

文章编号: 1009-038X(2005)01-0019-05

Bacillus subtilis 木聚糖酶的纯化及其 对小麦麸皮的作用

袁小平, 姚惠源

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合, 从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 固体培养基发酵产物中分离得到了两种木聚糖酶。薄层色谱和高压液相色谱分析结果进一步表明它们具有内切木聚糖酶的活力, 分别定义为 xyl I 和 xyl II。两种酶具有相同的最适反应温度 (50 °C) 和最适 pH 值 (7.0)。另外, 还研究了内切木聚糖酶 xyl II 对小麦麸皮不溶性膳食纤维的作用。纸色谱分析结果表明, 酶解产物中含有阿魏酰低聚糖。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 电泳; 内切木聚糖酶; 小麦麸皮

中图分类号: Q 949.323

文献标识码: A

Purification of Endoxylanases from *Bacillus subtilis* and Their Actions on Wheat Bran

YUAN Xiao-ping, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A novel and convenient method based on native polyacrylamide gel electrophoresis and homogenization extraction was used for the purification of xylanase from crude enzymes. Two xylanases were purified by this method from the crude enzyme obtained from *Bacillus subtilis* fermentation. Subsequent analysis with thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography indicated that these xylanases were endo-acting enzymes, and designated as xyl I and xyl II. Both enzymes had similar optimum activities at pH 7.0 and 50 °C. The action of endoxylanase xyl II on wheat bran insoluble dietary fiber was also studied. The hydrolysis products contained feruloyl oligosaccharides by paper chromatography analysis.

Key words: *Bacillus subtilis*; electrophoresis; endoxylanase; wheat bran

小麦麸皮是谷物加工工业一种重要副产品, 主要由细胞壁多糖组成, 其中木聚糖约占干基质量的 40%^[1]。木聚糖主链由 β -1, 4-糖苷键相连的 β -D-吡喃型木糖残基聚合而成, 而单个的呋喃型阿拉伯糖

残基可通过 O-2 和 O-3 位连接在木糖残基上^[2]。小麦麸皮木聚糖的一个主要特征就是阿魏酸通过酯键与木聚糖侧链上的阿拉伯糖残基相连^[3]。阿魏酰基通过过氧化物酶的催化聚合作用在细胞壁多糖

收稿日期: 2004-03-01; 修回日期: 2004-05-17.

基金项目: 江苏省高等学校研究生创新计划项目 (No. 37) 资助课题.

作者简介: 袁小平 (1970-), 男, 江西新余人, 粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生。
万方数据

之间形成交联体,或者通过醚—酯键将木质素和多糖进行交联^[4]。

由于小麦麸皮木聚糖结构的复杂性,木聚糖的完全解聚需要一些专一性的酶。在众多可降解木聚糖的酶中, β -1,4-内切木聚糖酶(endo-1,4- β -D-xylan xylohydrolase, EC 3. 2. 1. 8)起主要作用^[5, 6]。木聚糖酶主要来自真菌和细菌,这些微生物在产木聚糖酶的同时,还产别的水解酶^[7, 8]。分离纯化木聚糖酶的常规方法有沉淀法、离子交换法、亲和色谱法和凝胶过滤色谱法等,分离过程往往步骤多,比较费时,并且在分离过程中还容易导致酶失活^[9]。

作者采用活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合的方法,从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)固体培养基发酵产物中分离得到了两种内切木聚糖酶。另外,对两种内切木聚糖酶的一些酶学性质及其对小麦麸皮不溶性膳食纤维的作用也进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

耐温 α -淀粉酶 Termamyl SC(EC 3. 2. 1. 1)、水解蛋白酶 Alcalase (EC 3. 4. 21. 62) 和精制糖化酶 AMG 300 L(EC 3. 2. 1. 3) 由诺维信中国总部提供; 桦木木聚糖和电泳试剂均为 Sigma 公司产品; 其它化学试剂均为分析级; Amberlite XAD-2 由上海罗门哈斯化工有限公司提供; 所用粗酶为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 固体培养基发酵产物, 由武汉新华杨生物有限公司惠赠; 小麦麸皮由宁夏银川新城粮油股份有限公司提供, 麸皮粉碎后, 过 0.5 mm 筛备用。

1.2 粗酶液制备

将 4 g 粗酶溶解在 100 mL 醋酸缓冲液(50 mmol/L, pH 值 5. 0) 中, 28 °C 下振摇 30 min, 以 5 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

1.3 活性聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白质制备

活性聚丙烯酰胺凝胶电泳参考 Davis^[10] 的方法。分离胶质量浓度为 10 g/dL, 样品缓冲液不含十二烷基硫酸钠(SDS) 和巯基乙醇, 板胶厚度 1 mm, 进样量为 100 μ L, 采用稳流 20 mA。电泳一旦完毕, 从板胶两侧纵向切下含有样品的少部分凝胶 2 条进行染色蛋白质染色采用考马斯亮蓝 G250 快速染色法^[11]。沿着未染色凝胶的边缘, 将染色凝胶与其拼成原样, 参考染色凝胶上的蛋白质谱带, 将未染色凝胶上的不同蛋白区带依次切下, 分别收集备用^[12]。所得活性蛋白质谱带用 25 mmol/L Tris-

HCl 缓冲液(pH 值 6. 7) 洗涤 3 次, 再用蒸馏水洗 3 次, 然后用吸管将胶条表面上的蒸馏水去除, 并捣碎成 2~5 mm 长的小块, 加入适量的 50 mmol/L 醋酸缓冲液(pH 值 5. 0), 用高速匀浆机(10 000 r/min) 不连续地破碎 3 min, 以 5 000 r/min 离心 20 min, 将凝胶去除, 上清液即为蛋白质溶液。为了获得足够的蛋白质, 上述步骤可以重复几次。

1.4 酶活分析

以桦木木聚糖为底物, 用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖的生成量^[13]: 取稀释酶液 1 mL 置于 50 °C 水浴保温 5 min, 然后加入到 1 mL 经 50 °C 保温的 1 g/dL 桦木木聚糖中, 旋转混匀, 50 °C 下反应 30 min, 加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂, 旋转混匀, 沸水浴中显色 5 min, 用冰水快速冷却, 加蒸馏水定容至 10 mL, 550 nm 下测定吸光度, 用木糖做标准曲线。

1.5 木聚糖酶水解产物分析

1.5.1 薄层色谱 硅胶 G 薄板, 展开剂为 V(正丁醇): V(吡啶): V(蒸馏水)=6: 4: 3, 低聚糖用邻苯二甲酸苯胺试剂染色。

1.5.2 高压液相色谱 色谱仪器为美国 Waters 公司 600 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Sugar-PakTM 1 柱(300 mm \times 6. 5 mm), 柱温保持在 85 °C, 流动相为水, 体积流量为 0. 5 mL/min; 检测信号由 Waters 2410 型示差折光检测器监测。酶解产物进样前用 0. 45 μ m 的微孔滤膜过滤。

1.6 小麦麸皮不溶性膳食纤维的制备

小麦麸皮 10 g 经正己烷脱脂, 空气挥发干溶剂后, 用高压蒸汽在 121 °C 处理 45 min, 使其内源性酶失活^[14]。将处理过的小麦麸皮悬浮在 300 mL 水中, 60 °C 下连续搅拌 16 h, 使其充分溶胀, 接着加入 0. 75 mL 耐温 α -淀粉酶 Termamyl SC 后, 混合物在沸水浴中搅拌 40 min。悬浮液冷却至 60 °C 后, 用 275 mmol/L NaOH 溶液调 pH 值至 7. 5, 再加入水解蛋白酶 Alcalase 0. 3 mL, 60 °C 下连续搅拌 30 min, 然后用 325 mmol/L HCl 调 pH 值至 4. 5, 再加入精制糖化酶 AMG 300 L 0. 35 mL, 60 °C 下连续搅拌 30 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 沉淀用热蒸馏水反复洗涤, 直至用冷蒸馏水洗涤时悬浮液无浑浊, 再用热蒸馏水、体积分数 95% 乙醇和丙酮接连地洗涤两次, 5 000 r/min 离心 30 min, 最终的沉淀物在 40 °C 下真空干燥 24 h, 得到小麦麸皮不溶性膳食纤维^[15]。

1.7 酶解小麦麸皮不溶性膳食纤维

将 1 g 小麦麸皮不溶性膳食纤维悬浮于 40 mL

用醋酸缓冲液(50 mmol/L, pH 值 5.0)稀释过的内切木聚糖酶液中,于恒温水浴中 50 °C 避光反应 60 h,最后 100 °C 灭酶活 10 min,以 5 000 r/min 离心 30 min,上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜,滤液备用。

1.8 阿魏酰低聚糖的分离

小麦麸皮不溶性膳食纤维酶解产物上 Amberlite XAD-2 柱(30 cm×2.5 cm),柱预先用体积分数 95%乙醇洗涤,再用蒸馏水平衡。依次用 2 倍柱体积的蒸馏水、3 倍柱体积的体积分数 50%甲醇水溶液和 2 倍柱体积的体积分数 100%甲醇进行洗脱。将体积分数 50%甲醇溶液洗脱,组分浓缩至 5 mL,浓缩液中的阿魏酰低聚糖用新华 3 号层析滤纸进行纸色谱分析。纸色谱采用下行展开,展开溶剂为 V(正丁醇):V(乙酸):V(蒸馏水)=12:3:5^[16],阿魏酰低聚糖分离后,暴露于氨气中,暴露前后用紫外照射进行定位^[17],然后用草酸苯胺试剂染色 V(体积分数 2%的苯胺乙醇溶液):V(2 g/dL 草酸溶液)=2:3^[18]。

2 结果与讨论

2.1 活性聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白质制备

木聚糖酶的分离纯化通常至少需要 2 至 3 个色谱过程^[19]。为了减少木聚糖酶的分离纯化过程,将活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合分离纯化了枯草芽孢杆菌木聚糖酶。影响活性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离效果的条件较多,但最主要的因素有分离胶缓冲液的离子强度和 pH 值,选择质量浓度 10 g/dL 分离胶,375 mmol/L pH 值 8.9 Tris 盐酸分离胶缓冲液,50 mmol/L Tris 384 mmol/L 甘氨酸(pH 值 8.3)电极缓冲液电泳体系,在稳流 20 mA 下,约 3 h 电泳就可以完成,并且分离木聚糖酶可以获得良好的分辨率。从图 1 可以看出,枯草芽孢杆菌木聚糖酶液经活性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,获得了 5 条清晰可见的蛋白质谱带,依相对分子质量从小到大大分别定义为谱带 1,谱带 2,谱带 3,谱带 4 和谱带 5。根据材料与方法中的蛋白质制备过程,5 种不同的蛋白质通过均质提取可以完全纯化出来。这种将活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合分离纯化蛋白质的方法可以节省大量时间。

2.2 内切木聚糖酶的鉴定

2.2.1 蛋白质的酶活力分析 将 5 种不同蛋白质的稀释溶液各 1 mL 分别与 1 g/dL 桦木木聚糖混合,反应温度为 50 °C,反应 30 min,在 550 nm 下比色测定反应生成的还原糖,越高的吸收值表明生成

的还原糖含量越高,意味着酶的活力越高。在这 5 种蛋白质谱带中,只有谱带 4 和谱带 5 对木聚糖显示出酶活力,从而表明这两种蛋白质谱带是木聚糖酶。由此可以看出,粗酶经活性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,蛋白质的生物活性能够保存下来的主要原因是在电泳体系中不含有影响蛋白质电荷的解离剂。因此,活性聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种分离具有生物活性的蛋白质有效方法。

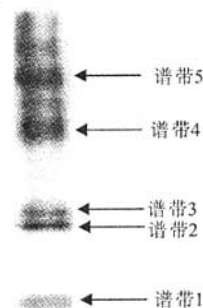


图 1 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)木聚糖酶活性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 Native PAGE of xylanases from *Bacillus subtilis*

2.2.2 木聚糖酶水解方式分析 将蛋白质谱带 4 和谱带 5 分别与 1 g/dL 桦木木聚糖混合,反应温度为 50 °C,反应 24 h,水解产物先用薄层色谱法分析,结果表明产物主要是木二糖、木三糖、木四糖和聚合度更高的低聚木糖,而没有木糖。由此说明,蛋白质谱带 4 和谱带 5 随机地降解木聚糖主链上的糖苷键。蛋白质谱带 5 的酶解产物再用高压液相色谱分析,所得结果与薄层色谱结果基本一致(见图 2)。这些结果进一步表明蛋白质谱带 4 和谱带 5 属于典型的内切木聚糖酶,分别定义为 xyl I 和 xyl II。

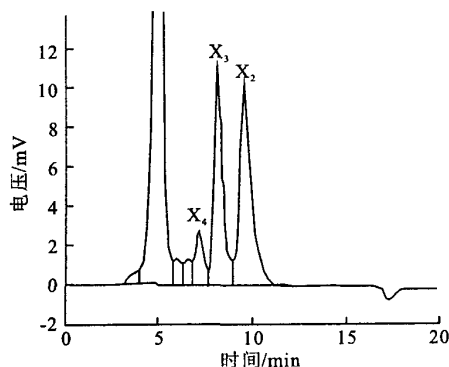


图 2 活性蛋白质谱带 5 的水解产物 HPLC 图(X₂:木二糖,X₃:木三糖,X₄:木四糖)

Fig. 2 HPLC of the birchwood xylan hydrolysate by purified xylanase band 5 (X₂: xylobiose; X₃: xylotriase; X₄: xyloetraose)

2.3 温度和 pH 值对内切木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 的酶活影响

内切木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 与 1 g/dL 木聚糖混合,在不同温度下分别反应 30 min,3,5-二硝基水杨酸法测定酶活(见图 3),结果发现此两种内切木聚糖酶的最适反应温度为 50℃,随着温度的升高,它们的相对活力迅速下降,最终在 80℃ 两者几乎完全失活。

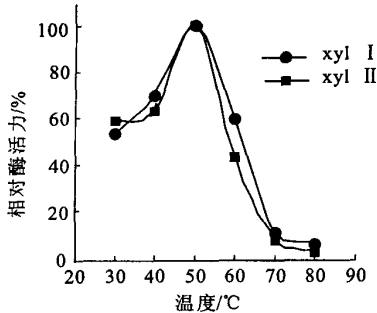


图 3 温度对枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 的酶活影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activities of purified endoxylanases xyl I and xyl II from *Bacillus subtilis*

以桦木木聚糖为底物,分别采用 50 mmol/L 醋酸-醋酸钠(pH 值 4.0~5.0),50 mmol/L 磷酸二氢-氢氧化钠(pH 值 6.0~8.0)和 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠(pH 值 9.0~10.0)组成的缓冲液,50℃反应 30 min,3,5-二硝基水杨酸法测定内切木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 在一系列 pH 值下的活力(见图 4),结果发现此两种内切木聚糖酶的最适 pH 值为 7.0,内切木聚糖酶 xyl I 在 pH 值 6.0~8.0 范围内活力保持在 90%以上,内切木聚糖酶 xyl II 在 pH 值 6.0~9.0 范围内有较高的活力,在 pH 值 4.0 和 pH 值 10.0 时,活力低于 10%。当 pH 值大于 9.0 时,因酶变性,二者的酶活力急剧下降。

2.4 内切木聚糖酶 xyl II 对小麦麸皮不溶性膳食纤维的作用

由于小麦麸皮不溶性膳食纤维中的细胞壁多糖主要是阿拉伯木聚糖,其结构的一个主要特征就是阿魏酸通过酯键与木聚糖侧链上的阿拉伯糖残基相连^[20],内切木聚糖酶能随机地断开木聚糖主链上的糖苷键。由此可以推断,在利用枯草芽孢杆菌木聚糖酶酶解小麦麸皮不溶性膳食纤维得到的木聚寡糖混合物中,有的低聚糖还可能保留有阿魏酸酯键。

小麦麸皮不溶性膳食纤维在 pH 值 5.0 时用木
万方数据

聚糖酶水解,水解产物经过离心、微孔滤膜过滤,可以除去没有反应的不溶性膳食纤维和其它杂质。滤液经浓缩后,装载在 Amberlite XAD-2 柱上,因为 Amberlite XAD-2 是一种能够结合芳香族化合物的吸附剂^[21],所以阿魏酰低聚糖能够吸附在柱上。没有酯化的低聚糖可以先用水进行洗脱下来,吸附在柱上的阿魏酰低聚糖可用体积分数 50% 甲醇水溶液进行洗脱。将体积分数 50% 甲醇水溶液洗脱组分浓缩后应用于纸色谱,分离的化合物在紫外光照射下产生蓝色荧光,经氨气熏后,蓝色荧光转变成绿色,由此表明这些化合物属于阿魏酰低聚糖^[22],用草酸苯胺试剂染色到至少产生 4 个微红色的亮点(见图 5)。这进一步表明,内切木聚糖酶 xyl II 随意断开木聚糖主链上的糖苷键,酯化的阿魏酸没有限制内切木聚糖酶对小麦麸皮不溶性膳食纤维中阿拉伯木聚糖的降解。

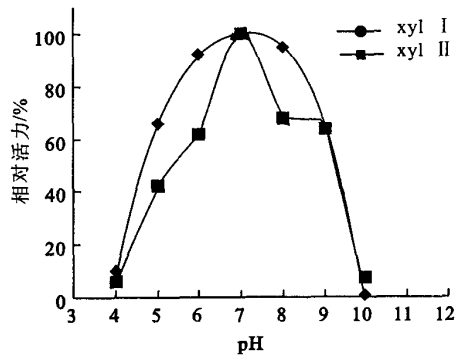


图 4 pH 对枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 的酶活影响

Fig. 4 Effect of pH on the activities of purified endoxylanases xyl I and xyl II from *Bacillus subtilis*



图 5 小麦麸皮不溶性膳食纤维酶解产物纸色谱图

Fig. 5 Paper chromatography of hydrolysis products of wheat bran insoluble dietary fiber incubated with purified endoxylanase xyl II

3 结 论

1) 活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合能够有效地将枯草芽孢杆菌粗酶中的活性蛋白质分离纯化出来,该方法简便、快速。

2) 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)所产内切

木聚糖酶 xyl I 和 xyl II 具有一样的最适温度(50℃)和 pH 值(7.0)。此两种内切酶对桦木木聚糖有相同的作用方式,产物以低聚木糖为主,不含有木糖。

3) 内切木聚糖酶 xyl II 具有水解小麦麸皮不溶性膳食纤维的能力,酶解产物中含有阿魏酰低聚糖。

参考文献:

- [1] Thiago LR, Kellaway R. Botanical composition and extent of lignification affecting digestibility of wheat and oat straw and pastalum hay[J]. **Anim Feed Sci Technol**, 1982, (7):71-81.
- [2] Izydorczyk MS, Biliaders CG. Structural heterogeneity of wheat endosperm arabinoxylan[J]. **Cereal Chem**, 1993, 70:641-646.
- [3] Smith MM, Hartley RD. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminaceous plants[J]. **Carbohydr Res**, 1983, (118):65-80.
- [4] Ishii T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides[J]. **Plant Sci**, 1997, (127):111-127.
- [5] Breccia JD, Sñeriz F, Baigori MD, et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliuefaciens*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1997, (22):42-49.
- [6] SÁ-percia P, Costa-Ferreira MC, Aires-Barros MR. Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)-xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*[J]. **J Biotechnol**, 2002, 94:265-275.
- [7] XU J, Takakuwa N, Nogawa M, et al. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1998, 49:718-724.
- [8] Tolan JS, Foody B. Cellulase from submerged fermentation[J]. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 1999, (65):41-67.
- [9] Gawande PV, Kamat MY. Purification of *Aspergillus sp.* xylanase by preparation with an anionic polymer eudragit S100[J]. **Process Biochem**, 1999, 34:577-580.
- [10] Davis BJ. Disk electrophoresis. II. method and application to human serum proteins[J]. **Ann NY Acad Sci**, 1964, 121:404-427.
- [11] 张树政, 孟广震, 何忠效. 酶学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 89-92.
- [12] Hames BD, Rickwood D. Gel Electrophoresis of Proteins; A Practical Approach, Second Ed. [M]. Oxford; IRL Press, 1990. 1-86.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Anal Chem**, 1959, 31:426-428.
- [14] Zilliox C, Debeire P. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase; adsorption and kinetic studies[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1998, (22):58-63.
- [15] Bunzel M, Ralph J, Marita JM, et al. Diferulates as structural components in soluble and insoluble dietary fibre[J]. **J Sci Food Agric**, 2001, 81:653-660.
- [16] Wende G, Fry SC. Digestion by fungal glycanases of arabinoxylans with different feruloylated side chains[J]. **Phytochemistry**, 1997, 45:1123-1129.
- [17] Smith BG, Harris PJ. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls[J]. **Phytochemistry**, 2001, 56:513-519.
- [18] Lequart C, Nuzillard JM, Kurek B, et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl oligosaccharides[J]. **Carbohydr Res**, 1999, (319):102-111.
- [19] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. **FEMS Microbiol Rev**, 1999, 23:411-456.
- [20] Maes C, Delcour JA. Structural characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran[J]. **J Cereal Sci**, 2002, 35:315-326.
- [21] Saulier L, Vigouroux J, Thibault JF. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran[J]. **Carbohydr Res**, 1995, 272:241-253.
- [22] Harris PJ, Hartley RD. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy[J]. **Nature**, 1976, 259:508-510.

(责任编辑:杨萌)