermophiles[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 157(1): 27-30.
- [10] Jiang ZQ, Deng W, Li LT et al. A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*[J]. Biotechnology Letters, 2003, 26(5): 431-436.
- [11] Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 51(Pt 2): 433-446.
- [12] 朱会芳, 周鹏, 闫巧娟, 等. 耐冷皮壳正青霉一种木聚糖酶的纯化与性质研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 536-541.
- [13] 陈威威, 江正强, 王瑞君. 绵毛嗜热丝孢菌木聚糖酶的纯化与性质[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 571-576.
- [14] 范美霞, 付灿, 孙迅, 等. 粗毛栓菌木聚糖酶的纯化及性质[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 83-90.
- [15] 陈威威, 江正强, 王瑞君. 绵毛嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*)木聚糖酶对面包品质的改善[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 1-5.
- [16] 李银标. 木聚糖酶在漂白硫酸盐针叶木浆中的应用[J]. 中华纸业, 2009, 30(2): 71-72.
- [17] 蒋桂韬, 张石蕊, 戴求仲, 等. 细菌性木聚糖酶对21-49日龄黄羽肉仔鸡生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2009(8): 19-21.
- [18] 王颖, 肖冬光, 郭学武. 木聚糖酶在玉米原料酒精发酵中的应用研究[J]. 中国酿造, 2010(1): 20-22.