

热稳定性 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的纯化*

薛业敏 毛忠贵 邵蔚蓝

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

摘 要 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶对来源于被子植物的木聚糖类半纤维素的生物降解和转化是必不可少的。文中首次报道了国内对该酶的研究。 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的基因工程菌在发酵罐中以 LB 为基质进行生长, 以乳糖为诱导剂, 所产生的 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶在 70℃ 热处理 30 min 后, 经 DEAE-Sephacel 阴离子柱层析、金属 Ni^{2+} 的亲和层析等提纯步骤, 达到了电泳纯, 提纯倍数为 49.3 倍, 收率为 20.4 %。SDS-PAGE 法测定 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的分子质量为 85 ku, 与理论推算值相吻合。

关键词 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶 基因工程菌 重组酶纯化

半纤维素是产量仅次于淀粉、纤维素的植物异源多糖, 它的完全降解需要主链水解酶 β -1, 4 内切木聚糖酶、 β -木糖苷酶和侧链水解酶 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶和乙酰木聚糖酯酶解酶的协同作用^[1~3]。我国是一个农业大国, 每年有大量的秸秆成为环保负担, 而秸秆干重的 24% ~ 35% 是木聚糖, 如果将其生物降解为木糖和少量其他单糖, 可以用作基本碳源生产各种发酵产品, 如有机酸、氨基酸、单细胞蛋白、糖醇、工业酶类、溶剂或燃料。不仅如此, 半纤维素的生物降解还能释放出被其包裹的纤维素, 从而使纤维素得到充分利用。总之, α -阿拉伯呋喃糖苷酶协同木聚糖酶在低聚木糖的生产、废物的生物处理、食品或饲料养分的提高, 以及半纤维素的生物转化等方面起着非常重要的作用^[4], 它的生物技术潜力正越来越受到人们的关注。

阿拉伯呋喃糖苷酶可以从许多微生物中产生, 如 *A. niger*, *B. subtilis* 和 *Streptomyces purpurascens*。阿拉伯糖苷酶的编码基因已经从细菌 *B. fibrisolvens*, *S. lividans*, *C. strecorarium* 和 *Pseudomonas fluorescens* 以及真菌 *A. niger* 和 *T. reesei* 中克

隆出来^[1~3]。近来发现嗜热厌氧菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 产生的高热稳定性阿拉伯呋喃糖苷酶还具有 β -木糖苷酶活性, 即双重活性^[5]。这种双重活性的酶只要再增加一个 β -葡萄糖醛酸酶或乙酰酯酶就可以与木聚糖酶协同作用而彻底降解木聚糖, 是工业酶制剂的理想酶源。但是自然菌在产生半纤维素酶的同时还产生大量性质比较相近的纤维素酶, 而且, 嗜热厌氧产乙醇菌 *T. ethanolicus* 生长密度不高, 不适合工业化生产。因此, 分离纯化 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶非常困难。利用基因重组技术, 将 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶基因在合适的宿主中表达, 可将该酶比较容易地表达。同时通过大量表达可以获得从自然界难以得到的大量 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶。本文主要利用已构建的表达嗜热乙醇菌 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的基因工程菌, 通过热处理、离子交换层析和亲和层析较好地地对重组嗜热乙醇菌 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶进行了纯化。

1 材料和方法

1.1 菌种来源及其培养方法

表达嗜热乙醇菌 α -阿拉伯糖苷酶/木糖

第一作者: 博士研究生, 副教授。

* 国家轻工总局 211 专项基金项目

收稿时间: 2003-05-19, 改回时间: 2003-06-23

苷酶 (Xar) 的基因工程菌 *E. coli* JM109 (DE3) / pAlter-Ex1-xar 由本实验室构建。

LB 平板菌种: 将 0.01 μ g 重组质粒 pAlter-Ex1-xar 电转化到 50 μ L 大肠杆菌 JM109 (DE3) 感受态细胞中后, 在 500 μ L 的 SOC 培养基中振荡培养 1 h^[6], 取 100 μ L 菌液涂布于含有四环素 Tet (10 μ g/mL) 抗性的 LB 平板, 37℃ 培养过夜。

液体菌种的制备: LB 平板菌种接种于含有 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl、0.001% Tet 的液体培养基, 于 37℃, 摇瓶培养过夜, 转速 200 r/min。液体菌种以 1% 的接种量接入到 25 L 发酵罐中。

发酵罐培养基组成: 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl, 调 pH 7.0, 灭菌冷却至 30℃ 后, 加入 0.001% Tet。发酵罐起始 pH 7.0, 最终 pH 7.9, 通气量 1:1, 温度为 30℃, 转速 250 r/min。培养至 OD 达 0.6 ~ 0.8, 流加乳糖终止浓度为 5 mmol/L, 继续培养。分别以 0 ~ 12 h 每隔 1 h 取样分析细胞密度 OD₆₀₀、酶活, 当酶活力高且稳定时下罐。

1.2 蛋白质浓度的测定

用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白 (Sigma Inc.) 作为标准蛋白^[7]。

1.3 酶活力测定

阿拉伯糖苷酶和 β -木糖苷酶活性是分别从底物对硝基苯酚- α -L-阿拉伯呋喃糖苷 (p-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside, pNPAF, Sigma) 对硝基苯酚- β -D-呋喃木糖苷 (p-nitrophenyl β -D-xylopyranoside, pNPX, Sigma) 释放对硝基苯酚 (pNP) 的量确定。采用分光光度法^[4], 测定系统总体积为 800 μ L, 反应体系为 200 μ L, 内含 10 μ L 20 mmol/L 底物 pNPX 或 pNPX, 180 μ L 50 mmol/L pH 5.8 的磷酸钾缓冲液、10 μ L 粗酶液。于 80℃ 反应 20 min, 然后加入 600 μ L 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应并显色, 在 405 nm 处测量光吸收的增加值。一个酶单位定义为在该反应条件下, 1 min 内催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。用对硝基苯酚作标准曲

线^[5]。

纯化重组 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶在不同 pH 值下进行酶促反应测定其最适 pH。pH 4.5 ~ 8.0 用 100 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液, pH 8.5, 9.0 用 100 mmol/L Tris HCl 缓冲液。最适温度定于 pH 5.7, 100 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液体系, 不同温度下酶促反应 5 min 后测酶活; 温度稳定性定为将酶保温在 55, 65, 75, 85, 95℃ 下 1 h (pH 5.7, 100 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液), 然后测定其残余酶活。

1.4 酶的分离纯化

纯化步骤在室温下进行, 所有的缓冲液都加入 0.2 g/L 叠氮化钠以防止杂菌生长。纯化设备使用 Bio-Rad 公司的 Biologic LP 系统。

1.4.1 热处理

将收集细胞用 150 mL 经高压细胞破碎仪 (French Pressure, Thermo) 破碎细胞, 9 600 \times g 离心 20 min, 取上清于 70℃ 下热处理 20 min 后, 9 600 \times g 离心 30 min, 上清液为粗酶液。

1.4.2 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱层析

DEAE-Sephacel (Sigma Inc.) 阴离子交换柱 (2.5 cm \times 20 cm) 预先用磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.8) 平衡, 上样后将热处理过的粗酶液注入柱中, 以含 0 ~ 1 mol/L NaCl 的同样磷酸钾缓冲液进行梯度洗脱 (流速 2 mL/min) 和分步收集活性峰洗脱液。

1.4.3 金属 Ni²⁺ 的亲亲和层析

将 Ni-NTA 树脂充分混匀后装入柱内, 即为亲和层析柱 (Novagen) (1.6 cm \times 6 cm), 然后用亲和柱结合缓冲液 (5 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 平衡, 上样后用洗涤缓冲液 (60 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗涤, 然后用洗脱缓冲液 (1 mol/L 咪唑、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱, 流速 0.2 mL/min, 以每管 2 mL 分步收集。收集酶活的峰值部分, 用截留相对分子质量为 3 万的超滤膜浓缩后, 以 SDS-PAGE

凝胶电泳检测纯度。

1.5 相对分子质量

纯酶亚基分子质量用 10% 的 SDS-PAGE 在 110 V 电压下电泳 85 min 后根据相对迁移率计算。

2 结果

2.1 粗酶液的制备

重组菌接种于 50 mL LB/Tet 液体培养基 37℃, 200 r/min 摇床培养 16 h, 按 1% 接种量扩大至 250 mL LB/Tet 培养液中, 培养至 OD_{600} 1.0 左右接入发酵罐中, 当细胞密度 OD_{600} 为 0.8~1.0 时流加乳糖(终浓度为 5 mmol/L)诱导 6 h 后, 酶活不再增加时终止发酵, 6000 r/min 离心 30 min 收集细胞, 然后用磷酸钾缓冲液(50 mmol/L, pH 6.8)重悬, 经高压细胞破碎仪(French Pressure, Thermo)破碎细胞, 9600 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

2.2 粗酶液的热处理

实验过程中, 将收集的细胞破壁后的上清液至于不同温度下保温 20 min 后, 检测 α -阿拉伯糖苷酶活性和蛋白质含量的变化, 结果表明(见表 1), 加热处理可以除去大量杂蛋白, 对酶活力损失的影响不大, 但在实验过程中发现, 如果热处理强度过大, 则盐析中杂蛋白甚至目的酶蛋白对盐析条件非常敏感, 有时会出现盐析沉淀不能完全溶解的现象。因此, 选择 70℃ 热处理 20 min, 有利于下一步盐析中酶蛋白的进一步分离纯化。

表 1 不同温度对热处理纯化效果的影响

加热温度 /℃	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活力 /U·mg ⁻¹	纯化倍数	收率 /%
0	178	182	1.034	1	100
50	171.1	180.9	1.058	1.02	99
60	113.8	146.5	1.288	1.25	80.9
70	76.3	124.2	1.65	1.59	68.8
80	46.5	116.5	2.51	2.43	65.4
90	46.1	115.5	2.51	2.43	64.3
95	40.5	113.5	2.80	2.70	63.1

2.3 酶的分离纯化

2.3.1 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱层析

将粗酶液于 70℃ 下热处理 20 min 后, 9600 r/min 离心 30 min 取上清液注入柱中, 收集活性峰测酶活。比酶活为 15.6 U/mL, 结果见图 1。

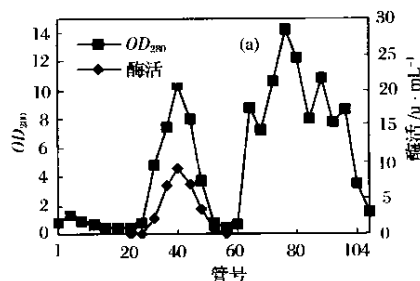


图 1 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱层析

2.3.2 金属 Ni^{2+} 的亲亲和层析

合并上步收集的活性峰酶液经硫酸铵沉淀再溶解, 然后于亲和柱结合缓冲液中透析过夜。然后将透析过的酶液加入亲和层析柱。比酶活为 41.4 U/mL, 结果见图 2。

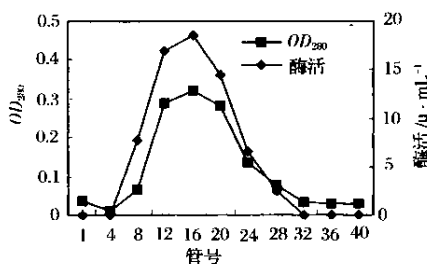


图 2 金属 Ni^{2+} 亲和层析

2.3.3 SDS-PAGE 分析

从亲和柱层析收集的活性峰酶液, 经浓缩后, 取 15 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果显示为单一条带, 达到了电泳纯(见图 3)。

纯化步骤以及相应的纯化效果列于表 1, 最终提纯倍数为 49.3 倍, 收率为 20.4%。

2.4 纯化重组酶的酶活性检测

对重组阿拉伯呋喃糖苷酶/ β -木糖苷酶进行初步酶学性质研究, 结果表明(图 4), 阿拉伯呋喃糖苷酶反应最适 pH 为 6.2, 最适温度为 80℃, 1 h 半衰期温度为 75℃; β -木糖苷酶反应最适温度为 85℃, 1 h 半衰期温度为 84℃; β -木糖苷酶反应最适温度为 85℃, 最

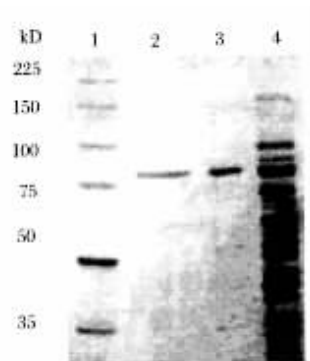


图 3 热稳定性 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶纯化过程电泳图

pH 为 5.7, 1 h 半衰期温度为 84℃; 与报道的来源于 *T. ethanolicus* 的阿拉伯呋喃糖苷酶/ β -木糖苷酶基本一致。

2.5 酶相对分子质量的测定

图 3 的 SDS-PAGE 电泳经凝胶图像分析扫描成像后, 以标准分子质量的蛋白迁移率为横坐标, 已知蛋白质相对分子质量的常用对数为纵坐标作图(见图 5), 得出回归方程 $\lg m = -1.0194 R_f + 2.3699$, 将纯化的重组酶蛋白的迁移率带入方程求得酶蛋白分子质量约为 85.90 ku 比理论推算值 85 ku 增

表 2 重组热稳定性 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶纯化结果

步 骤	总蛋白 /mg	比活力 /u·mg ⁻¹	总活力 /u	收率 /%	纯化倍数
分离纯化	1872	0.84	1572.5	100	1
热处理	249.0	4.42	1100.7	70.2	5.26
层 析	56.2	15.6	876.7	55.8	18.6
金属 Ni ²⁺ 系和层析	7.8	41.4	320.8	20.4	49.3

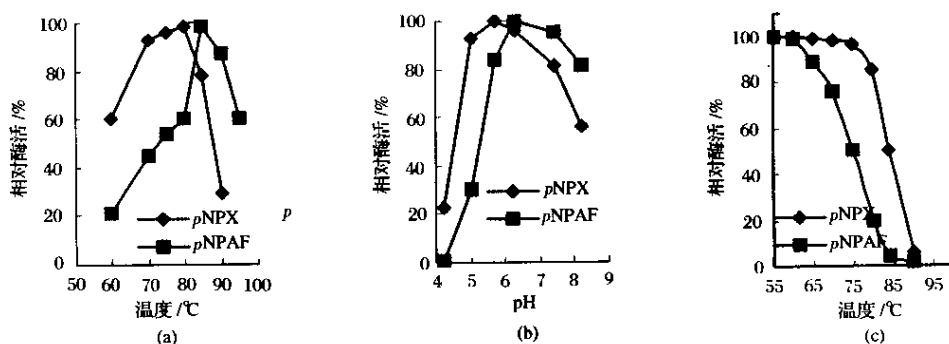


图 4 重组阿拉伯呋喃糖苷酶/ β -木糖苷酶的最适反应温度(a)、最适 pH(b)和热稳定性(c)

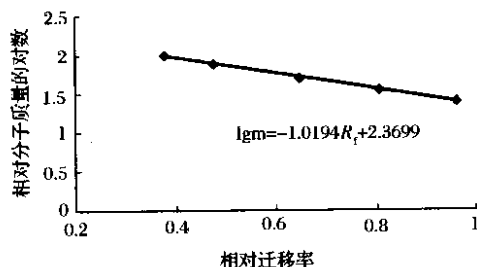


图 5 相对迁移率与 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的相对分子质量的关系

加了约 1%, 其可能的原因是在构建工程菌 *E. coli* JM109 (DE3) / pAlter-Ex1-xar 过程

中, 在 β -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶基因表达产物的 N 端融合了一个 6 个组氨酸的标签, 这样重组酶的分子质量就增加 6 个组氨酸的大小, 那么实际理论推算值应为 85.81 ku, 与测定值 85.90 ku 是吻合的。

3 讨 论

构建合适的极端菌和嗜热菌的外源表达系统, 高效率地表达一些极端耐热酶蛋白, 一直是研究的热点。嗜热厌氧菌 *T. ethanolicus* 是基因工程的理想材料, 利用已构建的表达嗜热乙醇菌 α -阿拉伯糖苷酶/

木糖苷酶的基因工程菌发酵,产生 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶,可以避免自然菌生长密度低和酶系复杂给 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的纯化带来的麻烦。在实验过程中,利用在常温菌 *E. coli* 中表达 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶对热的稳定性,将 *E. coli* JM109 (DE3) / pAlter-Ex1-xar 菌细胞破碎后的上清经过 70℃ 20 min 的热处理后,可以去除大量菌体蛋白,酶活收率达 70.2%,纯化倍数为 5.26 倍,这一结果表明工业化制备重组酶时可以采用此低成本的方法,重组 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶可利用 DEAE-Sephcel 阴离子交换柱层析进一步纯化,收率达 55.8%,纯化倍数为 18.6 倍。由于构建工程菌时在基因表达产物上融合了一个 6 个组氨酸的标签,经 Ni^{2+} 亲和层析柱使酶纯度达到电泳均一。最终通过热处理、DEAE-Sephcel 阴离子柱层析、金属 Ni^{2+} 的亲和层析提纯后,酶达到电泳纯时的提纯倍数为

49.3 倍,收率为 20.4%。SDS-PAGE 法测定 α -阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的分子质量为 85 ku,与理论推算值相吻合。本实验研究为其进一步的酶学性质鉴定和分析工作打下了良好的基础,也为重组酶的大规模工业化提取奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Sunna A, Autranikian G. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(1): 39 ~ 67
- 2 Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 326 ~ 338
- 3 邵蔚蓝,薛业敏. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 88 ~ 93
- 4 Debeche T, Cummings N, Connerton I et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1734 ~ 1736.
- 5 Shao W, Wiegel J. J Bacteriol, 1992, 174: 5848 ~ 5853
- 6 Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 5848 ~ 5853

Purification of Recombinant Thermostable Arabinofuranosidase-xylosidase

Xue Yemin Mao Zhonggui Shao Weilan

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,
Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

ABSTRACT The recombinant thermostable arabinofuranosidase-xylosidase from *T. ethanolicus* was purified from culture broth of gene engineering strain *E. coli* JM109 (DE3) / palter-Ex1-xar through following steps: a) heat precipitation; b) ion exchange chromatography on DEAE-sephacel; and c) immobilized metal affinity chromatography. The purified enzyme showed a single band on SDS polyacrylamide gel electrophoresis with a purification of 49.3 fold, and a yield of 20.4%. The optimum activity of arabinofuranosidase was found at pH 6.0 and 80℃, the enzyme had 1 h half-life at 75℃, The optimum activity of xylosidase was found at pH 5.7 and 85℃, the enzyme had 1 h half-life at 84℃. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of expressed recombinant products was 85.90. It was in good agreement with the molecular mass of enzyme of deduced from the DNA sequence, 85ku.

Key words arabinofuranosidase-xylosidase, gene engineering strain, recombinase purification



浙江海正集团新型降解塑料聚乳酸进入中试

海正集团有限公司研制的新型生物降解塑料——聚乳酸的研究成果于 2002 年 12 月通过了省级技术鉴定,于 2003 年 6 月进入中试阶段。