

文章编号:1673-1689(2005)06-0029-05

宇佐美曲霉木聚糖酶的纯化和性质

邬敏辰¹, 符丹丹², 朱 劼¹, 夏美芳¹

(1. 江南大学医学系,江苏 无锡 214063;2. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用缓冲液浸提、硫酸铵盐析、Phenyl- Sepharose CL- 4B 疏水层析和 Sephadex G- 75 凝胶过滤层析等分离纯化手段,从宇佐美曲霉 E001 固态发酵曲中分离出木聚糖酶组分,再经 DE- AE- Sepharose fast flow 阴离子交换层析进一步纯化,获得了两种电泳纯木聚糖酶 Xyn I 和 Xyn II. 分别采用 SDS- PAGEG- 75 凝胶过滤层析测得 Xyn I、Xyn II 相对分子质量,两种酶均为单体蛋白质;等电聚焦电泳测得两种酶的等电点(pI);测定了 Xyn I、Xyn II 的酶动力学常数;序列测定 Xyn II N 末端 15 个氨基酸残基的。

关键词: 宇佐美曲霉;木聚糖酶 Xyn I、Xyn II;分离纯化;性质

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Purification and Some Properties of Two Xylanases from *Aspergillus usamii*

WU Min- chen¹, FU Dan- dan², ZHU Jie¹, XIA Mei- fang¹

(1. Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Xylanases obtained from solid state cultivation of *Aspergillus usamii* E001 were separated by buffer extraction, ammonium sulfate precipitation, and Phenyl- Sepharose CL- 4B and Sephadex G- 75 column chromatographies. Xyn I and Xyn II were further purified to PAGE homogeneity by DEAE- Sepharose fast flow column chromatography. The molecular weights of Xyn I and Xyn II were determined as 24 400 and 26 800, respectively on SDS- PAGE and as 25 000 on G- 75 gel filtration, which indicated that the Xyn I or Xyn II was a monomer. The isoelectric points of Xyn I and Xyn II were determined as 5.0 and 4.2 by isoelectric focusing. The kinetics coefficients of Xyn I and Xyn II were also determined. The sequence of 15 amino acids at N- terminus of Xyn II was NH₂- SAGINYVQNYNGNLG.

Key words: *Aspergillus usamii*; Xylanases Xyn I or Xyn II; purification; properties

木聚糖酶是一类能特异性降解不同结构木聚糖酶的总称^[1],通常是指 β - D- 1,4- 木聚糖内切酶 (EC 3. 2. 1. 8),由于其在食品、饲料、医药、造纸、纺

织和能源等工业中潜在的应用前景而引起人们越来越广泛深入的研究^[1, 2]. 作者从众多丝状真菌中筛选获得了宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001

收稿日期:2005-03-01; 修回日期:2005-05-09.

基金项目:国家“九五”重大科技攻关项目(96-C03-02-01)资助课题.

作者简介:邬敏辰(1962-),男,江苏无锡人,副教授,分子生物学博士.

菌株,其固态发酵除了高产木聚糖酶以外,酸性蛋白酶、 β -葡聚糖酶、纤维素酶、 β -甘露聚糖酶、果胶酶和葡萄糖淀粉酶等的含量也较丰富。该复合酶非常适合用作饲料添加剂,有助于提高饲料营养物质的消化以及消除某些“抗营养因子”^[3]。

生物尤其是丝状真菌发酵除了产生多种不同的酶类之外,就木聚糖酶而言,许多微生物可同时产两种或两种以上的木聚糖酶,该现象在国内外文献中均有报道,特别是霉菌和放线菌^[4~6]。微生物木聚糖酶的分离纯化国内外已有较多的文献报道,而宇佐美曲霉木聚糖酶的分离纯化及其生物化学特性等方面的研究尚未见报道。作者对 E001 菌株固态发酵所产木聚糖酶 Xyn I 和 Xyn II 的分离纯化及部分理化性质进行了实验研究,为进一步研究木聚糖酶普遍存在的多型性机理打下基础,并通过测定纯酶 N 末端氨基酸残基序列,为克隆宇佐美曲霉木聚糖酶基因提供必要的生物学信息。

1 材料与方法

1.1 菌株

宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001 菌株:由江南大学医学系分子生物学研究室保藏。

1.2 主要试剂

桦木、燕麦木聚糖和 RBB- 木聚糖:购自 Sigma 公司;Phenyl- Sepharose CL- 4B, DEAE- Sepharose fast flow, Sephadex G- 75 和 SDS- PAGE 标准蛋白质购自 Pharmacia 公司;凝胶过滤标准蛋白质和两性电解质载体:购自 LKB 公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳主要试剂:购自上海华美公司(进口分装);其它均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

冷冻离心机(IEC MULTI- RF),常压层析系统,分光光度计(WFZ800- D3B),垂直蛋白电泳系统(Mini- PROTEAN II),等电聚焦电泳(DYY- 12C),凝胶成像系统(Touching 995)。

1.4 酶的分离纯化

除特别注明外,所有纯化过程均在 10 ℃ 以下进行,所用缓冲液均为 pH 7.5, 0.02 mol/L 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲溶液。

1.4.1 粗酶液制备 取一定量的固态发酵曲,用 6 倍体积缓冲液 40 ℃ 振荡浸提 30 min,过滤收集第 1 次滤液;再用 4 倍体积缓冲液洗涤滤渣,过滤收集第 2 次滤液。将第 1、2 次滤液合并即为木聚糖酶粗酶液。

1.4.2 硫酸铵析 于粗酶液中添加硫酸铵至

65%饱和度,4 ℃ 静置过夜,离心(4 ℃, 10 000 r/min, 15 min),弃上清液。沉淀用少量缓冲液溶解,并添加固体硫酸铵至终浓度 0.8 mol/L 即为疏水层析上样酶液(若出现浑浊,离心去除不溶物)。

1.4.3 疏水层析 将上述酶液上样至已用含 0.8 mol/L 硫酸铵的缓冲液平衡的疏水层析柱(1.6 cm × 25 cm)上,然后用含不同硫酸铵浓度的缓冲液进行阶段洗脱(体积流量 0.6 mL/min)和部份收集(1 管/10 min)。合并具有较高酶活性的收集液,盐析后离心,保留沉淀。

1.4.4 凝胶过滤层析 上述沉淀用少量缓冲液溶解,上样 1/2 体积的酶液至已用缓冲液平衡的 G- 75 凝胶层析柱(1.6 cm × 100 cm)上,缓冲液洗脱(体积流量 0.3 mL/min)和部份收集(1 管/10 min)。将木聚糖酶活性峰的收集液合并、用缓冲液透析和聚乙二醇浓缩。

1.4.5 阴离子交换层析 将 G- 75 分离的浓缩酶液上样至已用缓冲液平衡的阴离子交换层析柱(1.6 cm × 20 cm)上,用含不同 NaCl 浓度的缓冲液进行阶段洗脱(体积流量 0.4 mL/min)和部份收集(1 管/10 min)。对蛋白质吸收峰内的各收集液分别进行木聚糖酶活性和 SDS- PAGE 检测。将具有酶活性的单一蛋白区带的收集液分别合并,用 G- 25 脱盐,再用聚乙二醇浓缩或冷冻干燥,制得的样品用于酶的理化性质分析和 N 末端氨基酸序列的测定。

1.5 测定方法

1.5.1 木聚糖酶活性测定 参照 DNS 法^[7],略作改动。于 2.4 mL 0.5% 桦木木聚糖溶液(pH 4.6 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制)中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 ℃ 准确反应 15 min,立即加入 2.5 mL DNS 试剂终止反应,沸水浴 7 min 显色,迅速冷却后加水 5 mL 混匀,于 540 nm 比色。每分钟产生相当于 1 μmol 还原糖(以木糖计)的酶量定义为 1 个酶活性单位(IU)。

1.5.2 蛋白质质量浓度测定 参照 Lowry 法^[8]进行测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白;在酶的分离纯化过程中,蛋白质质量浓度以 OD_{280} 值表示。

1.5.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 Native- PAGE 采用不连续垂直板状电泳系统^[9],分离胶和浓缩胶浓度分别为 7.5% 和 3%;SDS- PAGE 也采用不连续垂直板状电泳系统^[10],分离胶和浓缩胶浓度分别为 12% 和 3%。

1.5.4 酶相对分子质量测定 分别采用 SDS- PAGE 和 Sephadex G- 75 凝胶过滤 2 种不同的相

对分子量测定体系. 前者测定的是酶蛋白亚基的相对分子质量, 后者为全酶蛋白的相对分子质量.

1.5.5 酶动力学常数测定 以不同浓度的木聚糖溶液(pH 4.6 柠檬酸- Na₂HPO₄ 缓冲液配制) 为底物, 常规法测定酶活性, 利用 Lineweaver- Burk 作图法求出酶的 K_m 和 V_{max} 值.

2 结果与讨论

2.1 酶的分离纯化

Phenyl- Sepharose CL- 4B 疏水层析柱上样酶液量 15 mL, 依次用含 0.8 mol/L、0.4 mol/L 和不含硫酸铵的缓冲液进行阶段洗脱, 整个洗脱曲线和酶活性分布曲线见图 1. 由图 1 可见, 该步分离纯化过程共出现 3 个蛋白质洗脱峰和 3 个木聚糖酶活性峰. 本研究将最大酶活性峰(第 1 个)中酶活性较高的部份收集液(第 80~280 min, 共 21 管)合并, 用于下一步的纯化.

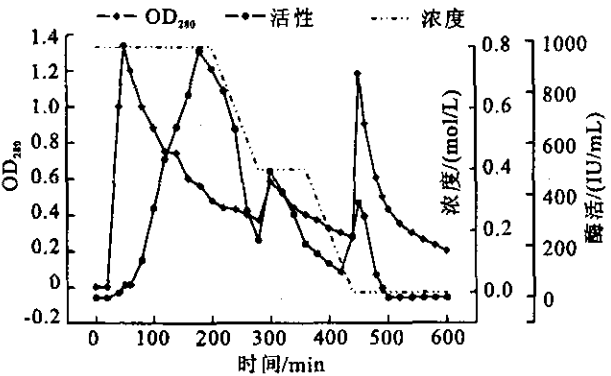


图 1 木聚糖酶的 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析
Fig. 1 Column chromatography of E001 xylanases on Phenyl-Sepharose CL-4B

沉淀溶解液 3.0 mL 上样至 Sephadex G- 75 层析柱中, 该步分离纯化过程出现多个蛋白质洗脱峰, 但仅出现 1 个与蛋白吸收峰相一致的酶活性峰(图略). 合并酶活性较高的收集液(第 220~310 min, 共 10 管), 浓缩至 8 mL 左右, 用于下一步的纯化.

上述 8 mL 浓缩酶液上样阴离子交换柱, 依次用含 0.02 mol/L、0.05 mol/L、0.08 mol/L 和 0.1 mol/L 的 NaCl 缓冲液进行阶段洗脱, 整个洗脱曲线和酶活性分布曲线见图 2. 由图 2 可见, 该分离纯化过程共形成 3 个分别与蛋白吸收峰相一致的木聚糖酶活性峰 I、I' 和 II, 分别合并峰 I 的 10 管收集液和峰 II 的 8 管收集液. SDS- PAGE 检测均为单一的蛋白条带, 但相对分子质量不同(见图 5), 依次命名为木聚糖酶 Xyn I 和 Xyn II. 而酶活性峰 I' 的 SDS- PAGE 检测结果为 Xyn I 和 Xyn II 的混

合蛋白条带.

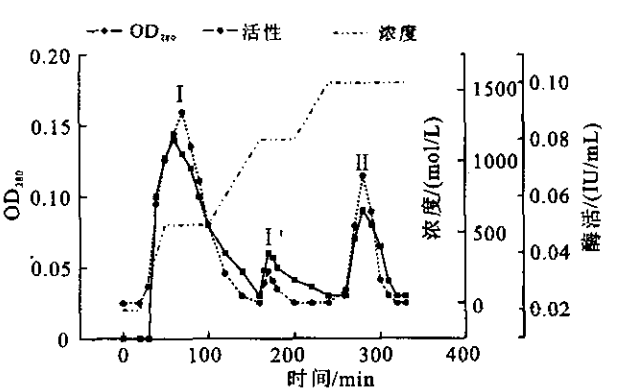


图 2 木聚糖酶的 DEAE-Sepharose fast flow 柱层析
Fig. 2 Column chromatography of E001 xylanases on DEAE-Sepharose fast flow

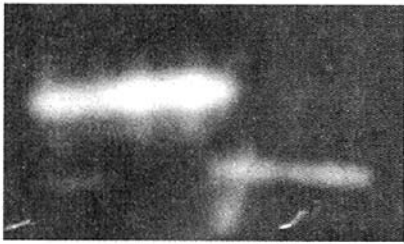
宇佐美曲霉 E001 木聚糖酶的主要纯化步骤、相应的酶活性和蛋白质测定结果, 以及各步纯化收率总结于表 1.

表 1 宇佐美曲霉 E001 木聚糖酶的分离纯化总结
Tab. 1 A summary of the purification of xylanases from *Aspergillus usamii* E001

纯化步骤	总酶活/ IU	总蛋白/ mg	比酶活/ (IU/mg)	纯化 倍数	回收 率/%
粗酶液	197 300	1 950	101	1.0	100
硫酸铵盐析	160 550	586	274	2.7	81.4
疏水层析	87 600	122	718	7.1	44.4
凝胶过滤层析	40 854	33.6	1 216	12.0	20.7
阴离子交换层析					
酶活性峰 I - Xyn I	20 574	8.1	2 540	25.1	10.4
酶活性峰 II - Xyn II	13 219	5.8	2 279	22.6	6.7

2.2 酶的部分理化性质

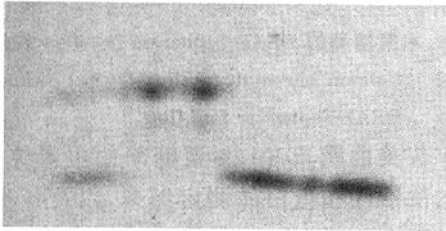
2.2.1 酶活性蛋白区带确定 分别将 Xyn I 和 Xyn II 样品加入 Native- PAGE 不同的上样孔内, 4 ℃ 下电泳以防止酶活性丧失. 电泳结束后, 首先用蒸馏水漂洗凝胶 1~2 次; 然后将该凝胶紧贴于 RBB- 木聚糖琼脂糖平板上, 置 40 ℃ 恒温培养箱中反应, 30 min 左右对着光观察清晰可见酶作用所形成的透明带, 该透明带(即酶活性区带)就是 XynA 或 XynB 所在的位置(见图 3); 最后将 PAGE 凝胶从琼脂糖平板上取下, 用一般的电泳染色法染色, 脱色后所显示的是蛋白质区带(见图 4). 由图 4 可见各泳道的蛋白质区带分别与图 3 中 Xyn I 和 Xyn II 活性区带的位置相一致, 说明图 4 的蛋白质区带分别是 Xyn I 和 Xyn II^[11].



1. G-75 酶液; 2, 3. Xyn I; 4, 5. Xyn II

图 3 Xyn I 和 Xyn II 酶活性图谱

Fig. 3 Zymogram of Xyn I and Xyn II



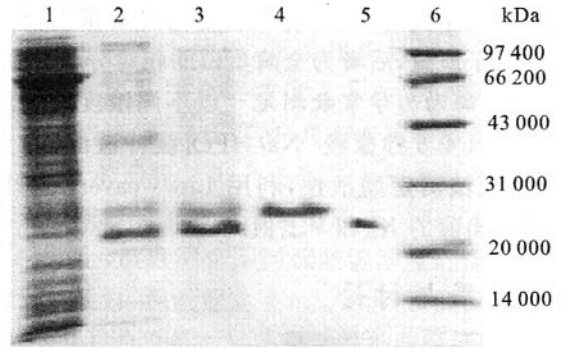
1. G-75 酶液; 2, 3. Xyn I; 4, 5. Xyn II

图 4 Xyn I 和 Xyn II 蛋白质图谱

Fig. 4 Protein bands of Xyn I and Xyn II

2.2.2 亚基和全酶相对分子质量测定 将 Xyn I 和 Xyn II 的 SDS-PAGE 相对迁移率(0.66 和 0.62)分别代入标准蛋白相对分子质量对数(Log M)及相对迁移率(R_f)的回归方程 $\text{Log } M = -1.0202 R_f + 5.0601$ 中, 求出亚基的相对分子质量分别为 24 400 和 26 800 (见图 5 第 5、4 泳道). 同时, 根据 G-75 凝胶过滤的标准蛋白质相对分子质量对数(Log M)及相对保留体积(V_e/V_0)的回归方程 $\text{Log } M = -0.981(V_e/V_0) + 6.187$, 以及 Xyn I 或 Xyn II 的相对保留体积 1.82 (由于 G-75 分辨率低, 使得 Xyn I 和 Xyn II 的出峰时间相同), 求出全酶的相对分子质量为 25 000 (见图 6). 两种体系测定结果相近, 表明 Xyn I 和 Xyn II 均为单体结构酶. 两种酶与 Lin 等^[12]和 Christakopoulos 等^[13]报道的低相对分子质量木聚糖酶的相对分子质量相近, 但在热稳定性和等电点等方面有显著差异.

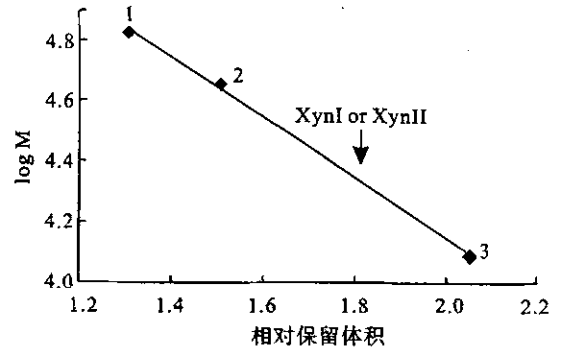
2.2.3 等电点测定 分别将 Xyn I 和 Xyn II 在不同泳道进行等电聚焦电泳, 电泳结束后顺电场方向切下 1~2 道空白泳道, 再按泳道垂直方向切成 5.0 mm 等距离的小块, 分别用 2 mL 重蒸水浸泡 10 min 后测定 pH 值, 绘制 pH-距离(mm, 离阳极)曲线. 同时, 将上样 Xyn I 和 Xyn II 的泳道的凝胶按常规染色、脱色, 根据 Xyn I 和 Xyn II 蛋白区带的位置, 从 pH-距离曲线上查出 Xyn I 和 Xyn II 的等电点, 分别为 5.0 和 4.2.



1. 粗酶液; 2. 疏水层析; 3. G-75 层析; 4. Xyn II; 5. Xyn I; 6. Marker

图 5 Xyn I 和 Xyn II 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of purified Xyn I and Xyn II



1. 牛血清白蛋白; 2. 卵清蛋白; 3. 细胞色素 C

图 6 凝胶过滤层析法测定相对分子质量

Fig. 6 G-75 for evaluation of molecular weight

2.2.4 中性糖质量测定 许多真核微生物所产木聚糖酶含有中性糖, 即属于糖蛋白. 糖基化对糖苷键水解酶在极端环境中的稳定性起着重要作用. 例如在大肠杆菌中表达碱性嗜热菌 *Bacillus* sp. 木聚糖酶基因, 其表达产物(重组酶)的热稳定性比野生型木聚糖酶差, 这主要是因为大肠杆菌重组酶去掉了糖基^[14]. 用苯酚-硫酸法测定从宇佐美曲霉 E001 菌株分离纯化的 Xyn I 和 Xyn II 却均不含中性糖. 这从一个方面说明了 Xyn I 和 Xyn II 的热稳定性较差(另文报道)的原因.

2.2.5 动力学常数测定 按照底物浓度对酶作用影响的规律, 在 0.2~20 mg/mL 一系列不同底物浓度下, 分别测定 Xyn I 和 Xyn II 反应初速度即酶活性, 利用 Lineweaver-burk 作图法求出它们对不同底物的动力学常数 K_m 和 V_{max} 值(表 2).

2.2.6 N 末端氨基酸残基序列测定 Xyn II N 末端 15 个氨基酸序列由中科院上海生化所蛋白质组学研究分析中心测定, 结果为 NH_2 -SAG-INYVQNYNGNLG. 通过 Blast 检索, 未见该菌种所产木聚糖酶的氨基酸序列报道, 但发现与曲霉属 *Aspergillus niger* 和 *Aspergillus kawachii* 木聚糖酶的 N 末端 15 个氨基酸残基序列有很高的同源

性.

表 2 XynA 和 XynB 的动力学常数 (两种木聚糖底物)
Tab. 2 Kinetic constants of XynA and XynB (two kinds of xylans as substrate)

木聚糖酶 组分	桦木木聚糖		燕麦木聚糖	
	$K_m /$ (mg/mL)	$V_{max} /$ (mol/ min · mg)	$K_m /$ (mg/mL)	$V_{max} /$ (mol/ min · mg)
Xyn I	0. 83	2 488	3. 8	3 731
Xyn II	9. 2	1 347	13. 6	2 358

3 结 论

本实验从宇佐美曲霉 E001 固态发酵曲中分离纯化出了两种木聚糖酶组分 Xyn I 和 Xyn II , 并测定了 Xyn I 和 Xyn II 的蛋白质化学性质, 包括

相对分子质量、等电点、中性糖质量、动力学常数和 Xyn II N 末端 15 个氨基酸残基序列等. 凝胶电泳和 G- 75 凝胶过滤层析等的分析与测定结果表明, Xyn I 和 Xyn II 均具有木聚糖酶活性, 电泳呈现单一蛋白区带, 属于酸性、低相对分子质量的单体酶蛋白.

在分离纯化过程中如 Phenyl- Sepharose CL- 4B 疏水层析, 本研究仅合并和进一步纯化了最大酶活性峰 (第 1 个) 中的部份收集液, 对后 2 个酶活性峰未收集. 由图 1 可见, 3 个酶活性峰中的木聚糖酶具有不同的疏水性, 说明除了 Xyn I 和 Xyn II 之外, E001 菌株固态发酵可能还产生其它种类的木聚糖酶, 有待于进一步的分离纯化, 为深入研究木聚糖酶普遍存在的多型性机理打下基础.

参考文献:

[1] 怀文辉,何秀萍,郭闻洁,等. 微生物木聚糖降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2002, 27(2): 137—139.

[2] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications; a review[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 326—338.

[3] 邬敏辰,邬显章. 饲用复合酶固体发酵工业化生产[J]. 饲料工业, 2003, 24(1): 5—8.

[4] Blanco J, Coquej J R, velasco J, *et al.* Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-β-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose- binding ability[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 208—217.

[5] 陈冠军,王娜,迟菲,等. 棘孢曲霉 SM- L22 木聚糖酶系主要组分的纯化与性质[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 351—355.

[6] 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.

[7] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. *J Biotechnol*, 1992, 23: 257—270.

[8] Lowry O H, Rousebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265—275.

[9] 刘毓秀,程桂芳. 蛋白质的凝胶电泳[M]. 北京:科学出版社, 1994.

[10] Lamemml U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio-phage T₄[J]. *Nature*, 1970, 227: 680—685.

[11] 陈红歌,朱静,梁改芹,等. 黑曲霉木聚糖酶的纯化与性质[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 111—116.

[12] Lin J, Ndlovu L M, Singh S, *et al.* Purification and biochemical characteristics of β- D- xylanase from a thermophilic fungus[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 30: 73—79.

[13] Christakopoulos P, Nerinckx W, Kekos D, *et al.* Purification and characterizat- ion of two low molecular mass alkaline xy- lanases from *Fusarium oxysporm* F3[J]. *J Biotechnol*, 1996, 51: 181—189.

[14] 江正强. 海栖热孢菌 xynB 基因的克隆和表达、重组木聚糖酶的提纯及其酶学性质[D]. 北京:中国农业大学, 2001. 6.

(责任编辑:杨 萌)