

棘孢曲霉 SM-L22 木聚糖酶系主要组分的纯化与性质

陈冠军 王 娜 迟 菲 刘 稳

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 经超滤浓缩、分子筛色谱、阴离子和阳离子交换层析,由棘孢曲霉发酵液最终分离得到 4 个电泳纯的木聚糖酶主要组分 Xy-1、Xy-2、Xy-3 和 Xy-4。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得各组分的分子量分别是 92.13、32.40、42.40 和 27.03 kD。实验证明这些酶组分均属于酸性木聚糖酶,Xy-1、Xy-2、Xy-3 和 Xy-4 的最适反应 pH 分别为 5.0、4.0、4.6 和 3~3.5。各酶组分在酸性条件下较稳定,碱性条件下酶活丧失较快。Xy-1 及 Xy-2 的最适反应温度在 75℃,在 50℃以下比较稳定;Xy-3 及 Xy-4 最适反应温度为 55℃,在 40℃以下比较稳定。通过对各酶组分米氏常数的测定可知,Xy-1 及 Xy-2 对底物桦木木聚糖的 K_m 值分别为 0.36% 和 0.26%,Xy-3 及 Xy-4 的 K_m 值为 2.46% 和 13.9%。4 种组分的 V_{max} 分别为 4.01 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、8.81 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、81.97 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、4.71 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 。 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对各组分都有较强的抑制作用, Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 能促进 Xy-3 的木聚糖酶活, Ca^{2+} 也可大幅度促进 Xy-4 的木聚糖酶活性。

关键词 棘孢曲霉,木聚糖酶,分离纯化,基本性质

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1001-6209 (2004) 03-0351-05

天然存在的木质纤维生物物质中含有 20% ~ 30% 的半纤维素类物质,其主要成分是木聚糖,这些杂多糖类物质与纤维素连接在一起^[1]。木聚糖作为半纤维素的一种,在自然界中是含量仅次于纤维素的可再生性多糖。它包含了一个吡喃木糖单位通过 β -1,4 糖苷键连接的同聚多糖链的糖链骨架,该骨架含有多种取代基,包括 O-乙酰基、 α -L-阿拉伯呋喃糖基、 α -1,2-连接的葡萄糖醛酸或 4-O-甲基葡萄糖醛酸等^[2]。木材中硬木木聚糖的聚合度大约为 150 ~ 200,比较木的木聚糖高,软木的木聚糖的聚合度大约为 70 ~ 130^[3]。

木聚糖酶在饲料工业^[4]、制浆造纸工业^[5]、食品工业^[6]、能源工业^[7]中都显示出广阔的应用前景,已经引起科技工作者的普遍关注,尤其是用于制浆造纸工业的酶法漂白技术研究异常活跃^[8~11]。

曲霉 SM-L22 是一株纤维素酶产生菌,同时也是一个好的木聚糖酶产生菌。该菌所产纤维素酶具有外切酶活很低,而内切酶活较高的特点,符合造纸生物技术的基本要求。许多实验表明,木聚糖酶可以与纤维素酶一起用于废纸浆的酶法脱墨^[12~15],达到较好的脱墨效果。曾利用 SM-L22 所产纤维素酶

粗酶液对废纸浆进行了脱墨实验,取得了较好的结果^[16]。为了探讨酶法脱墨的机理,我们已经对该菌株的纤维素酶系进行了较为详细的研究^[17]。因此对该菌株所产木聚糖酶系进行分析,掌握它的特性,有助于探讨纤维素降解酶系的脱墨机理,为该菌株在生物制浆造纸中的应用打下基础,并用于指导生产。

1 材料和方法

1.1 菌株

棘孢曲霉 SM-L22 由山东大学微生物技术国家重点实验室筛选。

1.2 培养基和菌种培养条件

种子培养基:10% 麸皮浸汁,2% 琼脂,自然 pH, 121℃,灭菌 30min。固体发酵培养基:100g 麸皮中加入 5.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,按水:麸皮为 1:1 的比例加入自来水,自然 pH, 121℃,灭菌 30min。菌种活化后,用接种环将菌种孢子接入内含 100g 培养基的 500mL 三角瓶中,28℃培养 120h。其间进行扣瓶,使其蓬松,使菌种生长均匀。

1.3 主要试剂和实验器材

1.3.1 主要试剂:白桦木聚糖、羧甲基纤维素钠

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30070022 和 30170028)

作者简介 陈冠军(1957-),男,山东滕州市人,教授,博士,主要从事微生物生理生化研究。Tel:86-531-8364429;Fax:86-531-8565610;E-mail:guanjun@sdu.edu.cn

收稿日期 2003-08-18,修回日期 2003-12-25

(CMC)购自 Sigma 公司。分子筛层析介质 Bio-Gel P-60 为 Bio-Rad 公司(Hercules, CA, 美国)生产。离子交换琼脂糖凝胶 DEAE-Sepharose (fast flow)和 CM-Sepharose (fast flow)、考马斯亮蓝 R250、SDS-PAGE 低分子量标准蛋白为 Pharmacia 产品。四甲基乙二胺购于 Bio-Rad, SDS 和 Tris 为 Sigma 产品。其它化学药品和试剂均采用国产分析纯试剂或生物试剂。

1.3.2 主要器材 : (1) 杯式超滤器 ($\phi 62\text{mm}$) 和 5000 NMWL 和 10000 NMWL 聚醚砜超滤膜 ($\phi 62\text{mm}$), 由 Millipore Incorporation 公司生产 (Beverly, 美国)。 (2) 层析系统 : 柱层析系统一 : 紫外检测仪 (Pharmacia LKB. UV-MII)、记录仪 (Pharmacia LKB. REC102)、分步收集器、蠕动泵 (Pharmacia LKB. Pump P-1)、梯度洗脱仪 (Pharmacia LKB. Switch Valve PSV-50) 均由 Pharmacia LKB 公司生产。柱层析系统二 : FPLC 柱层析系统 (Biological Workstation with Biological controller, Model 2128 Fraction Collector), 由 Bio-Rad 公司生产。 (3) 电泳设备 : 垂直电泳系统 (Mini-PROTEAN II), 由 Bio-Rad 公司生产。

1.4 实验方法

1.4.1 粗酶液的制备 棘孢曲霉 SM-L22 固体发酵成熟后, 以 1:20 的比例加入蒸馏水 (或 0.02 mol/L, pH 6.0 缓冲液) 浸泡提取, 8 层纱布过滤, 滤液经 10000r/min 离心 20min。上清液用 10000 NMWL 的超滤膜更换缓冲液为 0.02mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液并浓缩 20 倍, 即为分子筛柱层析上样样品。

1.4.2 分子筛柱层析 : 将聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel P-60 充分溶胀, 装柱 ($\Phi 1.6\text{cm} \times 90\text{cm}$) 后用 0.02mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液充分平衡。上样量为 2.0mL, 流速 0.2mL/min, 每 20min 收集一管。280nm 检测, 并根据蛋白含量的不同分别采取不同的检测器灵敏度。

1.4.3 离子交换柱层析 : 将弱阴离子琼脂糖凝胶 DEAE-Sepharose Fast Flow 和弱阳离子琼脂糖凝胶 CM-Sepharose Fast Flow 装柱 ($\Phi 1.0\text{cm} \times 10\text{cm}$), 用不同 pH 的缓冲液 (DEAE-Sepharose Fast Flow 用 0.02mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液 ; CM-Sepharose Fast Flow 用 0.025mol/L, pH 4.8 的醋酸缓冲液) 充分平衡 (大约平衡 10 个柱体积) 后上样。用 NaCl (于缓冲液中) 线性梯度洗脱, 收集活力蛋白峰。

1.4.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[18] 采用垂直板式不连续系统电泳方式, 分离胶浓度为 12% 或 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 分析方法

1.5.1 木聚糖酶活的测定方法^[19] : 用 0.02mol/L, pH 4.8 的醋酸缓冲液制备 0.5% 的木聚糖溶液。取 1.0mL 木聚糖溶液, 加入适当稀释的酶液 0.5mL, 50℃反应 30min, 加入 1.5 mL 的 DNS 试剂终止反应, 煮沸 10min 冷却后, 定容至 25mL, 测定 550nm 光吸收, 以木糖做标准曲线。以每分钟生成 1 μmol 还原糖作为一个酶活单位。

1.5.2 蛋白含量测定 : 采用 Folin-酚法^[20] 测定蛋白质含量, 以牛血清蛋白 (BSA) 做标准曲线。

2 结果和分析

2.1 粗酶液的分子筛柱层析

超滤浓缩的木聚糖酶粗酶液样品经 Bio-Gel P-60 分子筛柱层析分离后, 得到的蛋白峰形并不明显, 检测木聚糖酶活, 得到 3 个活力峰。在第一活力峰中, 有一个肩出现, 显示第一蛋白峰可能有多个酶组分存在。分别收集这 3 个酶活峰, 依次标记为 P-60 I、P-60 II、P-60 III。

2.2 分子筛层析各组分进一步的分离纯化

将分子筛柱层析的 3 个酶活峰经超滤浓缩并更换缓冲体系, 分别进行 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析或 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析, 然后进行活性成分的离子交换再层析 (图 1)。

通过以上层析分离可知, 棘孢曲霉 SM-L22 的木聚糖酶是一个多组分的酶系。其中 4 个分离的组分经分析为电泳纯, 分别命名为 Xy-1、Xy-2、Xy-3、Xy-4, 其余多个组分因含量较低而未能得到电泳纯组分。同时经测定, 4 种组分均没有羧甲基纤维素酶酶活。各酶组分的回收情况见表 1。

表 1 棘孢曲霉 SM-L22 木聚糖酶系的分离纯化结果
Table 1 Purification of xylanase components from *Aspergillus aculeatus* SM-L22

Components	Total proteins /mg	Total activities /U	Specific activities /(U/mg)	Purification /fold	Recovery /%
Crude enzyme	6321	7965	1.26	1	100
Xy-1	5.04	53.16	10.54	8.37	0.6
Xy-2	5.41	43.74	8.1	6.43	0.55
Xy-3	1.71	39.54	23.1	18.3	0.5
Xy-4	7.08	121.81	17.2	13.65	1.53

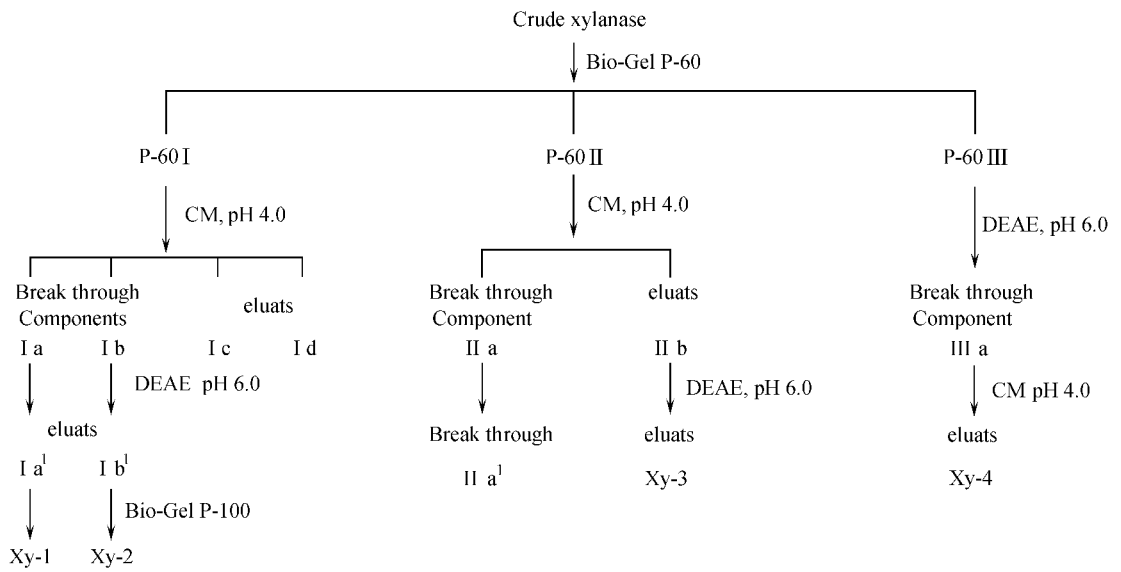


图 1 SM-L22 木聚糖酶系分离纯化流程图

Fig.1 The separation flow chart of xylanase components from *Aspergillus aculeatus* SM-L22

DEAE. DEAE-Sepharose FF ;CM. CM-Sepharose FF. All the components listed in the chart were the ones which possess xylanase activities.

2.3 木聚糖酶各组分的基本性质

2.3.1 各酶组分的分子量测定 将分离纯化得到的 4 种酶组分 Xy-1、Xy-2、Xy-3 和 Xy-4 进行 SDS-PAGE (图 2)。经与标准蛋白的比较与计算,计算出 Xy-1 的分子量为 92.13kD,Xy-2 的分子量为 32.40kD,Xy-3 的分子量为 42.40kD,Xy-4 的分子量为 27.03kD。

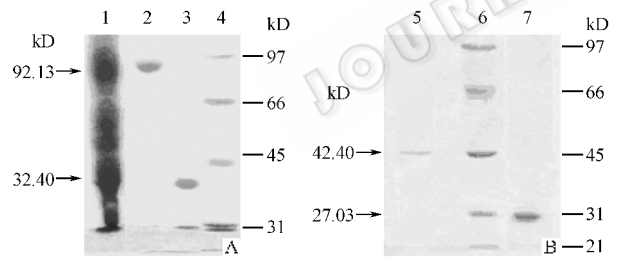


图 2 各酶组分的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE of the components of Xylanases separated from *Aspergillus aculeatus* SM-L22

A :12% gel ;B :15% gel. 1.Crude enzyme ; 2. Xy-1 ; 3. Xy-2 ; 4 and 6. Protein marker (low Mw kit) ; 5. Xy-3 ; 7. Xy-4.

2.3.2 最适温度的测定:温度对酶促反应温度的影响有两个方面^[6]:一方面是当温度升高时,与一般化学反应一样,反应速度加快;另一方面,由于酶本身是蛋白质,随着温度升高会逐步变性失活,从而降低酶的反应速度。酶反应的最适反应温度就是这两种过程平衡的结果。在本实验中,在不同温度下分别测定了 4 酶组分对木聚糖作用的各酶活,反应时间为 30min。从实验结果可以看出,在反应时间为 30min 时,Xy-1 和 Xy-2 的最适作用温度为 75℃,Xy-3

及 Xy-4 的最适作用温度均为 55℃。在低于最适酶活的 55 ~ 30℃ 的范围内,Xy-3 酶活性的下降速度比其它 3 个组分缓慢,但在高于 55℃ 时酶活性迅速丧失。

2.3.3 木聚糖酶温度稳定性 将酶液分别在不同温度下保温 60 min,每隔 10 min 取一次样,以初始酶活作为 100%,测定保温不同时间后的酶活。如果以 80% 的残存酶活为衡量指标的话,结果显示 Xy-1 在 60℃ 以下比较稳定,Xy-2 在 50℃ 以下稳定,Xy-3 和 Xy-4 两酶组分的热稳定性比较差,只在 40℃ 以下才比较稳定。

2.3.4 最适 pH 的测定:用 0.02mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液 (pH 2.6 ~ 8.0) 配制不同 pH 的底物,其它条件同标准酶活测定方法,测定 4 个酶组分反应的最适 pH。实验结果显示,本实验中所分离到的木聚糖酶各组分都属于酸性木聚糖酶。Xy-1 最适 pH 为 5.0,并在 pH 3.6 ~ 6.6 范围内表现较高的木聚糖酶活性。Xy-2 最适 pH 为 4.0,并在 pH 2.6 ~ 6.0 范围内表现较高的木聚糖酶活性。Xy-3 最适 pH 为 5.6,并在 pH 4.6 ~ 6.6 范围内表现较高的木聚糖酶活性。Xy-4 的最适 pH 为 3.0 左右,在 pH 2.6 ~ 6.0 范围内均表现出高而稳定的木聚糖酶活性,只有在 pH 大于 6.6 时酶活性才迅速降低。

2.3.5 pH 稳定性的测定 将各酶组分分别置于 pH 2.6 ~ 8.0 的系列缓冲溶液中,4℃ 放置 24h,然后按常规方法测定剩余酶活,以最高酶活力作为 100%。如果以保存 80% 的残存活力作为稳定性判断标准

的话,实验结果显示,4 种木聚糖酶组分 Xy-1、Xy-2、Xy-3 和 Xy-4 的 pH 稳定范围分别为 pH 3.6 ~ 6.6、pH 2.6 ~ 6.6、pH 4.6 ~ 6.6 和 pH 2.6 ~ 7.0。其中 Xy-3 的 pH 稳定范围较窄,在 pH 低于 4.6 和 pH 大于 7.0 时酶活迅速下降,在 pH 3.0 以下酶活完全丧失。Xy-4 的 pH 耐受情况较好,在 pH 2.6 ~ 7.0 范围内均能保持较高酶活。

2.3.6 各酶组分的酶动力学性质测定 对于分离到的 4 个酶组分,测定不同木聚糖浓度对酶反应的影响,按照 Lineweaver-Burk 作图法,求得酶动力学常数 K_m 和 V_{max} (表 2)。

从表 2 中可以看出,Xy-1 和 Xy-2 的 K_m 值较低,说明它们对底物的亲和力较大,在较低的底物浓度下就能达到 V_{max} ;而 Xy-3 和 Xy-4 的 K_m 值高,说明它们对底物的亲和力较小,需要在较高的底物浓度下才能达到 V_{max} 。

表 3 不同浓度金属离子对 Xy-1 木聚糖酶活的影响

Table 3 Effects of various metallic ions on activities of various xylanase components								
Ions	Relative activity / %							
	Xy-1		Xy-2		Xy-3		Xy-4	
	1 mmol/L	10 mmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L
CaCl ₂	93	93	103	97	154	173	168	118
MnSO ₄	86	72	88	91	99	119	109	122
MgCl ₂	96	105	97	98	118	179	98	106
ZnSO ₄	97	92	99	95	88	39	105	127
AgNO ₃	70	15	71	21	75	3	98	33
BaCl ₂	94	96	103	67	118	146	105	99
CuSO ₄	99	6	92	18	66	0	103	70
FeSO ₄	89	123	82	107	97	87	100	103

由表中可以看出,各种金属离子对 4 种木聚糖酶组分的影响是不相同的。如 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对 Xy3 和 Xy-4 的酶活有一定的促进作用;而对 Xy-1 和 Xy-2 没有明显的作用。 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 与 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 分别对 Xy-1、Xy-3 和 Xy-4 有一定的促进作用,而对其它的几种酶几乎没有作用。但对于 Cu^{2+} 、 Ag^+ 来说,两者对各组分都有明显的抑制作用,在浓度增大的情况下甚至会强烈抑制酶活性,可使酶活完全丧失。

从表中数据所显示的 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对酶活性抑制的情况看,Xy-4 木聚糖酶组分对重金属有较大的抗性,在其它几个组分酶活几乎丧失的情况下,仍然保持了较高的酶活。

在自然界中,所谓的木聚糖降解酶实际上是一个降解酶系,往往含有多酶组分,共同参与木聚糖半纤维素的降解^[21,22]。这些同工酶通常是由多个基

表 2 各内切酶组分的动力学参数

Table 2 The kinetic parameters of various xylanase components				
	Xy-1	Xy-2	Xy-3	Xy-4
K_m (g/100mL)	0.36	0.26	2.46	13.9
V_{max} (μ mol/min/mg)	4.01	8.81	81.97	4.71
K_{cat} (s^{-1})	6.15	4.75	41.16	1.52

与其它 3 种酶相比,Xy-3 的最大反应速度很高,说明它的催化效率高。从 K_m 和 V_{max} 的比较来看,对底物的亲和力大小与酶的催化效率之间没有相关性。例如 Xy-3 与 Xy-4 相比,酶对底物的亲和力差不多,而 Xy-3 的催化效率远远大于 Xy-4 的催化效率。

2.3.7 金属阳离子对酶活的影响

将适当稀释的酶液分别与不同终浓度的 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 、 $MgCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $AgNO_3$ 、 $BaCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4$ 溶液混合,于室温保温 30min 后,再按常规方法测定酶的剩余活力(表 3)。

因产生的,也有可能是由同一种基因产生的,通过不同的 mRNA 加工、翻译后修饰等,都可以造成同一菌株可产生多种木聚糖酶。在本实验中,通过以上分离纯化步骤,从棘孢曲霉的培养物粗酶液中分离到 4 个组分的木聚糖酶。说明棘孢曲霉所产木聚糖酶是多组分的,但这些木聚糖酶的多组份是原级同工酶还是次级同工酶,还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Timell T E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci Technol*, 1967, 1 :45 – 70.
[2] Aspinall G O. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv Carbohydr Chem*, 1959, 14 :429 – 468.
[3] Timell T E. Wood hemicelluloses :Part II, *Carbohydr Chem*, 1965, 20 :409 – 483.

- [4] Wong K K Y, Saddler J N. Trichoderma xylanases : Their properties and application. In : Visser J, *et al.* ed. Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, 1992, 171 – 186.
- [5] Jager A, Sinner M, Purkarthofer H, *et al.* Biobleaching with xylanase from a thermophilic fungus. In : Kuwahara M, Shimada M, eds. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Tokyo : UNI, 1992, 115 – 121.
- [6] Godfrey T, West S. Industrial enzymology. Houndmills : MacMillan Publishers Ltd, 1996.
- [7] Jager A, Sinner M, Purkarthofer H, *et al.* Biobleaching with xylanase from a thermophilic fungus. In : Kuwahara M, Shimada M. ed. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Tokyo : UNI, 1992, 115 – 121.
- [8] Patel R N, Grabski A C, Jeffries T W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **39** : 405 – 412.
- [9] Davis S, Gysin B, Casimir J, *et al.* Thermostable xylanases from actinomycetes for pulp bleaching. In : Visser J, *et al.* ed. Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, 1992, 551 – 554.
- [10] Senior D J, Meyers P R, Miller D, *et al.* Selective solubilization of xylan in pulp using a purified xylanase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett*, 1988, **10** : 907 – 912.
- [11] Silva R D, Yim D K, Park Y K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77** : 109 – 111.
- [12] Jackson L, Joyce T, Heitmann J, *et al.* Enzyme activity recovery from secondary fiber with cellulase and xylanase. *J Biotechnol*, 1996, **45** : 33 – 44.
- [13] Marques S, Pala H, Mota M, *et al.* Screening new enzymes for enzymatic deinking. In : Päivi Vahala, *et al.* ed. Proceedings of the 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Finlandia Hall, Helsinki, Finland, 2001, 277 – 279.
- [14] Mørkbak A L, Zimmermann W. Deinking of mixed office paper, old newspaper and vegetable oil-based ink printed paper using cellulases, xylanases and lipases. *Progress in Paper Recycling*, 1998, **7** : 14 – 21.
- [15] Zeyer C, Joyce T W, Heitman J A, *et al.* Performance study of enzymatic deinking using cellulase/hemicellulase blends, In : Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry : Advances in Applied and Fundamental Research, 1995, 169 – 172.
- [16] 邵志勇, 傅英娟, 秦梦华. 废新闻纸酶法脱墨的工业生产试验. *中华纸业*, 2001, **22**(4) : 20 – 22.
- [17] 陈冠军, 杜娟, 庄蕾, 等. 棘孢曲霉 SM-L22 纤维素酶系中内切酶的纯化及性质. *微生物学报*, 2001, **41**(4) : 469 – 474.
- [18] Manual Instruction for Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Company.
- [19] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 1992, **23** : 257 – 270.
- [20] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京 : 高等教育出版社, 1981, 164 – 166.
- [21] Biely P, Mislavičová D, Toman R. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Aнал Biochem*, 1985, **144** : 142 – 146.
- [22] Coughlan M P, Hazlewood G P. β -1,4-D – xylan-degrading enzyme systems : biochemistry, molecular biology and applications. *Biotech Appl Biochem*, 1993, **17** : 259 – 289.

Purification and Properties of Xylanases from *Aspergillus aculeatus* SM – L221

CHEN Guan-Jun* WANG Na CHI Fei LIU Wen

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract : Four components of xylanases were separated and purified by using exclusion chromatography and ion-exchange chromatography and other purification methods from the *Aspergillus aculeatus* SM-L22. The molecular weights of each components were characterized by SDS-PAGE, and were 92.13 kD, 32.4 kD, 42.4 kD, 27.03 kD, respectively. The optimal pHs for the four xylanases were 5.0, 4.0, 4.6 and 3 ~ 3.5 respectively, and all four were stable in acidic or neutral condition. The optimum temperatures for Xy-1 and Xy-2 were the same to be 75°C, and they showed good stability at 50°C. Xy-3 and Xy-4 had lower optimum temperatures being 55°C, and they were stable only below 40°C. The K_m values of Xy-1, Xy-2, Xy-3 and Xy-4 were 0.36%, 0.26%, 2.46% and 13.9% respectively, when the xylan from beachwood was as substrate, and the V_{max} values of these activities were 4.01 μ mol/min/mg, 8.81 μ mol/min/mg, 81.97 μ mol/min/mg, 4.71 μ mol/min/mg, respectively. The activity of each component can be strongly inhibited by Cu^{2+} and Ag^+ . The activities of Xy-3 can be increased dramatically by Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} . The activity of Xy-4 can also be increased by Ca^{2+} .

Key words : *Aspergillus aculeatus*, Xylanase, Isolation and Purification, Characters