

RAZGRADNJA KSILANA Z RAZLIČNIMI KSILANAZAMI VAMPNE BAKTERIJE *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Tadej ČEPELJNIK^{a)}, Katarina FIDLER^{b)} in Romana MARINŠEK-LOGAR^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag., e-pošta: tadej.cepeljnik@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Volčji Potok 30, SI-1240 Kamnik, Slovenija.

^{c)} Isti naslov kot ^{a)}, doc., dr., mag.

Delo je prispelo 31. oktobra 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

Received October 31, 2004, accepted December 10, 2004.

IZVLEČEK

Uporaba ksilanaz kot krmnih dodatkov je pri monogastričnih živalih zelo obetavna, saj so njihov ugoden učinek na zdravstveno stanje in prirast živali potrdile številne raziskave. Pred kratkim je bila opisana nova vrsta vampne bakterije *P. xylanivorans* s tipskim sevom Mz5^T, ki je močno ksilanolitična. Nekaj njenih ksilanolitičnih encimov je že opisanih, preiskati pa želimo še ostale, da bi ugotovili vzrok visoke ksilanolitične aktivnosti in možnosti uporabe bakterije kot probiotika pri monogastričnih živalih (prašiči, perutnina) ali encimov kot krmnih dodatkov. Iz celičnega izvlečka smo uspeli delno očistiti ksilanazi, veliki 44 kDa in 81 kDa in delno proučiti njuno encimsko delovanje. Primerjali smo tudi encimsko delovanje na celično površino vezanih ksilanaz s ksilanazami celičnega izvlečka. 44 kDa ksilanaza je eksoksilanaza brez β -ksilozidazne aktivnosti, pri ksilanazi velikosti 81 kDa predvidevamo, da gre za endoksilanazo. Ksilanolitični encimi celične površine učinkovito razgrajujejo ksilan, vendar niso sposobni cepiti ksilobioze. Le-to razgradijo ksilanolitični encimi v notranjosti celice.

Ključne besede: mikrobiologija / anaerobne bakterije / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / ksilanaze / ksilan / vamp

XYLAN DEGRADATION BY DIFFERENT XYLANASES OF RUMEN BACTERIUM *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

ABSTRACT

The use of xylanases as feed additives for monogastric animals is very promising. Many experiments have proved their beneficial effect on animal health and performance. A new rumen bacterium species has recently been isolated: *P. xylanivorans*, type strain Mz5^T, which has a very high xylanolytic activity. Some of its xylanolytic enzymes have already been described. We want to analyse the rest of them to find the reason for its high xylanolytic activity and to assess the possibilities of using this bacterium as a probiotic for monogastric animals (pigs, poultry) or its enzymes as feed additives. We have partially isolated two xylanases from the cell extract: 44 kDa and 81 kDa and examined their properties. We also compared enzyme activities of cell surface xylanases with xylanases in cell extract. The 44 kDa xylanase is an exoxylanase without β -xylosidase activity. We assume that the 81 kDa xylanase is an endoxylanase. Xylanolytic enzymes on the cell surface are efficient xylan degraders, but they are unable to degrade xylobiose. Xylobiose is degraded by xylanolytic enzymes inside the cell.

Key words: microbiology / anaerobic bacteria / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / xylanases / xylan / rumen

UVOD

Rastlinojede živali so popolnoma odvisne od mikrobne razgradnje rastlinskih polisaharidov, saj nimajo lastnih encimov za razgradnjo le-teh (Hobson, 1997). V ta namen so se razvile številne prilagoditve prebavil, ki omogočajo mikrobno fermentacijo. Predželodčna fermentacija poleg izrabe kratkoverižnih maščobnih kislin in vitaminov rastlinojedim živalim omogoča tudi izrabo mikrobne biomase kot vir proteinov. Najbolj razvito obliko predželodčne fermentacije najdemo pri prežvekovalcih: razvil se je poseben del prebavil – vamp (Flint, 1997).

Največji delež krme prežvekovalcev predstavljajo ogljikovi hidrati, najpogosteje celuloza, hemiceluloze, škrob in pektin, (Chesson in Forsberg, 1997). Poglavitna sestavina rastlinskih hemiceluloz so ksilani – za celulozo drugi najpogostejši obnovljivi polisaharidi v naravi (Biely, 1985). Struktura ksilanov je variabilna, od linearnih 1,4- β glikozidno vezanih verig poliksiloze do močno razvejanih heteropolisaharidov, pri katerih se na osnovno verigo D-ksiloznih ostankov vežejo različne substituenti (Biely, 1985). Substituenti se lahko na ksilozne ostanke vežejo z glikozidnimi vezmi (L-arabinoza, glukuronska kislina ali 4-O-metil glukuronska kislina), z estrsko vezjo (ocetna kislina) ali z etrskimi vezmi prek L-arabinoze (ferulna kislina, *p*-kumarna kislina) (Puls in Poutanen, 1989; Kulkarni in sod., 1999). Ferulna in *p*-kumarna kislina lahko med dvema fenolnima kislinama tvorita mostič, kar je ključno za povezovanje ksilanskih verig med seboj (Malburg in sod., 1992). Ksilan trav in žitaric, ki predstavlja pomemben delež v krmi prežvekovalcev, je arabinoksilan. Njegov delež pri travah je 20-40 % snovi celične stene (Hespell in Whitehead, 1990).

Zaradi zapletene sestave ksilana je za njegovo učinkovito razgradnjo potrebno sinergistično delovanje več različnih encimov. Ena od strategij mikroorganizma za razgradnjo tako heterogenega substrata je produkcija več oblik encimov s specializiranimi funkcijami. Multiple oblike ksilanaz (običajno tri do pet ksilanaz na mikroorganizem) so prisotne pri mnogih mikroorganizmih, tudi pri vampnih bakterijah (Wong in sod., 1988).

Mikrobne encime, ki hidrolizirajo ksilan, delimo v dve skupini. Prva zajema encime, ki cepijo osnovno verigo ksilana, druga encime, ki odcepljajo stranske skupine. Te imenujemo tudi pomožni ksilanolitični encimi (Bajpai, 1997). Osnovno verigo ksilana cepijo endo-1,4- β -ksilanaze, β -ksilozidaze in eksoksilanaze. Endo-1,4- β -ksilanaze katalizirajo hidrolizo 1,4- β -D-glikozidnih vezi v glavni verigi ksilana (Hespell in Whitehead, 1990). β -ksilozidaze hidrolizirajo krajše ksilooligosaharide, največkrat ksilobiozo do ksiloze (Bajpai, 1997). Eksoksilanaze odcepljajo ksilozilne ostanke od konca verige ksilooligomerov (Reilly, 1981).

Mikrobne ksilanaze so na osnovi sorodnosti aminokislinskih zaporedij uvrščene v družini 10 in 11 glikozidnih hidrolaz. Ti dve skupini med seboj nista sorodni. Ksilanaze iz družine 10 so večje in kompleksnejše in hidrolizirajo tako ksilan, neredko tudi celulozo in ostale polisaharide. Ksilanaze iz družine 11 hidrolizirajo le ksilan. Ksilanaze obeh družin imajo ohranitveni mehanizem delovanja: glikozidno vez hidrolizirajo tako, da se konfiguracija anomernega atoma C₁ ohrani (Davies in Henrissat, 1995).

Mikrobni ksilanolitični encimi so že prodrli v marsikatero industrijsko panogo. Zelo obetavno področje uporabe je papirna industrija, kjer v postopku beljenja celulozne kaše ksilanaze lahko učinkovito nadomestijo toplotno obdelavo in kemijske oksidante za prekinitve vezi med celulozo in ligninom. V prehrabeni industriji uporabljajo ksilanaze skupaj s celulazami in pektinazami za bistrenje piva, mošta in sadnih sokov ter za utekočinjenje sadnih in zelenjavnih kaš (Kulkarni in sod., 1999, Beg in sod., 2001). Ksilanolitični mikroorganizmi (oz. encimi) bi lahko pripomogli k biokonverziji rastlinskih odpadkov v dostopnejše oligo- in monosaharide. Le-te bi lahko izkoristili kot substrat za namnoževanje industrijsko zanimivih mikroorganizmov (Vazquez in sod., 2000). V raziskovalne namene ksilanaze uporabljajo za odstranjevanje rastlinske celične stene pri pridobivanju protoplastov (Beg in sod., 2001).

Zelo obetavno je tudi področje uporabe ksilanaz kot krmnih dodatkov. Krmljenje živali z žiti zaradi prisotnosti hemiceluloznih sestavin pogosto vodi do povečane viskoznosti črevesne vsebine, kar zmanjšuje dostopnost hrane za prebavne encime, zmanjšuje možnost absorpcije prebavljene hrane ter omogoča nastanek primerne okolja za patogene mikroorganizme. To je predvsem težava neprežvekovalcev, saj nimajo indigene mikroflore, ki bi bila sposobna razgraditi vlaknine iz krme. Encimski krmni dodatki (pogosto tudi ksilanaze) lahko zmanjšajo zdravstvene težave (driska, ki je posledica naselitve patogenih mikroorganizmov) (Bedford, 2000). Omogočajo tudi boljše izrabo krme z nizko hranilno vrednostjo in zmanjšujejo variacije v prirastu živali. Tako je kombinacija uporabe ksilanaze in fitaze pri brojlerjih privedla do hitrejše izpostavitve fitata hidrolizi in s tem povečala prirast (Bedford, 2000). Dodatek ksilanaz in β -glukanaz v rženo krmo brojlerjev je prav tako zmanjšal viskoznost črevesne vsebine in povečal povprečen dnevni prirast živali (Lázaro in sod., 2004). Tudi dodatek ksilanaz v krmo rac, ki je vsebovala velik delež vlaknin, je znatno izboljšal energetske izrabo krme (Adeola in Bedford, 2004). Dodajanje fibrolitičnih encimov pa ima ugodne učinke tudi pri prežvekovalcih. Dodatek fibrolitičnih encimov (celulaze, ksilanaze) v krmo krav mlekaric je povečal število vampnih bakterij, ki razgrajujejo hemiceluloze in sekundarne produkte razgradnje celuloze (Nsereko in sod., 2002).

MATERIAL IN METODE

Priprava encimskih vzorcev 44 kDa in 81 kDa ksilanaze

44 kDa ksilanazo in celični izvleček smo pripravili kot smo predhodno opisali (Čepeljnik in sod., 2002).

81 kDa ksilanazo smo očistili po sledečem postopku: bakterijo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T smo gojili pri 37 °C v anaerobnih razmerah v 700 ml delno spremenjenega gojišča M330 (DSM Catalogue of strains, medium 330). Glukozo, maltozo, celobiozo in topni škrob smo nadomestili s ksilanom ovsenih plev v koncentraciji 5 g/l. Po 48 urah gojenja smo celice ločili od gojišča s centrifugiranjem pri 4 °C, 4000 × g, 15 minut. Bakterijske celice smo dvakrat sprali v 50 mM natrij fosfatnem pufru, pH = 6,5 (NaFP). Nato smo pelet resuspendirali v 70 ml bidestilirane vode, ga dvakrat zamrznili (-20 °C) in odmrznili ter nazadnje izpostavili ultrazvoku v ultrazvočni kopeli za 10 minut. Po centrifugiranju (4 °C, 12500 × g, 30 minut) smo pelet zavrgli. Iz supernatanta (celični izvleček) smo z dodajanjem amonijevega sulfata (AS) postopno oborili proteine. Tiste, ki so se oborili med 40- in 60-odstotno nasičenostjo, smo ponovno raztopili v NaFP in razsolili z dializo. Tako pripravljen vzorec smo nanegli na uravnoteženo kolono CIM[®] DEAE-8 (BIA Separations, Slovenija), ki omogoča ločevanje proteinov glede na njihov naboj. Vezane proteine smo nato spirali z linearno naraščajočo koncentracijo NaCl od 0 do 1 M v 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 v 50 ml pri pretoku 4 ml/min. Sprane proteine smo zbirali v frakcijah po 1,5 ml. S presejalnim testom (Marinšek Logar, 1999) smo določili pet ksilanolitično aktivnih frakcij, jih združili in jih razsolili z dializo. Celoten razsoljen vzorec (7,5 ml) smo ponovno nanegli na predhodno uravnoteženo kolono CIM[®] DEAE-8 in ponovili kromatografijo pri istih pogojih, le da je ta pufer imel pH 6,8.

Vzorec površinskih proteinov smo pripravili po rahlo spremenjenem postopku, kot so ga opisali Rincón in sod. (2004). Po 24 urah gojenja smo celice s centrifugiranjem pri 4 °C, 10000 × g, 15 minut, ločili od gojišča. Pelet smo dvakrat sprali v 25 mM pufru Tris-HCl, pH 7,0 s 150 mM NaCl in ga nato resuspendirali v 35 ml 25 mM Tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 % (m/v) N-lauril sarkozin, 1 mM PMSF (fenilmetansulfonil fluorid) in mešanico eno uro inkubirali na ledu, jo na hitro premešali in centrifugirali pri 4 °C, 10000 × g, 15 minut in nato še 30 minut pri 12500 × g. Supernatant je predstavljal pripravek površinskih proteinov. Pred analizo vzorca

z NaDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom) smo del pripravka skoncentrirali z ultrafiltracijo. Uporabili smo mikrocentrifugirke (Vivascience, VS0101) z vgrajenim ultrafiltrom z velikostjo por 10 kDa in centrifugirali 5 minut pri $12000 \times g$ in 4°C . Koncentriran vzorec smo uporabili za encimogram, nekoncentriranega za barvanje proteinov s koloidnim srebrom.

Encimski testi

Encimsko aktivnost izolirane ksilanaze smo določili z metodo redukcijskih sladkorjev (Lever, 1977) in jo izrazili kot nkat/mg (količina sproščenih redukcijskih koncev na sekundo in mg proteinov. Osnovni test je bil izveden v NaFP, pri 37°C in ksilanom ovsenih plev (1 % (m/v)) kot substratom.

Za določanje pH optimuma smo vzorce inkubirali s substratom v 50 mM NaFP (pH 4,08; 4,59; 5,07; 5,53; 6,04; 6,53; 6,92) ali pa v 20 mM TRIS pufrih (pH 7,09; 7,28; 7,44; 7,5; 8,0; 8,54; 9,0). Za določanje temperaturnega optimuma smo vzorce inkubirali s substratom pri temperaturah 8°C , 26°C , 30°C , 37°C , 39°C , 42°C , 55°C , 65°C in 75°C . Ostale razmere so ostale nespremenjene. Vse encimske teste smo naredili v štirih ponovitvah.

Sledenje produktov encimskega delovanja

Vzorce encimov smo inkubirali 24 ur s substratom (1 % (m/v) ksilanom ovsenih plev, ksilobiozo, ksilotriozo, ksilotetraozo oz. ksilopentaozo). Po 20 μl vzorcev smo nanegli na stekleno ploščo, ki je bila prekrita s silikagelom (Merck) in razgradne produkte ločili s tankoplastno kromatografijo (Christov in sod., 2000).

Ksilanogrami

Proteine smo ločili z denaturirajočo elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata v reducirajočih razmerah (Laemmli, 1970) na 10 % (m/v) poliakrilamidnih gelih, v katere smo predhodno vključili ksilan ovsenih plev. Kot proteine znanih molekulskih mas (MW) smo uporabili Protein Ladder 10–200 kDa (Fermentas #SM0661). Aktivne ksilanaze smo vizualizirali po renaturaciji elektroforetskih gelov, inkubaciji 4 ure pri 37°C in barvanju z barvilom kongo rdeče (Wood, 1980). Kadar smo želeli zaznati vse prisotne proteine, gelov nismo razvili kot ksilanogram, temveč smo jih pobarvali s koloidnim srebrom (Merril in sod., 1981).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Bakterija *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ima vsaj 7 elektroforetsko različnih ksilanaz, ki ta sev uvrščajo med najaktivnejše bakterijske razgrajevalce ksilana v vampu (Marinšek-Logar in sod., 2000). Namen naše raziskave je bil proučiti delovanje posamičnih encimov.

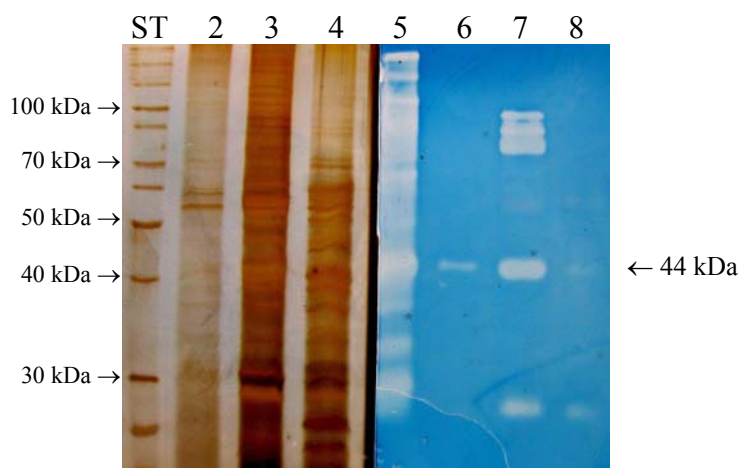
Zato smo se lotili izolacije posamičnih ksilanaz. 44 kDa encim smo predhodno opisali (Čepeljnik in sod. 2002) kot 50 kDa ksilanazo, vendar smo tokrat uporabili standardno mešanico več proteinov z znanimi molekulskimi masami in tako točneje izračunali novo MW. Izolacijo pa smo ponovili po istem postopku.

Izolirani ksilanazi smo določili tudi optimalno temperaturno in pH območje delovanja. Največjo aktivnost (100 %) smo izmerili pri temperaturi 37°C . V območju med 30°C in 42°C kaže več kot 80-odstotno aktivnost, že pri 26°C pa je aktivnost le še 60-odstotna. Pri nižjih temperaturah (8°C) je aktivnost okoli 20-odstotna in pri 55°C okoli 10-odstotna. Pri 85°C ksilanaza skoraj popolnoma izgubi aktivnost (0,7 %).

Pri določanju optimalnega pH smo največjo aktivnost 44 kDa ksilanaze izmerili pri pH 6,04 (= 100 %), pri pH 6,53 je aktivnost 99-odstotna. Med pH 5,53 in 7,09 je aktivnost okoli 80-

odstotna in v območju med pH 5,07 in 7,80 več kot 60-odstotna. Pri pH vrednostih manj od 5,07 in nad 8,50 aktivnost močno upade. Pri pH 4,59 zaznamo 30 % aktivnost in pri pH 4,08 le še 2 % aktivnost. Pri pH 8,50 je aktivnost 30 %, pri pH 9,00 pa le še okoli 5-odstotna.

Izolacije novih ksilanaz smo se lotili s postopnim obarjanjem proteinov iz celičnega izvlečka 48-urne kulture. Pri 20-odstotni nasičenosti z AS smo iz celičnega izvlečka 48-urne kulture oborili velik del proteinov, vključno z večino ksilanaz. V naslednji stopnji, od 20 do 40 % nasičenosti, je bilo prisotnih mnogo manj proteinov in le ena ksilanaza (44 kDa). Obarjanje smo nadaljevali do 60 % nasičenosti in skupaj z vsaj 5 ksilanazami (120 kDa, 100 kDa, 81 kDa, 44 kDa in 30 kDa) ponovno oborili precejšen del proteinov. Pri 80 % nasičenosti je bilo ponovno prisotnih manj proteinov in dve ksilanazi: že opisana ksilanaza velikosti 30 kDa (Čepeljnik in sod., 2004) in 44 kDa ksilanaza (slika 1).



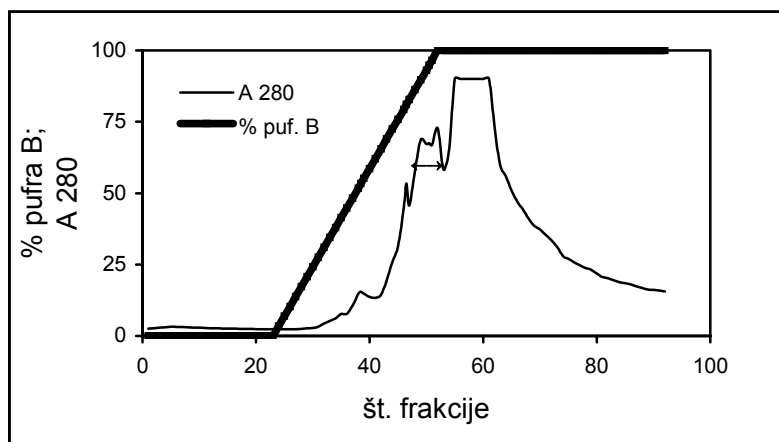
Slika 1. NaDS-PAGE analiza oborjenih proteinov iz celičnega izvlečka pri različnih stopnjah nasičenosti z AS. V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanegli po 50 µl vzorcev. Po elektroforezi smo polovico 10 % ločevalnega gela pobarvali s koloidnim srebrom, drugo polovico pa smo razvili kot encimogram. Na progi ST so ločeni proteinski standardi z označenimi MW, na progi 5 proteini, ki so se oborili pri 20 % nasičenosti z AS. Sledijo proteini, oborjeni med 20-40 % nasičenostjo (progi 2 in 6), 40-60 % nasičenostjo (progi 3 in 7) in 60-80 % nasičenostjo (progi 4 in 8). S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekulsko maso 44 kDa.

Proteine, ki so se oborili med 40- in 60-odstotno nasičenostjo, smo ponovno raztopili v Na-fosfatnem pufru in razsolili z dializo. Razsoljen vzorec smo nanegli na kolono z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8) in vezane proteine spirali z naraščajočo koncentracijo NaCl v elucijskem pufru s pH vrednostjo 7,5 (slika 2).

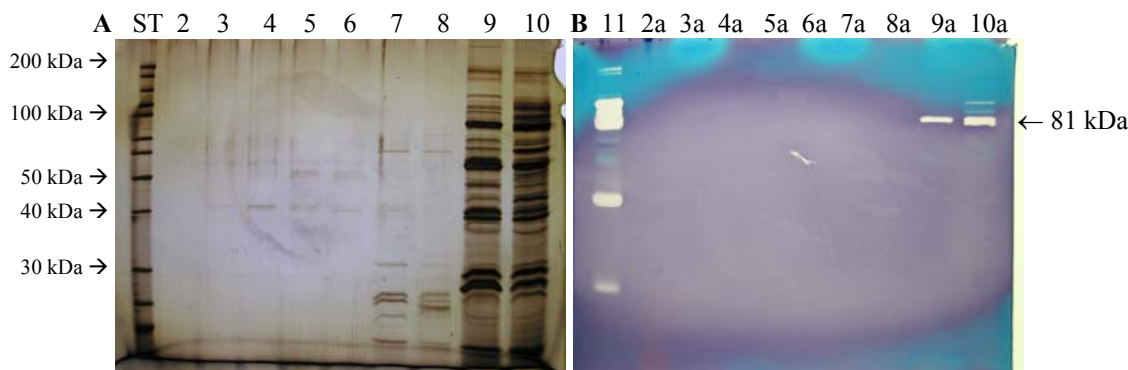
Preverili smo prisotnost ksilanolitične aktivnosti v zbranih frakcijah in proteine v najaktivnejših vzorcih ločili z elektroforezo. Barvanje s koloidnim srebrom je pokazalo, da je v frakcijah prisotnih mnogo različnih proteinov, na encimogramu pa smo ugotovili, da so v ksilanolitično aktivnih frakcijah prisotne močno aktivna ksilanaza velikosti 81 kDa in dve zelo šibko aktivni ksilanazi (100 kDa, 120 kDa) (slika 3).

Pet ksilanolitično aktivnih frakcij, od tiste nanešene na progi 9 pa do vključno tiste s proge 10 (slika 3), smo združili in jih razsolili z dializo. Celoten razsoljen vzorec (7,5 ml) smo ponovno nanegli na kolono CIM[®] DEAE-8. Ker so se ksilanolitični encimi v prvi kromatografiji razmeroma pozno sprali s kolone (med 70 in 80 % elucijskega pufru, kar pomeni med 0,7 M in 0,8 M NaCl), smo predvidevali, da so v takih razmerah ti proteini močno nabiti in se zato močno vežejo na nosilec. Glede na te rezultate smo predvidevali, da imajo izoelektrične točke v kislem območju pH. Zato smo v nadaljevanju izbrali elucijski pufer z nižjo pH vrednostjo, to je 6,8.

Pričakovali smo, da se bomo tako v naslednjem koraku znebili več ostalih neksilanolitičnih proteinov. Ponovili smo kromatografijo (slika 4) in ksilanolitične frakcije ponovno proučili na encimogramih (slika 5).



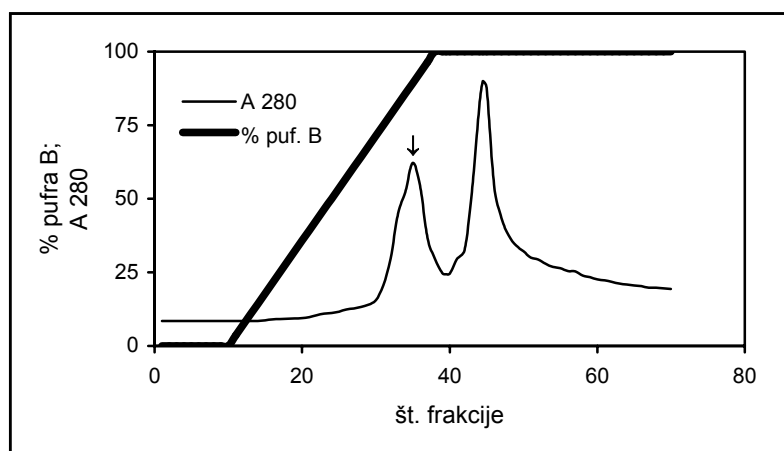
Slika 2. Ločevanje proteinov s tekočinsko kromatografijo na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM® DEAE-8). Na kolono smo nanegli 6 ml vzorca oborjenih proteinov iz celičnega izvlečka in nevezane proteine sprali s 50 ml pufra A (20 mM Tris, pH 7,5). Vezane proteine smo postopno spirali z naraščajočim gradientom od 0 % do 100 % pufra B v 50 ml pri pretoku 4 ml/min (debelejša črta). Koncentracijo spranih proteinov v frakcijah po 1,5 ml smo sledili z merjenjem absorbance pri 280 nm (tanjša črta). Puščici označujeta območje, v katerem smo na ksilanogramu zaznali ksilanolitično aktivnost (slika 3).



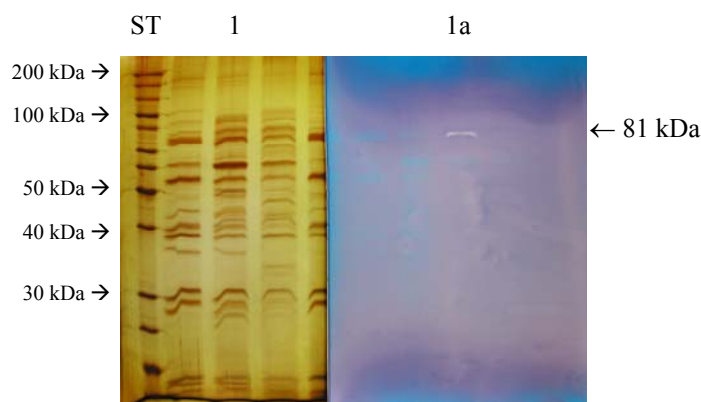
Slika 3. NaDS-PAGE analiza vzorcev po prvem ločevanju oborjenih proteinov na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM® DEAE-8). V žepke koncentriranega NaDS-PAGE gela smo nanegli po 50 µl vzorcev. Po elektroforezi smo en 10 % ločevalni gel pobarvali s koloidnim srebrom (A) ter drugega razvili kot encimogram (B). Proga ST: proteinski standardi z označenimi MW; Proga 11: proteini, oborjeni v območju med 40 in 60 % nasičenosti z AS; proge 9,10 in 9a,10a: encimsko aktivni frakciji iz tekočinske kromatografije, proge 2-8 in 2a-8a: encimsko neaktivne ali slabo aktivne frakcije iz tekočinske kromatografije. S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekularno maso 81 kDa.

Tokrat je bila ksilanolitična aktivnost v zbranih frakcijah veliko manjša, na encimogramu pa smo uspeli vizualizirati le eno ksilanazo z molekularno maso 81 kDa. Na proteinskih gelih smo poleg ksilanaze zaznali še več drugih, neidentificiranih proteinov, ki pa niso razgrajevali ksilana (ena sama lisa na progi 1a, slika 5). Kljub temu je prisotnih precej manj ostalih proteinskih lis v primerjavi s prvo stopnjo čiščenja (proga 9, slika 3). Postopek izolacije bi lahko nadaljevali s kromatografijo na drugih nosilcih ali izbiro drugačnih pufrov, vendar smo opazili, da so

kvalitativno vidni izkoristki vedno manjši in je zaznana ksilanolitična aktivnost v gelih vedno šibkejša. Zato smo se zadovoljili z delno očiščenim encimskim pripravkom, ki smo ga uporabili za proučevanje cepitve ksilana z 81 kDa ksilanazo.



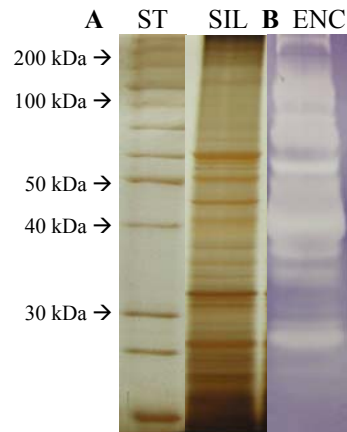
Slika 4. Nadaljevanje ločevanja proteinov s tekočinsko kromatografijo na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). Na kolono smo nanesti 7,5 ml vzorca razsoljenih združenih frakcij iz predhodne kromatografije. Nevezane proteine smo sprali s 50 ml pufra A (20 mM Tris, pH 6,8). Vezane proteine smo postopno spirali z naraščajočim gradientom od 0 % do 100 % pufra B v 50 ml pri pretoku 4 ml/min (debelejša črta na grafikonu). Koncentracijo spranih proteinov v frakcijah po 1,5 ml smo sledili z merjenjem absorbance pri 280 nm (tanjša črta na grafikonu). Puščica označuje frakcijo, pri kateri smo na encimogramu zaznali ksilanolitično aktivnost.



Slika 5. NaDS-PAGE analiza vzorcev po drugem ločevanju na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanesti po 50 μ l vzorcev frakcij iz tekočinske kromatografije (slika 4). Po elektroforezi smo polovico 10 % ločevalnega gela pobarvali s koloidnim srebrom in drugo polovico razvili kot encimogram. Proga ST: proteinski standardi; progi 1 in 1a: le pri eni frakciji smo zaznali ksilanolitično aktivnost (1a), v njej je še vedno prisotnih precej različnih proteinov (1). Ostale proge: encimske aktivnosti v ostalih frakcijah nismo zaznali. S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekularno maso 81 kDa.

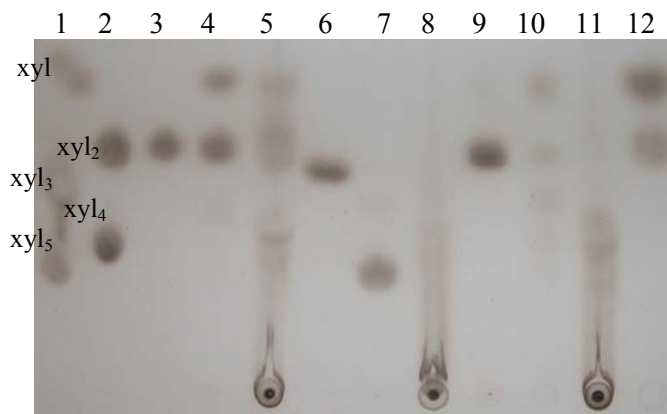
Pripravek površinskih proteinov, pripravljen po postopku, ki so ga opisali Rincon in sod. (2004), iz 24-urne kulture *P. xylanivorans* Mz5^T, je na ksilanogramu pokazal enak vzorec ksilanolitičnih encimov, kot je to običajno za pripravek vseh celičnih proteinov (slika 6).

Vse tri vzorce encimskih pripravkov smo uporabili za študij razgradnje ksilana in ksiloooligosaharidov. Razgradne produkte smo ločili s tankoplastno kromatografijo (sliki 7 in 8).

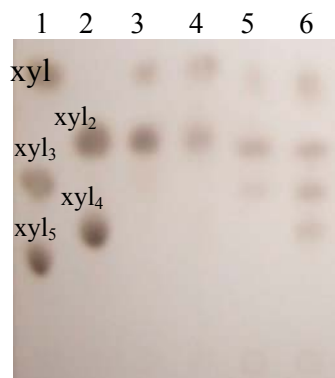


Slika 6. NaDS-PAGE analiza pripravka površinskih proteinov. V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanegli po 50 μ l vzorcev. Po elektroforezi smo en 10 % ločevalni gel pobarvali s koloidnim srebrom (A) ter drugega razvili kot encimogram (B). Proga ST: proteinski standardi z označenimi MW. Proga SIL: pripravek površinskih proteinov, barvano s koloidnim srebrom. Proga ENC: pripravek površinskih proteinov – encimogram.

Izolirana 44 kDa ksilanaza je učinkovito cepila ksilan ovsenih plev vse do najmanjših gradnikov (proga 5, slika 7). Sposobna je bila cepiti tudi ksilotri-, -tetra- (progi 3 in 4, slika 8) in -pentaozo (proga 4, slika 7) do ksilobioze in ksiloze, ne pa tudi ksilobioze do ksiloze (proga 3, slika 7). Glede na te rezultate sklepamo, da prepozna zaporedje vsaj treh zaporednih ksiloz, ki se prilega aktivnemu mestu tega encima, in zaporedoma od substrata odceplja ksilobiozne enote, gre torej za eksoksilanazo brez β -ksilozidazne aktivnosti. Encimi s podobnim delovanjem imajo ponavadi aktivno mesto oblikovano kot žep (Davies in Henrissat, 1995).



Slika 7. Analiza produktov razgradnje ksilana s ksilanazama (44 kDa, 81 kDa), površinskimi proteini in celičnim izvlečkom. Vzorce smo s substratom inkubirali v razmerju 1 : 1 (v/v) preko noči pri temperaturi 37 °C. Razgradne produkte smo naslednji dan ločili s tankoplastno kromatografijo. Na progih 1 in 2 smo nanegli mono- in oligosaharidne standarde (proga 1: ksiloza, ksilotrioza in ksilopentaoza; proga 2: ksilobioza, ksilotetraoza). Na proge 3-5 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize z izolirano 44 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 3), ksilopentaozo (proga 4) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 5). Na proge 6-8 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize z delno izolirano 81 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 6), ksilopentaozo (proga 7) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 8). Na progah 9-11 so nanešeni razgradni produkti, ki so bili posledica hidrolize s ksilanolitičnimi encimi s celične površine (površinski proteini): vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 9), ksilopentaozo (proga 10) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 11). Na zadnjo progo smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize ksilobioze s celičnim izvlečkom (proga 12).



Slika 8. Analiza produktov razgradnje ksilooligosaharidov s 44 kDa ksilanazo in površinskimi proteini. Vzorce smo s substratom inkubirali v razmerju 1 : 1 (v/v) preko noči pri temperaturi 37 °C. Razgradne produkte smo naslednji dan ločili s tankoplastno kromatografijo. Na progi 1 in 2 smo nanegli mono- in oligosaharidne standarde (proga 1: ksiloza, ksilotrioza in ksilopentaoza; proga 2: ksilobioza, ksilotetraoza). Na progi 3 in 4 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize s 44 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilotriozo (proga 3) in ksilotetraozo (proga 4). Na progi 5 in 6 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize s ksilanolitičnimi encimi celične površine (površinski proteini): vzorci, inkubirani s ksilotriozo (proga 5), ksilotetraozo (proga 6).

Delno izolirana 81 kDa ksilanaza je razgrajevala ksilan ovsenih plev le do večjih ksilooligosaharidov, največ do ksilopentaoz (proga 8, slika 7). Prav tako ni uspela cepiti ne ksilobioze ne ksilopentaoze (progi 6 in 7, slika 7). Predvidevamo, da je ta encim endoksilanaza, ki za razpoznavo substrata potrebuje daljše verige oligosaharidov. Pri podobnih encimih je aktivno mesto oblikovano kot reža (Davies in Henrissat, 1995).

Med proteini, ki so vezani na celično površino, je tudi več ksilanaz, ki učinkovito razgrajujejo ksilan, kot tudi ksilotri-, -tetra- (progi 5 in 6, slika 8) in -pentaozo (proga 10, slika 7) do manjših gradnikov. Prav tako ti encimi ne morejo razgraditi ksilobioze do ksiloze (proga 9, slika 7). Tako aktivnost smo zaznali v celičnem izvlečku, kjer je bila očitno prisotna tudi β -ksilozidaza, ki je lahko katalizirala gornjo reakcijo (proga 12, slika 7).

Predhodne raziskave in v tem delu opisani rezultati predpostavljajo naslednji mehanizem razgradnje ksilana pri vampni bakteriji *P. xylanivorans* Mz5^T:

- dve ksilanazi (145 kDa in 44 kDa) se izražata stalno (konstitutivno) in, če je prisoten ksilan, začeta z njegovo razgradnjo: večji encim je aktivnejši, kot smo to lahko opazili na ksilanogramu (Zorec in sod., 2000),
- razgradni produkti močno inducirajo izražanje tudi drugih ksilanaz (Zorec in sod., 2000), ki se vse prenesejo skozi celično membrano in steno ter imajo tako dostop do zelo zapletene, velike molekule substrata ksilana,
- ksilan nato načnejo encimi, ki cepijo substrat znotraj verige: to so XynT (Čepeljnik in sod., 2004), 81 kDa ksilanaza in njim podobni encimi, ki tvorijo večje ksilooligosaharide,
- nato te krajše substrate cepijo 44 kDa ksilanaza in njej podobni encimi, rezultat njihovega delovanja so oligosaharidi ksiloza in predvsem ksilobioza, ki se prenesejo v notranjost bakterijske celice,
- tam pa nastopijo β -ksilozidaze, ki razgradijo gornji substrat do monomerov. To je ksiloza, ki jo bakterija lahko uporabi kot vir energije in ogljika po Embden-Meyerhofovi glikolizi, ali pa v kombinaciji s potjo pentoze fosfata, kot so ugotovili za sev CE 51 (Marounek in Petr, 1995). Zadnji način je manj verjeten, glede na enako učinkovito uporabo tako različnih heksoz kot tudi pentoz (Zorec, 2002).

SKLEPI

44 kDa ksilanaza kaže lastnosti eksoksilanaze brez β -ksilozidazne aktivnosti, pri ksilanazi velikosti 81 kDa pa predvidevamo, da gre za endoksilanazo. Primerjava encimskega delovanja ksilanaz s celične površine s ksilanazami celičnega izvlečka je pokazala, da površinski proteini nimajo β -ksilozidazne aktivnosti. Na osnovi dobljenih rezultatov in rezultatov predhodnih raziskav smo predpostavili mehanizem razgradnje ksilana vampne bakterije *P. xylanivorans* Mz5^T: dve ksilanazi se konstitutivno izražata in ob prisotnosti ksilana razgradni produkti močno inducirajo izražanje tudi drugih ksilanaz. Razgradnjo začnejo ksilanaze, ki cepijo substrat znotraj verige (XynT, 81 kDa ksilanaza in njim podobni encimi, ki tvorijo večje ksilooligosaharide), nato krajše substrate cepijo 44 kDa ksilanaza in njej podobni encimi, rezultat njihovega delovanja so ksiloza in predvsem ksilobioza, ki se prenese v notranjost bakterijske celice. Tam pa nastopijo β -ksilozidaze, ki razgradijo dimerni substrat do monomera, to je ksiloza, ki jo bakterija lahko uporabi kot vir energije in ogljika.

SUMMARY

44 kDa xylanase seems to be an exoxylanase without β -xylosidase activity. We assume that the 81 kDa xylanase is an endoxylanase. The comparison of cell surface and cell extract enzyme activities showed that surface proteins have no β -xylosidase activity. Based on these results and prior research work the possible mechanism of *P. xylanivorans* Mz5^T xylan degradation is: two xylanases are constitutive and in the presence of xylan the products of degradation strongly induce expression of other xylanases. Degradation is started by enzymes that act as *endo* enzymes (XynT, 81 kDa xylanase and similar enzymes that produce larger xylooligosaccharides), than shorter substrates are degraded by 44 kDa xylanase and similar enzymes. The result is xylose and, in the first place, xylobiose, that is transferred inside the cell. β -xylosidases inside the cell degrade dimers to monomers – xylose, which can be used as energy and carbon source.

VIRI

- Adeola, O./ Bedford, M.R. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *British Journal of Nutrition*, 92(2004), 87–94.
- Bajpai, P. Microbial xylanolytic enzyme system: Properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 43(1997), 141–194.
- Bedford, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86(2000), 1–13.
- Beg, Q.K./ Kapoor, M./ Mahajan, L./ Hoondal, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(2001), 326–338.
- Biely, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in biotechnology*, 3(1985)11, 286–290.
- Chesson, A./ Forsberg, C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 329–381.
- Christov, L./ Biely, P./ Kalogeris, E./ Christakopoulos, P./ Prior, B.A./ Bhat, M.K. Effects of purified endo- β -1,4-xylanases of family 10 and 11 and acetyl xylan esterases on eucalypt sulfite dissolving pulp. *Journal of Biotechnology*, 83(2000), 231–244.
- Čepeljnik, T./ Zorec, M./ Nekrep, F.V./ Marinšek-Logar, R. Isolation of endoxylanases from anaerobic bacterium *Butyrivibrio* sp. Mz5 is possible by anion exchange chromatography on CIM[®] DEAE-8 monolytic column. *Acta Chimica Slovenica*, 49(2002), 401–408.
- Čepeljnik, T./ Križaj, I./ Marinšek-Logar, R. Isolation and characterization of the *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T xylanase XynT—the first family 11 endoxylanase from rumen *Butyrivibrio*-related bacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, 34(2004), 219–227.
- Davies, G./ Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(1995), 853–859.

- DSM Catalogue of strains. Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nemčija, 1993, <http://www.dsmz.de/media/med330.htm> (1. sept. 2004).
- Flint, H.J. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, 5(1997)12, 483–488.
- Hespell, R.B./ Whitehead, T.R. Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science*, 73(1990), 3013–3022.
- Hobson, P.N. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 1–9.
- Kulkarni, N./ Shendye, A./ Rao, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1999), 411–456.
- Lázaro, R./ Latorre, M.A./ Medel, P./ Gracia, M./ Mateos, G.G. Feeding regimen and enzyme supplementation to rye-based diets for broilers. *Poultry Science*, 83(2004), 152–160.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(1970), 680–685.
- Lever, M. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81(1977), 21–27.
- Malburg, L.M./ Lee, J.M./ Forsberg, C. Degradation of cellulose and hemicelluloses by rumen microorganisms. V: Microbial degradation of natural products (Ed.: Winkelmann G.). Weinheim, VCH, 1992, 126–156.
- Marinšek-Logar, R. Opis ksilanolitičnega encimskega sistema vampne bakterije *Prevotella bryantii* B14. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fak., 1999, 120 str.
- Marinšek-Logar, R./ Zorec, M./ Nekrep, F.V. Isolation and characterisation of *Butyrvibrio*-like rumen bacteria possessing high xylanolytic activity. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40(2000), 191–192.
- Marounek, M./ Petr, O. Fermentation of glucose and xylose in ruminal strains of *Butyrvibrio fibrisolvens*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21(1995)4, 272–276.
- Merril, C.R./ Goldman, D./ Sedman, S./ Ebert, H. Ultrasensitive stain for proteins in poly-acrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211(1981), 1437–1438.
- Nsereko, V.L./ Beauchemin, K.A./ Morgavi, D.P./ Rode, L.M./ Furtado, A.F./ McAllister, T.A./ Iwaasa, T.A./ Yang, W.Z./ Wang, Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.*, 48(2002), 14–20.
- Puls, J./ Poutanen, K. Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. V: Enzyme systems for lignocellulose degradation (Ed.: Coughlan, M.P.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 151–165.
- Reilly, P.J. Xylanases: structure and function. *Basic Life Science*, 18(1981), 111–129.
- Rincon, M.T./ Martin, J.C./ Aurilia, V./ McCrae, S.I./ Rucklidge, G.J./ Reid, M.D./ Bayer, E.A./ Lamed, R./ Flint, H.J. ScaC, an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavifaciens* 17 cellulosome. *Journal of Bacteriology*, 186(2004)9, 2576–2585.
- Vazquez, M.J./ Alonso, J.L./ Dominguez, H./ Parajo, J.C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 11(2000), 387–393.
- Wong, K.K.Y./ Tan, L.U.L./ Sandler, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(1988)3, 305–317.
- Wood, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 85(1980), 271–287.
- Zorec, M./ Marinšek-Logar, R./ Čepeljnik, T./ Nekrep, F.V. The influence of substrate concentration and growth phase on expression of *Butyrvibrio* sp. Mz5 endoxylanases. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh.*, 76(2000)2, 199–206.
- Zorec, M. Izolacija vampne bakterije z močno ksilanolitično aktivnostjo in opis njenega encimskega sistema za razgradnjo ksilana. Magistrska naloga. Ljubljana, Medicinska fak., 2002, 79 str.