

Bacillus pumilus WL-11 木聚糖酶 A 的纯化、鉴定及其底物降解方式 Identification and Mode of Action of a Xylanase A Purified from the Culture Filtrate of *Bacillus pumilus* WL-11

许正宏¹, 陶文沂^{1,2*}

XU Zheng-Hong¹ and TAO Wen-Yi^{1,2*}

1. 江南大学生物工程学院, 无锡 214036

2. 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214036

1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 对一株 *Bacillus pumilus* WL-11 木聚糖酶的纯化、酶学性质及其底物降解模式进行了研究。经过硫酸铵盐析、CM-Sephadex 及 Sephadex G-75 层析分离纯化, 获得一种纯化的 WL-11 木聚糖酶 A, 其分子量为 26.0kD, pI 值 9.5, 以燕麦木聚糖为底物时的表现 K_m 值为 16.6mg/mL, V_{max} 值为 1263 μ mol/(min·mg)。木聚糖酶 A 的 pH 稳定范围为 6.0 至 10.4, 最适作用 pH 范围则在 7.2 至 8.0 之间, 是耐碱性木聚糖酶; 最适作用温度为 45 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C, 在 37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 以下时该酶热稳定性均较好; 50 $^{\circ}$ C 保温时, 该酶活力的半衰期大约为 2h, 在超过 50 $^{\circ}$ C 的环境下, 该酶的热稳定较差, 55 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 时的酶活半衰期分别为 35min 和 15min。WL-11 木聚糖酶 A 对来源于燕麦、桦木和榉木的可溶性木聚糖的酶解结果发现, 木聚糖酶 A 对几种不同来源的木聚糖的降解过程并不一致。采用 HPLC 法分析上述底物的降解产物生成过程发现木聚糖酶 A 为内切型木聚糖酶, 不同底物的降解产物中无单糖的积累, 且三糖的积累量都较高; 与禾本科的燕麦木聚糖底物降解不同的是, 木聚糖酶 A 对硬木木聚糖降解形成的五糖的继续降解能力较强。采用 TLC 法分析了 WL-11 粗木聚糖酶降解燕麦木聚糖的过程, 结果表明燕麦木聚糖能够被 WL-11 粗木聚糖酶降解生成系列木寡糖, 未检出木糖, 这说明 WL-11 主要合成内切型木聚糖酶 A, 同时发酵液中不含木糖苷酶, 适合用来酶法制备低聚木糖。

关键词 短小芽孢杆菌, 木聚糖酶, 纯化, 底物降解

中图分类号 Q814.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0407-07

Abstract Microbial xylanases have received a great deal of attention in the last two decades for their potential applications in food, paper making and animal feed industries. *Bacillus pumilus* WL-11 was identified as a producer of alkane xylanase free of cellulase after screening soil samples of paper-making factories. The xylanase A (XylA) was purified to homogeneity from the culture filtrate of *Bacillus pumilus* WL-11 by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, CM-Sephadex and Sephadex G-75 chromatographies. The molecular mass of XylA is estimated to be 26.0 kD by SDS-PAGE and its isoelectric point is 9.5. The apparent K_m is

Received: November 11, 2004; Accepted: December 31, 2004.

This work was supported by grants from the National Tenth Five Years Plan Key Technologies R&D Programs of China (No. 2001BA708B04-02, 2004BA713B04-03) and the Natural Sciences Foundation of Jiangsu Province (No. BK2001021).

* Corresponding author. Tel: 86-510-5862412; E-mail: wytao@sytu.edu.cn

国家“十五”科技重点攻关项目(No. 2001BA708B04-02, 2004BA713B04-03)及江苏省自然科学基金项目(No. BK2001021)资助。

16.6mg/mL and V_{max} is 1263 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ towards oat spelt xylan. XylA is optimally active between pH 7.2 and 8.0, and stable at pH 6.0 to 10.4. The enzyme is optimally active at 45°C - 55°C and stable at temperature below 45°C, with its half time of activity of 35 min and 15 min at 55°C and 60°C respectively. HPLC analysis revealed that hydrolysis patterns of xylans from oat spelt, birch wood and beech wood by purified XylA were different. The XylA is determined to be an endo- β -1,4-xylanase, as it generated mainly xylo-oligosaccharides and no xylose was detected among the three hydrolysates. XylA has strong hydrolytic activity towards the pentose in the hydrolysates of beech wood and birch wood xylans, but was not active to the pentose in the hydrolysate of oat spelt xylan. The crude WL-11 enzyme can efficiently hydrolyze oat spelt xylan to a series of xylo-oligosaccharides, suggesting its potential application in nutraceutical industry.

Key words *Bacillus pumilus*, xylanase, purification, substrate hydrolysis, xylo-oligosaccharide

木聚糖酶(xylanase, EC 3.2.1.8)是一类能特异降解木聚糖的酶类,是木聚糖开发利用的重要工具酶,近20年来这方面的研究呈方兴未艾之势,国内外相关研究论文有3000多篇(引自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>及CNKI中国期刊全文数据库),并且每年有数百篇新的研究论文发表。木聚糖酶有着极其广泛的应用,可用做纸浆和造纸工业中的生物漂白剂^[1]、食品工业的改良剂^[2]、饲料工业的添加剂^[3]等,还可用来酶法制备低聚木糖^[4]。近年来,亦有研究事实证明木聚糖酶在植物组织中具有重要的生理功能,它可能与果实软化、种子发芽以及植物防御机制有关^[5]。其中,最令人感兴趣的还是木聚糖酶在纸浆生物漂白(bio-bleaching)及酶法制备低聚木糖上的应用研究。

对不同木聚糖酶的底物降解方式缺乏了解是制约木聚糖酶高效工业应用的一个重要因素。但由于木聚糖分子结构的复杂性和微生物木聚糖酶的多样性,木聚糖酶的底物降解方式的研究显得较为困难。研究者通常采用动力学分析或降解终产物分析等技术来研究木聚糖酶与底物的结合位点和底物降解的作用方式。其中,终产物分析技术是最为常用的手段包括高压液相层析(HPLC)法、薄层层析(TLC)法等^[6-8]。

本研究室从分析环境中微生物木聚糖酶产生菌的生态分布入手,在此基础上建立了一个小型的微生物木聚糖酶菌种库^[9]。从该库中分离获得了一株细菌木聚糖酶产生菌短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* WL-11),初步研究了其木聚糖酶生物合成机制^[10]。该菌不产纤维素酶,少产或不产木糖苷酶,具有很好的工业应用价值。为进一步分析研究该菌木聚糖酶的性质及其工业应用价值,本文报告了WL-11木聚糖酶的分离纯化、酶学性质的研究结果;分析了纯化的WL-11木聚糖酶A对来源于燕麦、桦木和榉木的木聚糖(Sigma产品)的降解过程,采用HPLC法分析

了它们的降解产物生成过程,并在此基础上探讨了木聚糖酶A降解木聚糖底物的作用方式。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种及WL-11木聚糖酶的制备

由本实验室筛选并保藏的耐碱性木聚糖酶产生菌短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* WL-11)^[10]。采用含有麸皮(60g/L)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8g/L)、 K_2HPO_4 (4g/L)、pH 8.5的产酶培养基37°C培养WL-11约36h后4°C,10000 \times g离心15min去除菌体及培养基残渣,获得木聚糖酶粗酶液。

1.2 酶的分离纯化

1.2.1 硫酸铵盐析:采用50%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析上述粗酶液得到沉淀。取上述沉淀适量溶于0.04 mol/L pH 7.6的巴比妥钠-盐酸缓冲液中,4°C去离子水透析24h除盐(中间换水1次),浓缩,得到的浓缩酶液用于下一步实验。

1.2.2 CM-Sephadex层析:将上述得到的酶液加样到经pH 6.0的0.02 mol/L磷酸缓冲液预平衡的CM-Sephadex(Pharmacia产品)柱($\phi 2.6\text{ cm} \times 25\text{ cm}$)上,以含有不同浓度NaCl的pH 6.0的0.02 mol/L磷酸缓冲液洗脱阶段洗脱,流速为1.5 mL/min,每管收集10 mL,NaCl浓度分别为0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.6 mol/L,合并具有木聚糖酶活性的洗脱液,浓缩。

1.2.3 SephadexG-75层析:将上述浓缩样品加样到pH 6.0的0.02 mol/L磷酸缓冲液预平衡的AKTA-Explore SephadexG-75(Pharmacia产品)柱($\phi 2.6\text{ cm} \times 60\text{ cm}$)上,以pH 6.0的0.02 mol/L磷酸缓冲液洗脱,流速为2 mL/min,每管收集10 mL,收集具有酶活性的洗脱液并浓缩,冻干后冰箱冻存备用。

1.3 蛋白质含量测定

按文献[11]进行,以牛血清白蛋白为标准。

1.4 木聚糖酶活力的测定

取0.5 mL用pH 7.6,0.04 mol/L的巴比妥钠缓冲

液适当稀释的木聚糖酶液,加入 1mL 采用同样缓冲液配制的 1% 的木聚糖(Oat Spelt, Sigma)溶液,50℃保温 30min 后,DNS 法测定还原糖量(以木糖为标准)。酶活力定义为上述条件下,每分钟释放 1 μ mol 的木糖的酶量为 1 个酶活力单位(u)。

1.5 木聚糖酶的性质

1.5.1 酶的动力学特征:以 2 g/L 至 10 g/L 木聚糖(Oat spelt, Sigma)为底物,分别加入 2 μ g/mL 的木聚糖酶 A,以单位酶量在单位时间降解木聚糖底物所释放的还原糖量(以木糖计)表征反应速度,用 Lineweave-Burk 做图法,分别求出木聚糖酶的动力学常数 K_m 和 V_{max} 值。

1.5.2 热稳定性研究:将上述纯酶用 0.04mol/L, pH 值为 7.6 的巴比妥钠缓冲液适当稀释后,将酶液分别在不同温度下保温,每隔 10min 取样,快速冷却至室温后,按常规方法测定残存酶活性,以初始酶活力为 100%。

1.5.3 酸碱稳定性:将纯酶分别用 pH 值为 2.7, 3.7, 4.1, 5.7 的 0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液, pH 值为 6.80, 7.2, 7.6, 8.1, 8.6 的 0.04mol/L 的巴比妥钠缓冲液以及 pH 值为 9.6, 10.5 的 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液适当稀释后,4℃放置 24h 后,调整 pH 值至 7.6 后测其残存酶活性,以残存酶活力最高者为 100% 计。

1.5.4 酶促反应最适温度:用 0.04mol/L, pH 值 7.6 的巴比妥钠缓冲液适当稀释纯酶液,在不同温度下反应 30min,测定其酶活力,以酶活力最高者为 100%。

1.5.5 酶促反应的最适 pH: 分别用不同体系、不同 pH 的缓冲液稀释纯酶液,按常规方法测定酶活力,以酶活力最高者为 100% 计。

1.5.6 金属离子对酶活的影响:在反应体系中分别加入 5 mmol/L 的各种不同金属离子溶液,测定木聚糖酶活力,观察金属离子对酶活力的影响,以不加金属离子的为对照。

1.6 木聚糖降解产物的 TLC 分析

参见文献[12]。

1.7 WL-11 木聚糖酶 A 对不同来源的木聚糖底物降解及产物 HPLC 分析

分别称取一定量的不同来源的木聚糖(Sigma 公司产品),用 pH 7.6 的 0.04mol/L 巴比妥钠缓冲液配置成一定浓度的木聚糖溶液后 12000r/min 离心 10min,取上清液制备成可溶性木聚糖溶液,分别取上述可溶性木聚糖溶液测定总糖,每克总糖加入 800 u 的 WL-11 木聚糖酶 A,40 ~ 45℃缓慢振荡反

应,分别于 0、5、10、20、40、60min 取样,取样后立即放入沸水浴保温 3min 灭酶。

分别测定上述样品总糖、还原糖;同时将上述样品经 0.22 μ m 滤膜过滤后,对降解产物进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件为:氨基糖苷柱 ZARBAX NH₂, 流动相为乙腈:水 = 85:15 (V/V),示差折光检测,温度 30℃。木寡糖标样为日本和光株式会社产品,归一化法计算各组分的含量。

1.8 总糖、还原糖的测定^[12]

平均聚合度为反应体系中总糖与还原糖的比值。

2 结果

2.1 WL-11 木聚糖酶的分离与纯化结果

将经 50% 饱和度盐析得到的粗酶样品上 CM-Sephadex 柱,以不含 NaCl 的磷酸缓冲液洗脱可以将粗酶中不含木聚糖酶的大部分杂蛋白有效去除,经含 0.2 mol/L 的 NaCl 的缓冲液洗脱后可以得到含木聚糖酶活性的蛋白峰 B(图 1)。采用中压层析系统 AKTA-Explore 的 Sephadex G-75 柱对 B 峰样品进

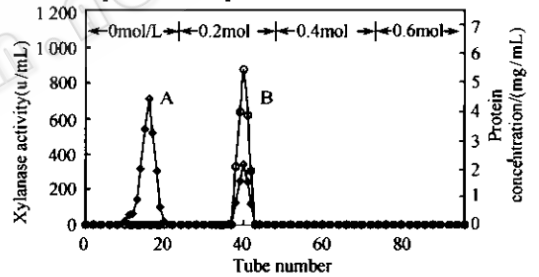


图 1 CM-Sephadex 的洗脱曲线

Fig.1 Purification of xylanase by CM-Sephadex column chromatography

○ xylanase activity; ◇ protein concentration.

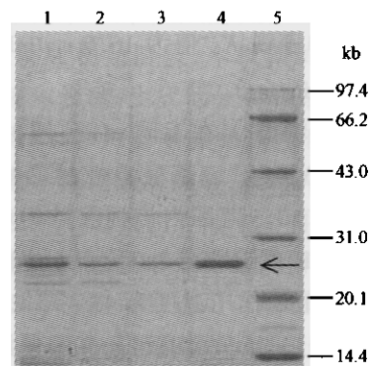


图 2 木聚糖酶 SDS-PAGE 电泳图(12%)

Fig.2 SDS-PAGE examination of xylanase purification 1: culture filtrate of *Bacillus pumilus* WL-11, 2: after (NH₄)₂SO₄ precipitation, 3: peak B from CM-Sephadex chromatography, 4: purified xylanase A after Sephadex G-75 chromatography, 5: protein molecular marker. The arrow indicates the position of xylanase A.

行进一步的分离纯化,经 G-75 进一步分离后获得获得了色谱纯的酶蛋白,将该纯酶命名为 WL-11 木聚糖酶 A。

通过 12% 的 SDS-PAGE 电泳测定分离纯化过程中蛋白质的变化情况并检验木聚糖酶 A 的纯度,

结果如图 2:随着纯化步骤的进行,酶样品中杂蛋白含量逐步降低,纯化后的木聚糖酶 A 在 12% 的 SDS-PAGE 胶上呈单一条带。

根据上述结果,总结 WL-11 木聚糖酶分离纯化的结果如表 1。

表 1 WL-11 木聚糖酶分离纯化的实验结果
Table 1 Purification of xylanase produced by WL-11

Step	Total protein/mg	Total Activity/u	Specific activity/(u/mg)	Activity recovery/%	Purification fold
Crude extract	1680	86528	51.5	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	1204	77899	64.7	90.0	1.3
CM-Sephadex	40	16600	415	19.2	8.1
SephadexG-75	4.32	4860	1125	5.6	21.8

2.2 WL-11 木聚糖酶 A 的性质

经过一系列分离纯化后,得到了电泳纯的木聚糖酶 A(图 2 列 4),等电聚焦电泳结果表明木聚糖酶 A 的 pI 值为 9.5(图谱未给出)。根据低分子量标准蛋白质的相对迁移率所作的标准曲线(图 3),估算该酶蛋白分子量约为 26.0 kD。

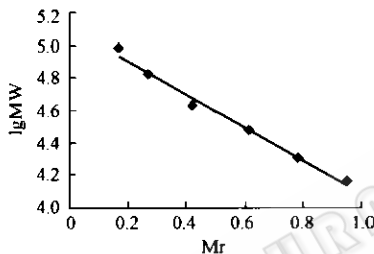


图 3 用低分子量标准蛋白质所作的标准曲线
Fig.3 Standard curve of relative migration and molecular weight of proteins

采用 Lineweaver-Burk 作图法分析了木聚糖酶 A 的酶活-底物浓度关系,计算木聚糖酶 A 以燕麦木聚糖为底物时的表现 K_m 值为 16.6 mg/mL, V_{max} 值为 1263 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

WL-11 木聚糖酶 A 在不同 pH 值缓冲液中 4℃ 放置 24h 后测定 pH 对该酶稳定性的影响,结果表明,在 pH 6.0 至 10.5 范围内该酶保持相对稳定,但该酶最作用 pH 范围则在 7.0 至 8.0 之间,为一耐碱性木聚糖酶;最作用温度为 45~55℃,在 37℃、45℃ 以下时该酶热稳定性均较好;50℃ 保温时,该酶活力的半衰期大约为 2h,在超过 50℃ 的环境下,该酶的热稳定较差,55℃ 和 60℃ 时的酶活力半衰期分别为 35min 和 15min。

Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子对 WL-11 木聚糖酶具有强力的抑制作用(抑制率 > 95%); Ca^{2+}

Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 及 Li^+ 等则对该酶具有一定的激活作用(激活率在 2%~20%之间); Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等离子对该酶的活性有一定的抑制作用(抑制率 < 20%)。

2.3 WL-11 木聚糖酶 A 对不同来源的木聚糖降解过程的分析

采用 WL-11 木聚糖酶 A 分别对来自于燕麦(oat spelt)、榉木(beech wood)、桦木(birch wood)进行降解,随着 WL-11 木聚糖酶 A 对几种可溶性木聚糖的酶解过程的进行,体系中还原糖的量不断增加。综合考虑酶解体系中还原糖的增量及降解产物的平均聚合度的变化可以发现,WL-11 木聚糖酶 A 对几种不同来源的木聚糖的降解过程并不一致,即对不同的木聚糖底物的作用方式存在差异。

进一步采用 HPLC 法分析木聚糖酶 A 降解不同来源的木聚糖产物组成及其生成过程,结果如图 4。由图 4A 可以看出,随着反应时间的增加,反应体系中木三糖和木五糖的含量逐渐增加,20min 后逐渐趋于平衡;体系中木四糖和木六糖的量在 20min 达到最高,随后逐渐下降;木二糖在反应起始阶段积累较少,20min 后积累量逐渐增加,但总量较木三糖和木五糖的量稍低。反应至 60min 时,降解产物中以三糖和五糖为主。此外,整个反应过程中未检测出木糖,这表明 WL-11 木聚糖酶 A 是一个内切型木聚糖酶。

由图 4B 及图 4C 可以看出,WL-11 木聚糖酶 A 降解榉木和桦木木聚糖的主要产物为三糖。分析两者的降解过程发现酶 A 对于它们的降解存在一定的差异,对于桦木木聚糖而言,体系中除木三糖的积累外,还有少量的四糖、五糖及二糖的积累;对于来源于榉木的木聚糖而言,反应初期木聚糖降解生成

的四糖、五糖和六糖,能够较快地降解生成小分子的寡糖,具体表现为反应初始阶段,体系中这些糖的含
量短暂升高即迅速降低。

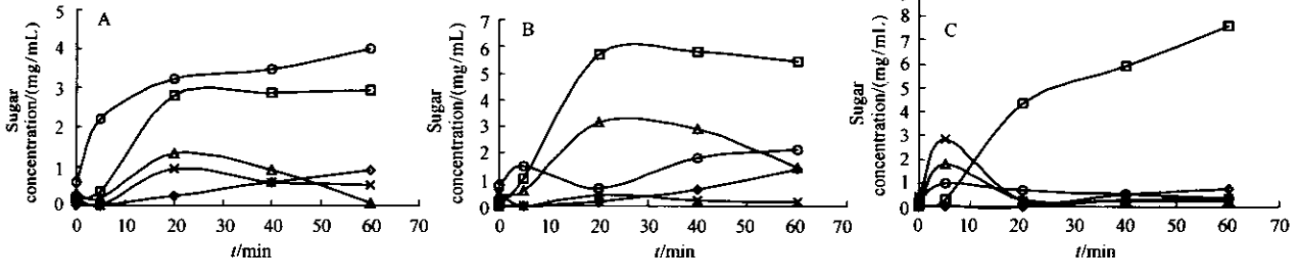


图4 WL-11 木聚糖酶 A 降解不同来源可溶性木聚糖产物的分析结果

Fig.4 Products analysis of different soluble xylans hydrolyzed by purified WL-11 xylanase A

A:Oat spelt xylan; B: Birch wood xylan; C: Beech wood xylan.

◇ xylobiose; □ xylotriiose; △ xylo tetraose; ○ xylopentose; x xylohexaose.

2.4 菌株 WL-11 粗木聚糖酶降解燕麦木聚糖产物的 TLC 分析

在木聚糖酶的生产与应用过程中,很难在下游过程中规模化的分离纯化获得成分单一的木聚糖酶产品。因此,对粗酶制剂降解木聚糖底物的特性进行研究将有助于指导酶的工业应用。

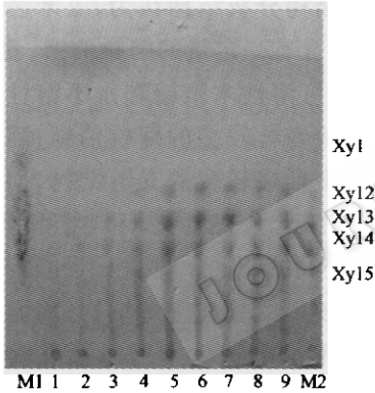


图5 WL-11 木聚糖酶降解燕麦木聚糖的产物的 TLC 分析

Fig.5 TLC analysis of time course of oat spelt xylan hydrolysed by crude WL-11 xylanase

M1, xylose; Lanes 1,2, ..., 9: samples hydrolyzed in 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 and 120min respectively; M2, xylo-oligosaccharides mixture; xyl, xylose; xyl2, xylobiose; xyl3, xylotriiose; xyl4, xylo tetraose; xyl5, xylopentose.

采用 WL-11 发酵获得的粗木聚糖酶,对商品燕麦木聚糖(Oat spelt, Sigma)进行降解(反应条件同 1.7),采用 TLC 法分析其降解产物,结果见图 5:随着反应时间的增加,燕麦木聚糖逐渐被 WL-11 木聚糖酶降解生成一系列寡糖。整个反应过程,体系中三糖相对含量较高;由于 TLC 法的灵敏度不够,无法将木六糖以上的寡糖单体有效分开,但可以看出,反应至 120 min,体系中仍有一定量的大分子寡糖或聚糖存在(图 5 列 9)。令人高兴的是降解产物中未

检出木糖,这说明菌株 WL-11 主要分泌合成内切型木聚糖酶 A,同时该菌不产或少产木糖苷酶。上述结果提示 WL-11 木聚糖酶十分适合用来酶法制备低聚木糖。

3 讨论

3.1 菌株 WL-11 木聚糖酶的特性

表 2 列出了菌株 WL-11 木聚糖酶与一些芽孢杆菌木聚糖酶部分特性^[18,19,20],可以看出 WL-11 木聚糖酶的 pI 值明显高于表中所列芽孢杆菌木聚糖酶的 pI 值。WL-11 木聚糖酶的最适 pH 及 pH 稳定范围稍高于表中列出的多数芽孢杆菌木聚糖酶,为耐碱性木聚糖酶,其中仅 *Bacillus* sp. Strain AR-009 木聚糖酶的最适 pH、温度以及温度的稳定范围略高于本文研究的 WL-11 木聚糖酶。

3.2 菌株 WL-11 木聚糖酶降解木聚糖底物的作用方式

分析不同来源的木聚糖降解产物的形成过程可以发现,在反应初始阶段,木聚糖酶 A 优先降解大分子的燕麦木聚糖,生成低分子的寡糖,此时体系中大分子寡糖,如木六糖等寡糖因为有长链木聚糖的保护而不被木聚糖酶所降解,表现为含量增加;反应后期由于长链木聚糖在溶液中不再占有优势,此时木六糖等寡糖开始被木聚糖酶降解,其含量有所降低。从图 5 分析的结果也可以看出,随着酶解反应的进行,体系中大分子寡糖先出现,随后开始出现小分子量的寡糖,如木二糖、木三糖等(列 2,列 3)。徐勇等人^[13]的研究得出了与本文相似的结果,而杨瑞金等人^[14]的研究结果则不相同,这可能是不同微生物产生的木聚糖酶的性质差异所导致。据 Mitsubishi 等人的研究结果^[15],木聚糖的糖链长度越

长,木聚糖酶对其亲和性越高,木聚糖酶具有优先作用于糖链较长的木聚糖的特点。

表 2 菌株 WL-11 与一些芽孢杆菌木聚糖酶特性的比较

Table 2 Comparison of WL-11 xylanase and some xylanases of *Bacillus* strains

Strain	Molecular mass /kD	Optima		Stability		pI
		pH	Temp /°C	pH	Temp /°C	
<i>Bacillus pumilus</i> WL-11	26.0	7.0-8.0	50	6-10.5	55	9.5
<i>Bacillus pumilus</i> A-30	23.0	7.5-8.0	50	7-9.0	40	8.5
<i>Bacillus</i> sp. W-1	21.5	6	65	4-10	40	8.5
<i>Bacillus</i> sp. WL-12	15	5.5-7	-	-	-	9.1
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	43	6.5	55	6.5-10	70	7.9
<i>Bacillus</i> sp. strain BP-23	32	5.5	50	9.5-11	55	9.3
<i>Bacillus</i> sp. strain BP-7	22-120	6	55	8-9	65	7-9
<i>Bacillus ploymyxa</i> CECT-153	61	6.5	50	-	-	4.7
<i>Bacillus</i> sp. strain K-1	23	5.5	60	5-12	50-60	-
<i>Bacillus</i> sp. NG-27	-	7, 8.4	70	6-11	40-90	-
<i>Bacillus</i> sp. SPS-0	-	6	75	6-9	85	-
<i>Bacillus</i> sp. strain AR-009	23, 48	9-10	60-75	8-9	60-65	-
<i>Bacillus</i> sp. NCIM-59	15.8, 35	6	50-60	7	50	4.8

WL-11 木聚糖酶 A 对上述三种木聚糖底物的降解具有一些共同点:该酶对不同底物降解形成的六糖都较为敏感,六糖一旦产生就能被迅速降解;不同木聚糖底物的降解产物中三糖的积累量都较高。这一结果与 WL-11 粗木聚糖酶降解燕麦木聚糖的结果是一致的,这也从另一个侧面说明了 WL-11 主要合成一种木聚糖酶的实验结果。与禾本科的燕麦木聚糖底物降解不同的是,该酶对硬木木聚糖底物降解形成的五糖的继续降解能力较强,在整个反应过程中,来源于桦木和榉木的木聚糖底物降解产物中五糖相对含量比燕麦木聚糖底物降解后五糖的相对含量要低得多。

木聚糖酶 A 的 pI 值为 9.5,结合木聚糖酶 A 的分子量可以认定该酶属于木聚糖酶家族 11 (Family 11),即低分子量、高 pI 值的木聚糖酶家族。F11 家族的木聚糖酶对木聚糖底物的降解程度较 F10 家族的木聚糖酶降解程度要弱一些^[16],后者的降解产物主要为低分子量的寡糖,如木二糖、木三糖等。从 2.3 结果可以看出, WL-11 木聚糖酶 A 对底物的降解方式与 F10 家族的木聚糖酶类似,而与 F11 家族的木聚糖酶对底物的降解方式不同,显示出该酶在底物催化特性具有一定的特殊性,这方面的报道较为少见^[16]。

燕麦木聚糖样品中含有约 15% 的葡萄糖残基和 10% 阿拉伯糖残基,木糖残基仅占 70% 左右,桦木和榉木的木聚糖中木糖残基含量都在 90% 以

上^[21,22]。Ebringerova A 等人^[17]的报道了可溶性的玉米芯木聚糖的结构分析结构认为,玉米芯木聚糖以木糖为主,另外含有一定量的阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等;玉米芯可溶性木聚糖和水不溶性木聚糖的主要差别在于前者含较多的阿拉伯糖,阿拉伯糖连接在木糖主链上形成较多的支链结构,而水不溶性木聚糖则恰恰相反。燕麦同属禾本科植物,其木聚糖结构与玉米芯木聚糖的结构相似性较高,可溶性木聚糖也具有较多的分支侧链结构,因而 WL-11 木聚糖酶降解所形成的五糖很可能含有大量的葡萄糖、阿拉伯糖残基等侧链结构而形成异五糖,这样的结构影响了木聚糖酶 A 对其的进一步降解。此外,即便是同属硬木(阔叶木)的桦木和榉木木聚糖,尽管两者的结构相似性较高,但酶 A 对它们的降解过程也有所不同。究其实质,是由于不同来源木聚糖的侧链结构不同,这些侧链结构可能对同一种木聚糖酶降解底物时造成空间位阻效应不同而导致降解产物的差异。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Biely P, Vrsanska M, Kucar S. Identification and mode of action of endo-(1-4)- β -xylanases In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, et al. (eds) Xylans and xylanases. Amsterdam: Elsevier press, 1992, pp. 81-94
- [2] Wong JG, Nelson SL, Saddler JN. Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species. *J Biotechnol.* 1996, 48:137-145

- [3] Rouau X, El-Hayek ML, Moreau D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *J Cereal Sci*, 1994, **19**:259 - 272
- [4] Classen HL. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Anim Feed Sci Technol*. 1996, **62**:21 - 27
- [5] Patrice P, Michele G, Jean PL, et al. Enzymatic production of oligosaccharides from corn cob xylan. *Enzyme Microb Technol*. 1991, **13**:617 - 621
- [6] Katapodis P, Vrsanska M, Kekos D. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. *Carbohydr Res*. 2003, **338**: 1881 - / 1890
- [7] Bataillon M, Cardinali APN, Castillon N et al. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS - 0. *Enzyme Microb Technol*. 2000, **26**:187 - 192
- [8] Bennett NA, Ryan J, Biely P et al. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. *Carbohydr Res*. 1998, **306**:445 - 455
- [9] Xu ZH(许正宏), Mao WY(毛文扬), Xu ZJ(徐志军) et al. Establishment of a strain library of xylanase producers and production of fungal xylanase. *Chemistry and Industry of Forest products(林产化学与工业)*. 2002, **22**(1):43 - 46
- [10] Huang JJ(黄家骥), Xu ZH(许正宏), Du HL(杜宏利) et al. The bio-mechanism of the production of xylanase from *Bacillus pumilus* WL-11. *Food Sci Technol(食品科技)*. 2003, **5**:13 - 15
- [11] Zhuge J(诸葛健), Wang ZX(王正祥). Experimental methods of industrial microbiology (in Chinese). Beijing(北京): China Light Industry Press(中国轻工出版社). 1994
- [12] Zhang WJ(张维杰). Experimental methods of carbohydrate complex (2nd). Hangzhou(杭州), Zhejiang University Press(浙江大学出版社). 1999
- [13] Xu Y(徐勇), Chen M(陈牧), Yu SY(余世袁). Study on enzymatic hydrolysis of xylan into xylo-oligosaccharide. *Chemistry and Industry of Forest products(林产化学与工业)*. 2002, **22**:57 - 60
- [14] Yang RJ(杨瑞金). Enzymatic preparation of xylo-oligosaccharide. Doctoral Thesis of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工大学博士论文), 2000
- [15] Mitsuishi Y. The modes of action of three xylanase from *Mesophilic Fungus* strain Y-94 on xylooligosaccharides. *Agrie Biol Chem*, 1988, **52**:921 - 927
- [16] Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol*, 1997, **57**:151 - 166
- [17] Ebringerova A, Kovacikova A, Hromadkova Z et al. Immunomodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *Int. J Biological Macromolecules*, 2002, **30**:1 - 6
- [18] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**:326 - 338
- [19] Subramaniyan S, Prema P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 2000, **183**:1 - 7
- [20] Chen SC(陈士成), Qu YB(曲音波), Liu XM(刘相梅) et al. Purification and some properties of alkali-tolerant xylanase from *Bacillus pumilus* A-30. *Chin J Biochem Mol Biol(中国生化与分子生物学报)*, 2000, **16**(5):698 - 701
- [21] Aspinall G O. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv Carbohydr Chem*. 1959, **14**:429 - 468
- [22] Puls J, Schuseil J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: Coughlan M P, Hazlewood G P (eds) *Hemicellulose and hemicellulases*. London: Portland Press, 1993, pp.1 - 28