

文章编号: 1001-7453(1999)02-0039-06

顶青霉木聚糖酶的分离纯化与鉴定

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: 使用硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-25 凝胶色谱脱盐、DEAE-Sephadex A-25和 CM-Sephadex C-50离子交换色谱等分离纯化技术,从顶青霉(*Penicillium corylophilum*)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和 Part C经 Sephacryl S-200凝胶过滤色谱和 Con A-Sepharose 4B亲和色谱进一步分离纯化,分别得到 2个纯木聚糖酶组分. Part B经 SDS-PAGE鉴定为单带,相对分子质量为 24 200; Part C经 SDS-PAGE鉴定基本为单带,相对分子质量为 48 300.

关键词: 顶青霉;木聚糖酶;分离纯化

中图分类号: Q 556 **文献标识码:** A

木聚糖酶系比较复杂,不同来源的木聚糖酶的酶系有所不同.大部分微生物的木聚糖酶系都含有一种以上的木聚糖酶.木聚糖酶系主要包含^[1-2]内切木聚糖酶(E. C. 3. 2. 1. 8);端切木聚糖酶(E. C. 3. 2. 1. 92);木糖苷酶(E. C. 3. 2. 1. 37).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]等细菌以及链霉菌^[9]中纯化到木聚糖酶.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,该酶具有较高的木二糖形成活力,能很好地满足高含量低聚木糖的生产要求.国内对具有较高木二糖形成活力的木聚糖酶的研究尚未见报道.

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 粗酶液 将青霉 P-3-31菌株的培养液用 4层纱布过滤,滤液即为粗酶液.

1.1.2 主要化学试剂 桦木木聚糖、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)为 Sigma公司产品.丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 Fluka Chemie AG公司产品.四甲基己二胺(TEMED)、Sephacryl S-200、CM-Sephadex C-50、Con A-Sepharose 4B,以及标准蛋白质为 Pharmacia公司产品.其它化学试剂均为分析纯试剂.

收稿日期: 1998-09-11;修订日期: 1999-03-18

作者简介: 杨瑞金(1964年 8月生),江西瑞金人,工学博士,讲师.

1.2 分析方法

1.2.1 木聚糖酶活力的测定 按文献[10]的方法进行,在 1 mL用 0.2 mol/L的醋酸缓冲液(pH4.5)配制的桦木木聚糖悬浮液中添加 0.1 mL适当稀释的酶液,50℃反应 15 min,沸水浴 10 min灭酶,3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定酶解液中的还原糖量(以木糖计).每分钟产生 1 μ mol木糖的酶量定义为 1个酶活单位.

1.2.2 蛋白质测定 Folin-酚法^[11],以牛血清为标准蛋白质.

1.2.3 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 按文献[12]的方法进行,凝胶的质量浓度为 12.5 g/dL,缓冲液为 Tris甘氨酸溶液,pH 8.3.

2 结果与讨论

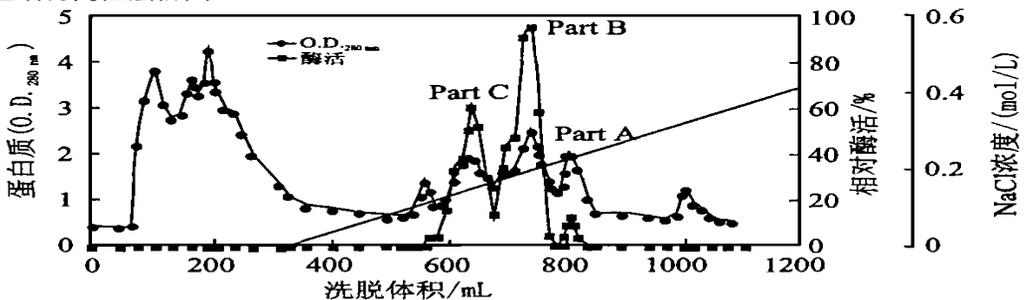
2.1 酶组分的分离纯化

2.1.1 (NH₄)₂SO₄分级沉淀 首先在粗酶液中添加固体(NH₄)₂SO₄至 20%饱和度,离心去除部分杂蛋白沉淀物,然后将体系的(NH₄)₂SO₄饱和度调节到 80%,冷冻离心弃去上清液,用 pH6.8,0.01 mol/L的磷酸缓冲液溶解沉淀.

2.1.2 Sephadex G-25凝胶过滤色谱脱盐 将经(NH₄)₂SO₄分级沉淀得到的粗酶制剂用 G-25柱脱盐,收集电导率低于 2 000 μ S/cm的酶液.

2.1.3 DEAE-Sephadex A-25离子交换色谱分离 经多次实验发现该木聚糖酶的等电点较高,在 DEAE-Sephadex A-25柱上,采用 pH6.8浓度 0.01 mol/L的磷酸缓冲液或 pH8.0浓度 0.01 mol/L的 Tris-HCl缓冲液作起始缓冲液,该木聚糖酶均不能很好地吸附到离子交换剂上;特别是采用 pH6.8,0.01 mol/L的磷酸缓冲液作起始缓冲液时,全部木聚糖酶很快流出.为此对经 Sephadex G-25凝胶过滤色谱脱盐的酶液先进行以 pH6.8,0.01 mol/L磷酸缓冲液作起始缓冲液的 DEAE-Sephadex A-25离子交换色谱纯化.对经 DEAE-Sephadex A-25离子交换色谱纯化的酶样用截留分子量为 3 000的聚砜膜在低温下超滤浓缩,对浓缩酶液冷冻干燥.

2.1.4 CM-Sephadex C-50离子交换色谱分离 将冷冻干燥得到的酶粉用 pH5.0浓度 0.01 mol/L的 HAc-NaAc缓冲液溶解,装入 MW 12 000的透析袋在低温下对 pH5.0浓度 0.01 mol/L的 HAc-NaAc缓冲液进行透析,透析 4 h后离心去除沉淀物.透析后的酶样上 CM-Sephadex C-50柱进行离子交换色谱分离.图 1为木聚酶的 CM-Sephadex C-50离子交换色谱分离柱层析图.



分离条件:柱 2.6 cm \times 50 cm; 起始缓冲液 pH5.0,0.01 mol/L HAc-NaAc,流速 9 mL/(cm²·h)

图 1 木聚糖酶 CM-Sephadex C-50分离柱层析图

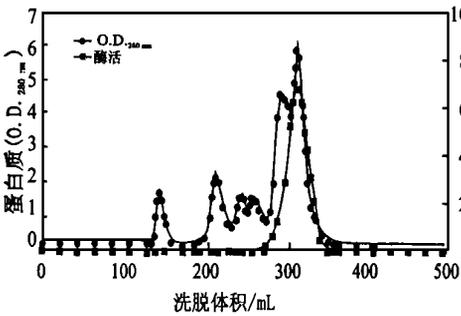
木聚糖酶经 CM-Sephadex C-50离子交换色谱分离成 3 部分,即 Part A Part B和 Part C.其中 Part B和 Part C所占的比例比较大(酶活),而 Part A所占的比例很小.因此,只对 Part B和 Part C进行进一步分离纯化.

2.1.5 Part B和 Part C的进一步分离纯化

1) Part B的进一步分离纯化

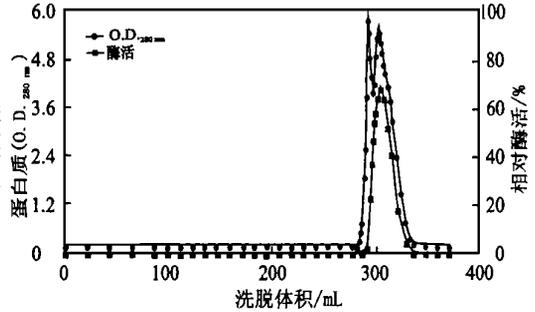
将收集到的 Part B上 Sephacryl S-200柱进一步分离纯化.该柱的尺寸为 1.6 cm× 150 cm,具有很高的分辨率. Part B在 Sephacryl S-200柱上的分离情况见图 2. Part B经 Sephacryl S-200柱分离成 6 个峰,只有最后一个峰有酶活.

收集有酶活的部分进行第二次 Sephacryl S-200分离.第二次 Sephacryl S-200分离的缓冲液仍为 pH 5.0, 0.3 mol/L 的 HAc-NaAc.但为了提高分辨率将流速从 20 mL/h 降至 11 mL/h.第二次 Sephacryl S-200分离的分离情况见图 3.第二次 Sephacryl S-200分离得到 2 个峰,且都比较尖,但仍然交盖.酶活峰为后面一个峰.经一次 CM-Sephadex C-50和 2 次 Sephacryl S-200分离后仍不能将酶完全纯化,说明杂质与酶的电性质和相对分子质量极为相似.



分离条件: 柱 1.6 cm× 150 cm; 缓冲液 pH 5.0, 0.03 mol/L HAc-NaAc, 流速 10 mL/(cm²·h)

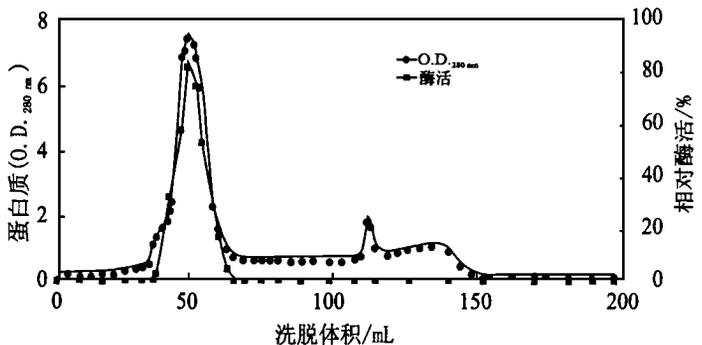
图 2 Part B 经第一次 Sephacryl S-200 柱分离层析图



分离条件: 柱 1.6 cm× 150 cm; 缓冲液 pH 5.0, 0.03 mol/L HAc-NaAc, 流速 5.5 mL/(cm²·h)

图 3 Part B 经第二次 Sephacryl S-200 分离柱层析图

收集后一个峰进行亲和色谱分离纯化.图 4 是 Part B 经 ConA-Sephacryl 4B 亲和色谱分离纯化的柱层析图.操作条件见图 4 注释.从柱层析图中可以看出,酶蛋白不能为 ConA-Sephacryl 4B 吸附,但杂蛋白可以为 ConA-Sephacryl 4B 吸附.纯化得到的 Part B 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检验为单带(见 2.2 之图 8).



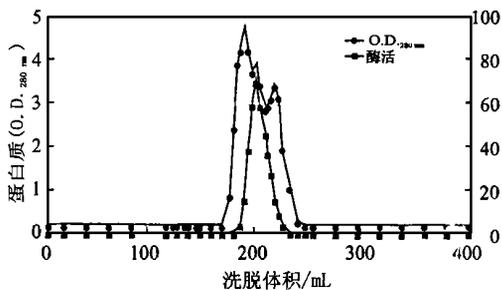
分离条件: 柱 1.0 cm× 30 cm; 起始缓冲液 pH 6.8, 0.5 mol/L 磷酸缓冲液 (加 0.5 mol/L NaCl 溶液); 洗脱液: 0.02 mol/L 甲基- α -D-甘露糖苷 (Methyl- α -D-Mannopyranoside); 流速 20 mL/(cm²·h)

图 4 Part B ConA-Sephacryl 4B 亲和色谱柱层析图

2) Part C 的进一步分离纯化

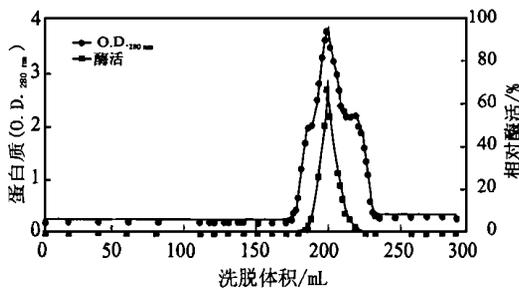
化

Part C的进一步的分离纯化过程同 Part B.图 5~ 7分别为 Part C经 Sephacryl S-200柱第一次、Sephacryl S-200柱第二次和 Con A-Sepharose 4B亲和色谱分离的柱层析图.操作条件见图注释.



分离条件: 柱 1.6 cm \times 150 cm; 缓冲液 pH 5.0, 0.3 mol/L HAc-NaAc; 流速 10 mL/(cm 2 ·h)

图 5 Part C经第一次 Sephacryl S-200柱层析图



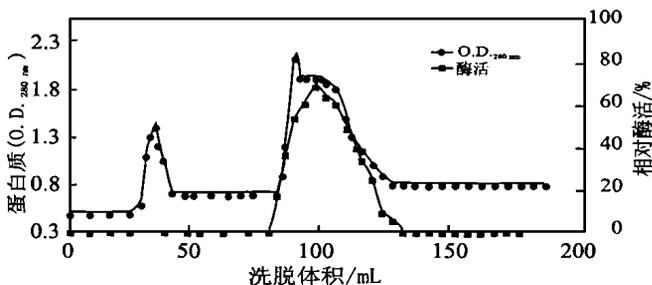
分离条件: 柱 1.6 cm \times 150 cm; 缓冲液 pH 5.0, 0.3 mol/L HAc-NaAc; 流速 5.5 mL/(cm 2 ·h)

图 6 Part C经第二次 Sephacryl S-200柱层析图

Part C与 Part B的一大区别是: Part C能吸附到 ConA-Sepharose 4B上而 Part B则不能吸附到 ConA-Sepharose 4B上(见图 4-7).

Part C和 Part B的分离过程相同,分离结果也相似,纯化得到的 Part C经 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳检验基本为单带.

顶青霉木聚糖酶的主要分离纯化过程总结于表 1.



分离条件: 柱 1.0 cm \times 30 cm; 起始缓冲液 pH 6.8, 0.5 mol/L磷酸缓冲液(加 0.5 mol/L NaCl溶液); 洗脱液: 0.02 mol/L 甲基- α -D甘露糖苷(Methyl- α -D-Mannopyranoside); 流速 20 mL/(cm 2 ·h)

图 7 Part C ConA-Sepharose 4B亲和色谱柱层析图

表 1 顶青霉木聚糖酶的分离纯化

分离纯化步骤	总酶活 / (mmol/min)	总蛋白 / mg	比酶活 / (μ mol/(min \cdot mg))	纯化倍数	酶活回收率 / %
粗酶液	235	7680	30.6	1.0	100
(NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 沉淀	215	3267	65.8	2.2	91.5
DEAE-Sephadex A-25离子交换色谱	118	627.4	188.1	5.4	50.2
DEAE-Sephadex C-50离子交换色谱					
Part A	6.42	46.76	137	4.5	2.73
Part B	38.5	111.0	347	11.3	16.4
Part C	26.1	81.0	322	10.5	11.1
Sephacryl S-200凝胶过滤色谱					
Part A	21.8	20.5	1063	34.7	9.3
Part B	15.7	28.8	545	17.8	6.6
Part C					

2.2 酶组分的纯度鉴定和相对分子质量的测定

将纯化所得 Part B和 Part C两组分进行 SDS-PAGE分析.图 8的结果表明, Part B为均一成分, Part C基本为均一成分.

图 9 为标准蛋白质和纯化酶在相同 SDS-PAGE 电泳条件下得到的相对分子质量 M_r 和迁移率 R_f 的关系. 将纯化酶的迁移率 R_f (Part B 为 0.524, Part C 为 0.270) 代入标准蛋白质相对分子质量的对数对迁移率 R_f 的回归方程 ($\lg M_r = -1.1827R_f + 5.0034$), 计算得 Part B 的相对分子质量为 24 200, Part C 的相对分子质量为 48 300.

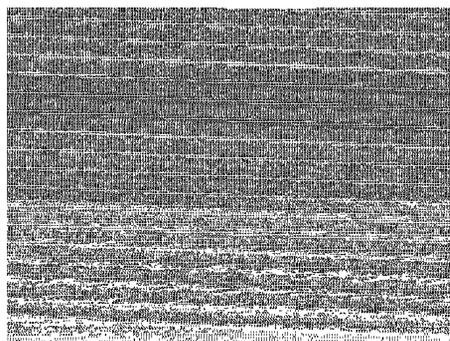


图 8 标准蛋白质和纯化酶的电泳图片

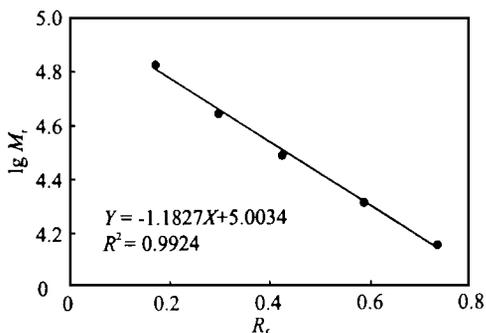


图 9 标准蛋白质相对分子质量和迁移率 R_f 关系曲线

SDS-PAGE 电泳条件: 凝胶质量分数为 12.5%, 缓冲液为 Tris-甘氨酸溶液, pH 8.3.

S 标准蛋白质 (Pharmacia 公司产品). 其组成和相对分子质量为: 磷酸化酶 b (phosphorylase b) 94 000, 清蛋白 (albumin) 67 000, 卵清蛋白 (ovalbumin) 43 000, 碳酸化酶 (carbonic anhydrase) 30 000, 胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor) 20 100, α -乳清蛋白 (α -lactalbumin) 14 400.

B Part B; G Part C.

以 SDS-PAGE 测得的相对分子质量和由 Sephacryl S-200 测得的相对分子质量不一致, 后者所测结果偏小, 这说明 Part B 和 Part C 都与 Sephacryl S-200 有相互作用.

3 结 论

从顶青霉 (*Penicillium corylophilum*) 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 和 Part C 所占的比例比较大 (酶活), 而 Part A 所占的比例很小. 对 Part B 和 Part C 的进一步分离纯化和 SDS-PAGE 分析表明, Part B 和 Part C 的相对分子质量分别为 24 200 和 48 300, 这与文献报道^[7,13]的 24 000 和 48 000 基本一致.

参考文献:

- [1] WONG K Y, TAN U L, SADDLET J N. Multiplicity of β -1, 4- Xylanase in Microorganism. Functions and Application [J]. **Microbiological Review**, 1988, 52 305~ 317
- [2] PETER BIELY. Microbial Xylanolytic Systems [J]. **Trends in Biotechnology**, 1985, 11: 286~ 290
- [3] 福本寿一郎, 迁阪好夫, 竹西繁行. Study on the Hemicellulasesm [J]. 日本农业化学会志, 1970, 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, 4 343~ 349
- [6] ADRIANE M F, MILAGRES L S. Characterization of Xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum* [J]. **Enzyme Microb Technol**, 1993, 3 248~ 253
- [7] WATANALAI PANBANGRED, ATSUHIKO SHINMYO, SHINICHI KINOSHITA, et al.

- Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumillus*[J]. **Agric Biol Chem**, 1983, 5 957~ 963
- [8] PATRICE PELLERIN, MICHELE GOSSSELIN, JEAN-PAUL LEPOUTRE, et al. Enzymic production of oligosaccharides from corn cob xylan[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1991, 8 617~ 621
- [9] MASAKI MARUI, KOTOYOSHI NAKANISHI, TSUNEO YASUI. Purification and properties of three types of xylanases induced by Methl (- xyloside from *Streptomyces* sp [J]. **Agric Biol Chem**, 1985, 12 3399~ 3407
- [10] SRIDEVI RAJARAM, AJIT VARMA. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1990, 34 141~ 144
- [11] LOWRY O H, OLIVER H, NIRA J, et al. Protein Measurement with the Folin phenol reagent [J]. **J Biol Chem**, 195, 265~ 275
- [12] SCHAGGER H, JAGOW G V. Tricine- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 k Da [J]. **Anal Biochem** 1987, 368~ 379
- [13] YASUSHI MITSUISHI, TAKASHI YAMANOBE, MITSUO YAGISAWA, et al. Purification and properties of the thermostable xylanases from Mesophilic Fungus strain Y- 94 [J]. **Agric Biol Chem**, 1987, 12 3207~ 3213

Purification and Identification of *Xylanases* from *Penicillium Corylophilum*

YANG Rui-jin, XU Shi-ying WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract Three parts of xylanases (Part A, Part B and Part C) were separated and purified from a culture filtrate of *Penicillium corylophilum* No. P-3-31 by ammonium precipitation, DEAE-Sephadex A-25 and CM-Sephadex C-50 column chromatography. Part B was further purified to homogeneity by Sephacryl S-200 and Con A-Sepharose 4B column chromatography, and Part C was further purified to almost homogeneity by the same procedures as Part B. The molecular weight of Part B and Part C was estimated to be 24, 200 and 48, 300 respectively by SDS-PAGE.

Key words *xylanase*; *penicillium corylophilum*; purification