

文章编号 :1009 - 038X( 2001 )03 - 0280 - 04

# 顶青霉木聚糖酶的水解动力学与水解模式

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( *Penicillium corylophilum* )培养液中分离纯化得到的 3 种木聚糖酶组分( Part A , Part B 和 Part C )对其水解动力学和水解模式的研究结果表明 ,3 种木聚糖酶的动力学常数( 桦木木聚糖为底物 )分别为 :Part A ,  $K_m = 1.00 \text{ mg/mL}$  ,  $V_{max} = 0.159 \text{ U/mL}$  ;Part B ,  $K_m = 1.59 \text{ mg/mL}$  ,  $V_{max} = 0.274 \text{ U/mL}$  ;Part C ,  $K_m = 0.85 \text{ mg/mL}$  ,  $V_{max} = 0.200 \text{ U/mL}$  . 3 种木聚糖酶的水解模式相同 ,主要从一端( 非还原端 )水解得到木三糖和木二糖 ,并且得到木三糖的速度大于得到木二糖的速度 ,水解会产生木四糖 ,但木四糖会很快进一步水解成木二糖 ,木四糖水解成木糖和木三糖的可能性极小 ,木三糖会进一步水解成木糖和木二糖 ,但速度不快 ,木二糖不会进一步水解。粗酶水解玉米芯木聚糖时 ,阿拉伯糖侧链的水解与木聚糖主链的水解同步进行 ,粗酶中含有水解阿拉伯糖基侧链的阿拉伯糖苷酶活力。

关键词 :顶青霉 ;木聚糖酶 ;水解动力学 ;水解模式

中图分类号 :Q556.2

文献标识码 :A

## Dynamics and Modes of Action of Xylanases from *Penicillium corylophilum* on Xylan

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

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

**Abstract** : Dynamics and mode of acting on xylan of three parts of xylanases( Part A , Part B and Part C ) separated and purified from a culture filtrate of *Penicillium corylophilum* No. P-3-31 were investigated. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the three purified enzymes with birchwood xylan as a substrate were  $1.00 \text{ mg/mL}$  and  $0.159 \text{ U/mL}$  for Part A ( pH 4.0 ,  $50^\circ\text{C}$  ) ,  $1.59 \text{ mg/mL}$  and  $0.274 \text{ U/mL}$  for Part B ( pH 4.0 ,  $50^\circ\text{C}$  ) and  $0.85 \text{ mg/mL}$  and  $0.200 \text{ U/mL}$  for Part C ( pH 5.5 ,  $50^\circ\text{C}$  ). Based on the dynamic studies , it was deduced that three purified enzymes had the same mode of action on xylan. Xylotriose and xylobiose were main hydrolysates of long-chain xylan by these enzymes. Xyloligosaccharides upwards from xylotetraose were immediately hydrolyzed , and xylotetraose was mainly hydrolyzed to xylobiose. Xylotriose was slowly hydrolyzed , but xylobiose was unable to be further hydrolyzed by these enzymes. The studies on the hydrolysis dynamics of xylan from corncob with crude enzyme showed that the hydrolysis of arabinose side-chain was almost simultaneous with the hydrolysis of xylan , therefore it could be concluded that there existed a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in crude enzyme.

收稿日期 2000 - 04 - 11 ;修订日期 2001 - 03 - 01 .

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

**Key words :** *Penicillium corylophilum* ; xylanase ; hydrolysis dynamics ; mode of dynamics

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。另外,该酶(粗酶)在水解木聚糖主链的同时水解木聚糖分子的阿拉伯糖侧链<sup>[1]</sup>。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  $\beta$ -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。

有关 P-3-31 菌株木聚糖酶的分离纯化和分离得到的 3 个纯化酶组分的基本性质和底物特异性在前面的文章中已作了报道<sup>[2]</sup>。3 个纯化酶组分的基本性质和底物特异性都有一定的差异,但它们水解木聚糖得到的主要水解产物均为低聚木糖,木糖的含量极低。作者对从 P-3-31 菌株产木聚糖酶粗酶液分离得到的 3 个纯化酶组分的水解动力学和水解模式等进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**木聚糖酶粗酶液** 将 P-3-31 菌株接种于培养基中(玉米芯木聚糖 1.8%,麸皮 1.5%,蛋白胨 1.2%) 30℃培养 4 d,培养液用 4 层纱布过滤,滤液即为粗酶液。

### 1.2 化学试剂

桦木木聚糖为 Sigma 公司产品,玉米芯木聚糖按文献[3]的方法提取,其它化学试剂均为分析纯试剂。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 木聚糖酶活力测定** 按文献[4]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 10 min 灭酶,3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[5]</sup>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 还原糖测定** 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖量参见文献[5],Smogyi-Nelson 法测定还原糖量参见文献[6]和[7]。

**1.3.3 总糖的测定** 按文献[8]的方法进行。

**1.3.4 水解液糖组分测定** 采用离子色谱法测

定,Carbopac PA1-PG1 柱,脉冲安培检测器,Dionex 2010I 型离子色谱仪,淋洗液为 0.15 mol/L NaOH 溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 木聚糖酶动力学常数的测定

采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk)<sup>[9]</sup>测定 Part A、Part B 和 Part C 3 个纯化酶组分的  $K_m$  和  $V_{max}$  值。以桦木木聚糖为底物,反应条件为 50℃、5 min,采用 Smogyi-Nelson 法测定酶反应产生的还原糖量,各酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  的测定结果如表 1。

表 1 纯化木聚糖酶的动力学常数

Tab.1 Kinetic constants of purified xylanases		
木聚糖酶(Xylanase)	$K_m$ /(mg/mL)	$V_{max}$ /(U/mL)
Part A	1.00	0.159
Part B	1.59	0.274
Part C	0.851	0.200

已报道的木聚糖酶的  $K_m$  值相差很大。Philippe<sup>[10]</sup>报道来源于 *Clostridium thermolacticum* 的纯化木聚糖酶的  $K_m$  值为 0.65 mg/mL。陈惠忠<sup>[11]</sup>等报道的来源于一株黑曲霉的几种木聚糖酶的  $K_m$  值则要高得多,分别为 6.1、10.3 和 15.9 mg/mL(用燕麦木聚糖作为底物)。日本的 Yasushif<sup>[12]</sup>以低聚木糖(聚合度 4~8)作底物测定木聚糖酶的  $K_m$  值时发现,随着底物相对分子质量的提高,木聚糖酶的  $K_m$  值逐渐变小,即底物的聚合度对  $K_m$  值有很大的影响。由于不同研究者使用的底物有很大的差异以及其它条件也不可能完全相同,因此不同研究者报道的  $K_m$  值相差较大。

表 1 的 Part A、Part B 和 Part C 的  $K_m$  值都比较小,说明在本研究中选择酶解反应条件下,它们与底物有比较大的亲和力。Part C 的  $K_m$  值最小,只有 Part B 的二分之一。

### 2.2 木聚糖酶的水解动力学和水解模式

研究各酶水解桦木木聚糖的动力学过程可以推断各酶在水解木聚糖时的水解模式,同时还可以为水解过程的控制提供有用的信息。

以桦木木聚糖和玉米芯木聚糖为底物分别进行纯化酶和粗酶的水解动力学和水解模式研究。在一定的量的 0.4%的桦木木聚糖或玉米芯木聚糖悬浮

液(用 0.2 mol/L, pH 4.0 和 5.5 的 HAc-NaAc 缓冲液配制)中加入适量酶液,在一定温度下进行水解,定时取样,100 ℃水浴灭酶 10 min 后分析水解液组成(离子交换色谱分析).图 1~4 分别是 Part A、Part B、Part C 和粗酶水解桦木木聚糖的水解液糖成分随时间变化的曲线,图 5 为水解过程中水解度随时间变化的曲线.

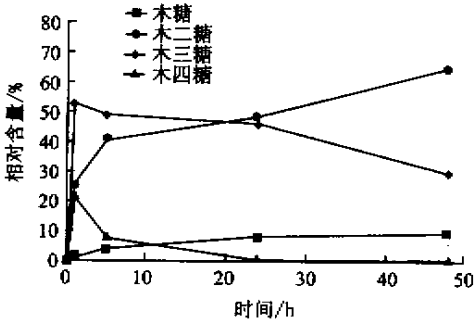


图 1 Part A 水解桦木木聚糖水解释进程曲线  
Fig.1 Time course of hydrolysis of birchwood xylan by Part A

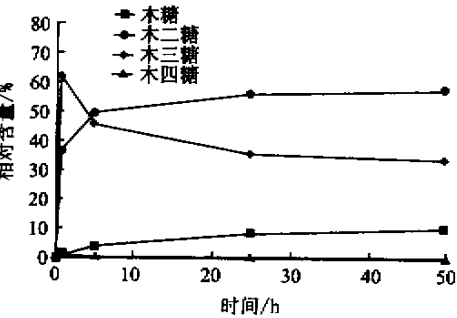


图 2 Part B 水解桦木木聚糖水解释进程曲线  
Fig.2 Time course of hydrolysis of birchwood xylan by Part B

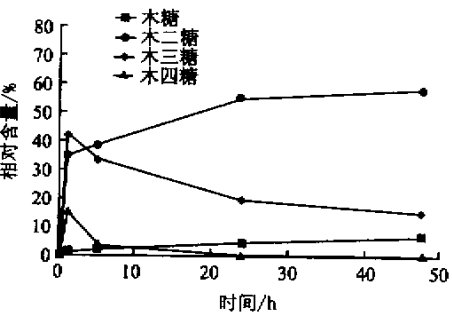


图 3 Part C 水解桦木木聚糖进程曲线  
Fig.3 Time course of hydrolysis of birchwood xylan by Part C

从图 1 至图 4 可以看出,3 个纯化酶组分 Part A、Part B 和 Part C 水解桦木木聚糖和粗酶水解玉米芯木聚糖的水解液糖份组成随时间变化的规律基本相同.在水解的开始阶段,水解产物中木三糖

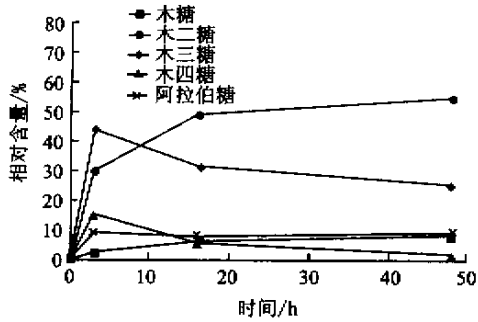


图 4 粗酶水解玉米芯木聚糖水解释进程曲线  
Fig.4 Time course of hydrolysis of birchwood xylan by crude enzyme

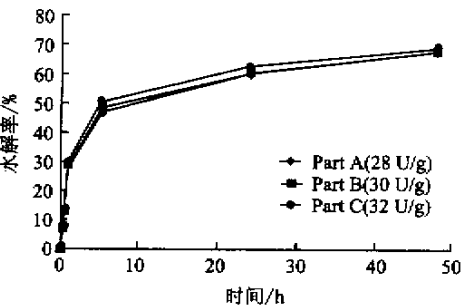


图 5 三个纯化酶组分水解桦木木聚糖水解释度随时间的变化  
Fig.5 Effect of time on DH during the hydrolysis of birchwood xylan by three purified enzymes

的比例大于木二糖,但随着水解时间的进一步延长,木二糖比例升高而木三糖比例下降,木四糖在开始阶段有一定比例,但随着水解过程的继续,木四糖的比例逐步降低并趋于 0,木糖的比例虽然会随时间的延长而升高,但一直处于很低的水平(最终不超过 10%).因此可以作出如下推论:

- 1)从长链木聚糖中水解得到木三糖的速度大于水解得到的木二糖的速度.
- 2)木三糖可进一步水解成木二糖和木糖,但速度不快.
- 3)木四糖可比较快地进一步水解成木二糖,木四糖水解成木三糖和木糖的速度极低,甚至不可能.
- 4)长链木聚糖水解成木四糖的速度远低于水解成木三糖和木二糖的速度或四糖水解成木二糖的速度很快.
- 5)木二糖不会进一步水解成单糖,长链木聚糖也不会水解出木糖.

结合还原糖(水解率)的生成速度和水解液糖份组成随时间的变化规律,可得出这样的结论:该酶水解长链木聚糖时,从一端(非还原端)水解得到

木三糖和木二糖的速度要大于从中间裂解长链木聚糖产生四糖以上糖的速度。

综上所述 ,Part A、Part B 和 Part C 水解木聚糖的水解模式相同 ,主要从从一端(非还原端)水解得到木三糖和木二糖 ,并且得到木三糖的速度大于得

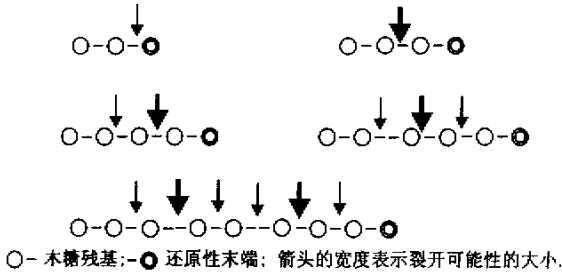


图 6 顶青霉木聚糖酶的水解木聚糖的作用模式  
Fig.6 Modes of action of xylanases from *Penicillium corylophilum* on xylan

到木二糖的速度 ;能水解产生木四糖 ,但木四糖会很快地进一步水解 ;木四糖主要水解成木二糖 ,水解成木糖和木三糖的可能性极小 ;木三糖会进一步水解成木糖和木二糖 .具体作用模式如图 6.

从图 1 至图 2 可以看出 ,3 个纯化酶组分 Part A、Part B 和 Part C 水解桦木木聚糖和粗酶水解玉米芯木聚糖的水解液糖份组成随时间变化的规律也基本相同 ,这也从另一角度表明上述 3 个纯化酶组分基本反映整个粗酶的性质。

从粗酶水解玉米芯木聚糖的水解进程曲线可以看出 ,水解液中阿拉伯糖的相对比例在整个水解过程中基本保持不变 .这说明阿拉伯糖侧链的水解是与整个木聚糖的水解同步进行的 .粗酶中含有水解阿拉伯糖侧链的阿拉伯糖苷酶活力 ,这对木聚糖的水解是有利的。

参考文献 :

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

[ 2 ] 杨瑞金 ,许时婴 ,王 璋. 顶青霉木聚糖酶的纯化与性质 [ J ]. 无锡轻工大学学报 ,2001 ,20( 1 ) 35 ~ 39.

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

[ 4 ] SRIDEVI Rajaram ,AJIT Varma. Production and characterization of xylanase from bacillus thermoakalophilus grown on agricultural wastes [ J ]. **Applied Microbiology and Biotechnology** ,1990 ,34 :141 ~ 144.

[ 5 ] 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.

[ 6 ] SMOGYI M. J. Note on sugar determination [ J ]. **J Biol Chem** ,1952 ,195 :19 ~ 23.

[ 7 ] NORTON Nelson. A photometric adaptation of the smogyi method for determination of glucose [ J ]. **J Biol Chem** ,1944 ,153 :375 ~ 379.

[ 8 ] SASAKA M ,OZER E. Aqueous Extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup [ J ]. **Biotechnology and Bioengineering** ,1995 ,45 :517 ~ 523.

[ 9 ] O. R. 菲尼马著. 食品化学 [ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1991.

[ 10 ] PHILIPPE Debeire ,BERNARD Priem ,GERARD Strecker. Purification and properties of an endo-1 *A*-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe ,Clostridium thermolacticum [ J ]. **Eur J of Biochem** ,1990 ,187 :573 ~ 580.

[ 11 ] 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 ,31( 2 ) :100 ~ 107.

[ 12 ] YASUSHI Mitsuishi ,TAKASHI Yamanobe ,MITSUO Yagisawa. Modes of Action of Three xylanases from Mesophilic Fungus Strain Y-94 on Xylooligosaccharides [ J ]. **Agric Biol Chem** ,1988 ,52( 12 ) :921 ~ 927.

( 责任编辑 朱 明 )