

文章编号 :1009 - 038X(2001)01 - 0035 - 05

顶青霉木聚糖酶的纯化与性质

杨瑞金 , 许时婴 , 王 璋

(无锡轻工大学食品学院 , 江苏无锡 214036)

摘 要 :从顶青霉(*Pencillium corylophilum*)P-3-31 培养液中分离到 3 种木聚糖酶组分 ,分别称为 Part A、Part B 和 Part C. Part B 进一步纯化 ,经 SDS-PAGE 鉴定为单带 ,相对分子质量为 24 200 ;Part C 进一步纯化 ,经 SDS-PAGE 鉴定也是单带 ,相对分子质量为 48 300. Part A 和 Part B 的最适反应条件为 pH 4.0 45 ℃ ;Part C 的最适反应条件为 pH 5.5 55 ℃ . Part A 和 Part B 对木聚糖以外的底物不能水解 ;Part C 具有水解 CMC 的交叉活性和 β -木糖苷酶活性 ,但不能将木二糖水解成木糖. 3 个纯化酶组分和粗酶对不同来源的木聚糖底物均表现出不同的活性. 对于粗酶 ,若桦木木聚糖为底物的相对酶活为 100% ,则玉米芯木聚糖为底物的相对酶活为 143% ,蔗渣木聚糖为底物的相对酶活为 124% .

关键词 :顶青霉 ;木聚糖酶 ;纯化 ;底物特异性

中图分类号 :Q 556.2

文献标识码 :A

Purification and Properties of Xylanases from *Pencillium corylophilum*

YANG Rui-jin , XU Shi-ying , WANG Zhang

(School of Food Science & Technology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036 , China)

Abstract : Three parts of xylanases(Part A , Part B and Part C) were separated and purified from a culture filtrate of *Pencillium corylophilum* No. P-3-31 . Part B was further purified to homogeneity and Part C was further purified to almost homogeneity by the same procedures as Part B . The molecular weights of Part B and Part C were estimated to be 24 200 and 48 300 respectively by SDS-PAGE . The optimal pH and temperature of enzymes were 4.0 and 45 ℃ for Part A and Part B , while 5.5 and 50 ~ 55 ℃ for Part C . Part C showed a substrate-cross- specificity on hydrolyzing CMC and had an activity of β -xylosidase , but this activity was unable to hydrolyze xylobiose . Part A and Part B did not show the substrate-cross-specificity . Both crude and purified enzymes showed significant differences in their activities to hydrolyze different xylans from different sources . For the crude enzyme , if the activity to birchwood xylan was set as 100% , then those to corncob xylan and bagasse xylan were 143% and 124% respectively .

Key words : *Pencillium corylophilum* ; xylanase ; purification ; substrate-specificity

大部分微生物木聚糖酶的酶系都含有一种以 上的木聚糖酶. 木聚糖酶系主要包含 (1) 内切木聚

收稿日期 2000 - 04 - 11 , 修订日期 2000 - 11 - 15 .

作者简介 : 杨瑞金 (1964 -) , 男 , 江西瑞金人 , 工学博士 , 副教授 .

万方数据

糖酶(EC 3.2.1.8);(2) 端切木聚糖酶(EC 3.2.1.92)(3) β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)^[1,2]. 内切木聚糖酶水解木聚糖成低聚木糖, 而 β -木糖苷酶水解低聚木糖为木糖. 国内外对微生物木聚糖酶进行了不少的研究, 近年来已报道从黑曲霉^[3-4]、海枣曲霉^[5]、木霉^[6]等真菌和短小芽孢杆菌^[7]、梭状芽孢杆菌^[8]等细菌和链霉菌^[9]的培养液中纯化得到木聚糖酶. 顶青霉 P-3-31 是一株从土壤中筛选到的产木聚糖酶的菌株, 所产木聚糖酶(粗酶) 具有较高的木二糖形成活力, 水解桦木木聚糖得到的水解产物主要为木二糖和木三糖等低聚木糖, 木糖含量极低^[10]. 另外该酶(粗酶) 还能在水解木聚糖主链的同时水解木聚糖分子的阿拉伯糖基侧链^[10]. 由于木聚糖酶一般不能水解由带有侧链基团的木糖残基构成的 β -1,4 木糖苷键, 因此木聚糖主链与侧链的同时水解对木聚糖的彻底水解具有重要的意义.

国内对具有较高木二糖形成活力的木聚糖酶的研究未见报道. 作者首先对 P-3-31 菌株产木聚糖酶粗酶液进行分离纯化、鉴定, 然后对各纯化酶组分的一些基本性质和底物特异性等进行研究.

1 材料与方法

1.1 粗酶制剂

将顶青霉 P-3-31 菌株接种于以木聚糖、麸皮和蛋白胨为主要成分的培养基中, 30 ℃ 发酵 4 d, 发酵液用 4 层纱布过滤, 滤液即为粗酶液.

1.2 化学试剂

桦木木聚糖, CMC, 果胶, 对硝基苯- β -木糖苷(pNPX) 为 Sigma 公司产品; Sephacryl S-200、CM-Sephadex C-50、Con A-Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品; 普鲁兰为日本林原株式会社产品; 玉米芯木聚糖和蔗渣木聚糖按文献^[11]的方法提取.

1.3 分析方法

1.3.1 木聚糖酶(Xylanase) 活力测定 按文献^[12]的方法进行. 取 1 mL 0.2 mol/L (pH 4.5) 醋酸缓冲液配制的 1% 桦木木聚糖悬浮液, 加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 50 ℃ 反应 15 min, 沸水浴保温 10 min 灭酶, 3,5-二硝基水杨酸(DNS) 法^[13]测定酶解液中的还原糖量(以木糖计). 每分钟产生 1 微摩尔木糖的酶量定义为 1 个酶活单位.

1.3.2 β -木糖苷酶(β -xylosidase) 活力测定 按文献^[14]的方法进行. 取 0.5 mL 2.5 mmol/L 的对硝基苯- β -木糖苷(pNPX) 溶液(0.2 mol/L 醋酸缓冲液, pH 3.8), 加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 50 ℃ 反应 30

min, 加入 4 mL 0.25 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应, 410 nm 测定释放的对硝基苯酚的量. 每分钟释放 1 微摩尔的对硝基苯酚的酶量定义为 1 个酶活单位.

1.3.3 CMC 酶活测定 按文献^[15]的方法进行. 取 1 mL 1% CMC 溶液(0.2 mol/L 的醋酸缓冲液, pH 4.8), 加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 50 ℃ 酶解 30 min, 沸水浴保温 10 min 灭酶, DNS 法测定酶解液的还原糖量(以葡萄糖计). 每分钟产生 1 微摩尔葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位.

1.3.4 蛋白质测定 柱层析时用紫外检测仪测定, 其它采用 Folin-酚法^[16].

1.3.5 氨基酸分析 按文献^[17]的方法进行.

2 结果与讨论

2.1 酶组分的分离纯化

顶青霉 P-3-31 木聚糖酶的分离过程已进行了报道^[18], 图 1 是该菌株木聚糖酶的 CM-Sephadex C-50 柱层析图.

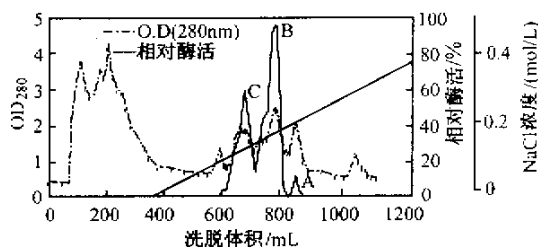


图 1 木聚糖酶 CM-Sephadex C-50 柱层析图

Fig.1 CM-Sephadex C-50 column chromatography of xylanases

木聚糖酶经 CM-Sephadex C-50 分离成 3 部分, 即 Part A、Part B 和 Part C. 3 部分酶的总酶活比例为: Part B 53.7%, Part C 37.3%, Part A 9%. Part B 和 Part C 经 Sephacryl S-200 和 ConA-Sepharose 4B 亲和色谱进一步分离纯化后, 经 SDS-PAGE 电泳检验, Part B 为均一成分, 相对分子质量为 24 200; Part C 基本为均一成分, 相对分子质量为 48 300^[18]. 大量文献报道的木聚糖酶的相对分子质量都比较小, 一般都在 10 000 – 50 000 之间^[5,19,20], 少量报道^[21]大于 50 000.

2.2 Part B 和 Part C 的氨基酸组成

表 1 是经分离纯化最后得到的 Part B 和 Part C 的氨基酸组成. 可通过氨基酸组成分析蛋白质一级结构之间的相关性^[22], 经计算 Part B 和 Part C 之间的差异指数 $DI = 6.30$, 组成离差 $D = 0.0364$, Mar-

chalonis 和 Weltman 指数 $S\Delta Q = 13.20$. 据此可以判断 Part B 和 Part C 的一级结构具有强相关性.

表 1 顶青霉 P-3-31 木聚糖酶(Part B 和 Part C)的氨基酸组成

Tab.1 Amino acid composition of xylanase components from P-3-31

氨基酸	Part B 质量分数/%	Part C 质量分数/%
ASP	15.1	13.7
THR	8.8	10.1
SER	10.9	8.9
GLU	11.2	10.0
GLY	13.3	10.4
ALA	7.0	10.5
CYS	0.4	0
VAL	7.5	7.8
MET	0.6	0
ILE	4.0	4.9
LEU	2.9	6.2
TYR	5.3	3.3
PHE	5.4	2.9
LYS	1.5	4.4
HIS	1.7	1.3
ARG	2.7	2.3
PRO	2.3	4.0
羟基氨基酸	19.7	18.7
酸性氨基酸	26.3	23.7
碱性氨基酸	5.9	8.0

2.3 木聚糖酶的性质

2.3.1 pH 值对木聚糖酶酶活影响 在不同 pH 值的 0.2 mol/L 的醋酸(pH 3.5~5.5)、磷酸(pH 5.5~7.5)和 Tris-HCl(pH 7.5~8.5)缓冲液中分别测定 Part A、Part B 和 Part C 水解梓木木聚糖的活力,结果见图 2.

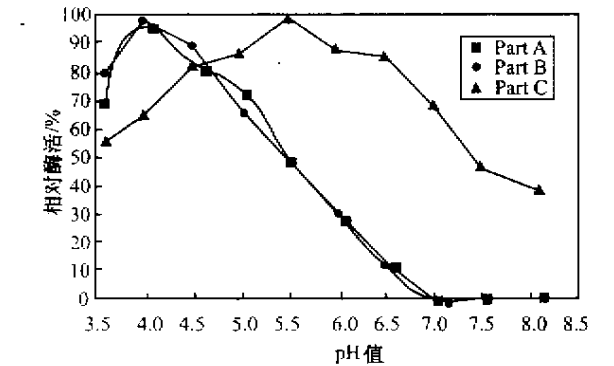


图 2 pH 值对纯酶酶活的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of purified enzymes 从图 2 可以看出,Part A 和 Part B 的酶活与 pH 值的关系相近,而 Part C 显示很大的差异.Part C 的酶活受 pH 值变化的影响要比 Part A 和 Part B 小.

Part A、Part B 和 Part C 之间的最适 pH 值相差 1.5. 2.3.2 pH 值对木聚糖酶稳定性的影响

将酶液置于不同 pH 值的 0.2 mol/L 的缓冲液中 30 ℃保温 24 h,然后测定酶活.pH 值对 Part A、Part B 和 Part C 的稳定性的影响见图 3.

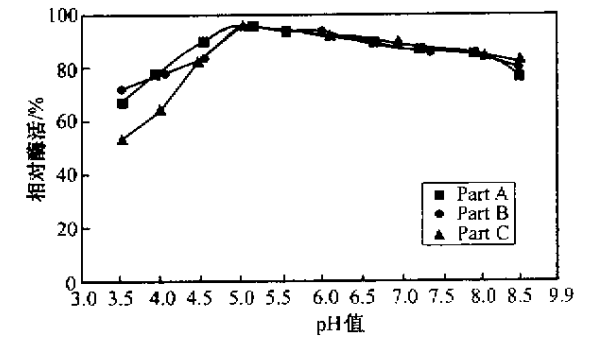


图 3 30 ℃时 pH 值对纯酶稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on the stability of purified enzymes at 30 ℃

从图 3 可以看出,纯化酶 Part A、Part B 和 Part C 的 pH 值稳定性曲线极为相似.各酶在比较宽的 pH 值范围内(pH 4~8)都比较稳定,在 pH 5 左右最稳定.从前面的结果可知,Part A 和 Part B 的最适 pH 值为 4.0,Part C 的最适 pH 值为 5.5.这说明最适 pH 值和稳定 pH 值有一定的关系,但两者又确实体现了酶的两种不同的性质.据报道,大多数微生物来源的木聚糖酶的最适 pH 值和稳定 pH 值范围都基本一致.

2.3.3 温度对木聚糖酶酶活的影响 从图 4 可以看出,Part A 和 Part B 的酶活与温度的关系比较相近,但与 Part C 有很大的差异.Part A 和 Part B 的最适温度为 45 ℃,Part C 的最适温度为 55 ℃.Part C 的耐热性能比 Part A 和 Part B 好.

2.3.4 温度对木聚糖酶稳定性的影响 将上述 3 种酶液分别于 30~80 ℃的水浴中保温 30 min,立即置于冰浴,然后按前面的方法测定酶液的残余活力.从图 5 可以看出,Part C 比 Part A 和 Part B 的耐热性好.

2.3.5 化学物质对木聚糖酶的影响 将酶液与一定浓度的化学物质混合,30 ℃保温 30 min,测定酶的保留活力.试验发现,Ag⁺和 Hg²⁺对 Part A、Part B 和 Part C 均有较强烈的抑制作用;Mn²⁺对 Part A 和 Part B 有一定的抑制作用,但对 Part C 有一定的促进作用,这与一些报道^[5]不一致;Cu²⁺在 1 mmol/L 的浓度下对 3 种酶的活力影响不大,但浓度达到 10 mmol/L 时对它们有较强烈的抑制作用;Co²⁺和 Pb²⁺在较低的浓度下(1 mmol/L)对 3 种酶均有一定

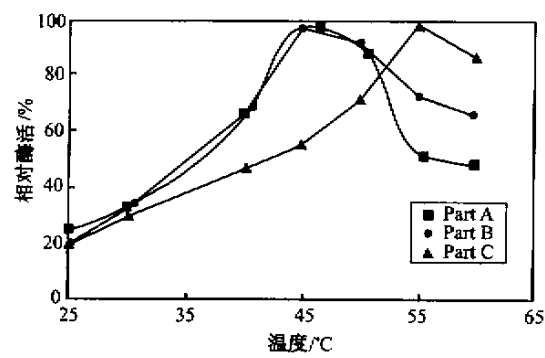


图 4 温度对纯化酶组分酶活的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of purified enzymes

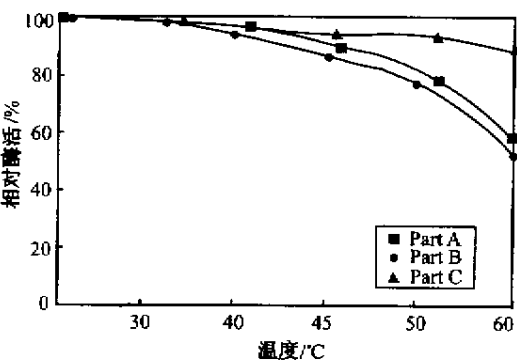


图 5 温度对纯化酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature onthe stability of purified enzymes

的抑制作用。EDTA 在 5 mmol/L 时对 3 种酶几乎没有影响,但浓度提高到 10 mmol/L 时有一定的影响;1 mmol/L 的 SDS 对 Part A 和 Part B 已有很大的影响,但对 Part C 影响不大。12 mmol/L 的 SDS 对 3 种酶的酶活均有强烈的抑制作用。尿素对 3 种酶的酶活影响都不大,浓度达到 0.5 mol/L 时它们仍具有较高的酶活。

2.3.6 酶的底物特异性

采用相同质量分数(1%)的不同种类的底物在相同的酶反应条件下测定各酶的酶活,结果见表 3。

Part A 和 Part B 具有高度的底物特异性;Part C 具有水解 CMC 的活力,但不能水解果胶和普鲁兰。很多文献^[23, 24]报道了具有水解 CMC 活力的木聚糖酶。有一种是两种水解活力的活性部位位于同一蛋白的同一活性部位,另一种是两种活力的活性部位位于同一蛋白的不同活性部位^[1]。Part C 属于哪一种情况有待于作进一步的研究。

表 3 底物对粗酶和纯化酶的酶活的影响

Tab.3 Effect of various substrates on the activity of crude enzyme and purified enzymes %

底 物	粗酶液	PART A	PART B	PART C
桦木木聚糖	100	100	100	100
玉米芯木聚糖	142	129	137	174
蔗渣木聚糖	124	123	118	120
CMC	2.5	0	0	5.7
果胶	0	0	0	0
普鲁兰	0	0	0	0

3 种纯化酶及粗酶对不同来源的木聚糖的活性均表现出一定的差异。在试验的 3 种来源的木聚糖底物中,玉米芯木聚糖为底物时酶活最高,蔗渣木聚糖次之,桦木木聚糖最低。对于粗酶来说,若以桦木木聚糖为底物时的相对酶活为 100% 计,则以玉米芯为底物时的相对酶活为 143%,以蔗渣木聚糖为底物时的相对酶活为 124%。Toshio Irie^[25]在进行一株木霉木聚糖酶的底物特异性的研究中也得到相似的结果。

2.3.7 β -木糖苷酶活性 β -木糖苷酶(β -xylosidase)的活力测定按文献[14]的方法进行,各酶的 β -木糖苷酶酶活测定结果如表 4。Part A 和 Part B 无 β -木糖苷酶活力,但 Part C 具有 β -木糖苷酶活力。粗酶具有的 β -木糖苷酶活力是 Part C 产生的。 β -木糖苷酶活力是指从木聚糖(主要指低聚木糖)的一端水解出木糖的活力,能水解木二糖成木糖。 β -木糖苷酶活力的国际通行的测定方法就是前面采用的以对硝基苯- β -木糖苷(pNPX)为底物的方法,测定从底物中释放的对硝基苯酚的量来计算酶活。按上述方法测得的实际上是酶从对硝基苯- β -木糖苷(pNPX)中释放木糖的能力。由于 β -木糖苷酶活力的测定不是以木二糖为底物进行的,因此测得的 β -木糖苷酶活力就不一定是真正的水解木二糖的活力。1980 年,Biely 等报道^[26]了具有水解对硝基苯- β -木糖苷

表 4 粗酶和纯化酶的 β -木糖苷酶活力与 β -木聚糖酶活力之比

Tab.4 The ratio of the β -xylosidase activity to β -xylanase activity of crude enzyme and purified enzymes

酶	β -木糖苷酶与 β -木聚糖酶活力之比
粗酶	1.84×10^{-3}
Part A	0
Part B	0
Part C	4.79×10^{-3}

(pNPX)活力但不能水解木二糖的一种木聚糖酶。对 Part C 的水解动力学和水解模式的研究证实 Part C 不具有水解木二糖的能力,因此可以认为 Part C 就是具有 β -木糖苷酶活力但不具有水解木二糖活力的木聚糖酶。

参考文献：

[1] KEN K Y ,LARRY U L ,JOHN N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganism[J]. **Microbiological Review** , 1988 ,52 :305 ~ 317.

[2] PETER Biely. Microbial Xylanolytic System[J]. **Trends in Biotechnology** , 1985 ,3(11) :286 ~ 290.

[3] 福本寿一郎 ,迁阪好夫 ,竹西繁行 .Study on the Hemicellulases[J]. 日本农芸化学会志 ,1970 ,44(10) :447 ~ 456.

[4] 陈惠忠 ,高培基 ,王祖农 .黑曲霉 An-76 木聚糖酶系的酶学研究[J]. 微生物学报 ,1991(2) :100 ~ 107.

[5] 曾宇成 ,张树政 .海枣曲霉木聚糖酶的提纯和性质[J]. 微生物学报 ,1987 ,27(4) :343 ~ 349.

[6] ADRIANE M F ,MILARGRES L S. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicilium janthinellum*[J]. **Enzyme Microb Technol** , 1993(3) :248 ~ 253.

[7] WATANALAI Panbangred ,ATSUHIKO Shinmyo ,SHINCHI Kinoshita , *et al.* Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus Pumillu*[J]. **Agric Biol Chem** , 1983(5) :957 ~ 963.

[8] PATRICE Pellerin ,MICHELE Gosselin ,JEAN-PAUL Lepoutre , *et al.* Enzymatic production of oligosaccharides from corncob xylan [J]. **Enzyme Microb Technol** , 1991(13) :617 ~ 621.

[9] MASAKI Marui ,KOTOYOSHI Nakanishi ,TSUNEO Yasui. Purification and properties of three types of xylanases induced by Methyl β -xyloside from *Streptomyces sp*[J]. **Agric Biol Chem** , 1985 ,49(12) :3399 ~ 3400.

[10] 杨瑞金 .酶法低聚木糖生产的研究[D]. 无锡 :无锡轻工大学 ,1998.

[11] 黄文涛 ,胡学智 .酶应用手册[M]. 上海 :上海科学技术出版社 ,1989.

[12] SRIDEVI R ,AJIT V. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology** , 1990 ,34 :141 ~ 144.

[13] 北京大学生物系生化教研室 .生物化学实验指导[M]. 北京 :人民教育出版社 ,1979.

[14] YU E K ,TAN L U ,CHAN M K , *et al.* Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus*[J]. **Enzyme Microb Technol** , 1987(9) :16 ~ 24.

[15] 钱嘉渊 .酶的测定方法[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1992.

[16] 北京大学生物系生化教研室 .生物化学实验指导[M]. 北京 :人民教育出版社 ,1979.

[17] 陶慰孙编著 .蛋白质分子基础[M]. 北京 :高等教育出版社 ,1980.

[18] 杨瑞金 ,许时婴 ,王璋 .顶青霉木聚糖酶的分离纯化与鉴定[J]. 无锡轻工大学学报 ,1999 ,18(2) :39 ~ 44.

[19] MASAKI Marui ,KOTOYOSHI Nakanishi ,TSUNEO Yasui. Purification and properties of three types of xylanases induced by Methyl β -xyloside from *Streptomyces sp*[J]. **Agric Biol Chem** , 1985 ,49(12) :3399 ~ 3407.

[20] JOHN M ,SCHMIDT B ,SCHMIDT J. Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylanases and a β -D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*[J]. **Can J Biochem** , 1979 ,57 :125 ~ 137.

[21] UCHINO F ,NAKANE T. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus sp*[J]. **Agric Biol Chem** , 1981 ,45 :1121 ~ 1127.

[22] HIRS C ,SERGE N. Methods in Enzymology(Vol.91) [M]. New York :Academic Press ,1983.

[23] TODA S H ,Suzuki K. Some enzymic properties and the substrate specificities of *Trichoderma*cellulases with special reference to their activity toward xylan[J]. **J Ferment Technol** , 1971 ,49 :499 ~ 521.

[24] SHIKATA S K. Purification and properties of an exo-cellulase component of novel type from *Trichoderma viride*[J]. **J Biochem** , 1975 ,78 :499 ~ 512.

[25] TOSHIO Irie ,TETSUYA Konishi ,YASUNORI Tagoyama , *et al.* Purification of xylanase from *Trichoderma viride*(*reesei*) mutant K-10-34 and its xylobiose-forming properties[J]. **Hakkokogaku** , 1990 ,68(6) :457 ~ 463.

[26] BIELY P ,VRSANSKA M ,KRATKY Z. Complex reaction pathway of aryl β -xyloside degradation by β -xylanase of *Cryptococcus albidus* [J]. **Eur J Biochem** , 1980 ,112 :375 ~ 381.