

海枣曲霉木聚糖酶的提纯和性质

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过硫酸铵分段、异丙醇分段、Sephadex G-100 凝胶过滤、及 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析等提纯步骤, 从海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) 的麦麸培养物抽提液中分离到 4 个成份的木聚糖酶, 分别称之为 X-I、X-II、X-III 和 X-IV。经 7% 凝胶浓度的圆盘电泳及薄层等电聚焦分析, X-I、X-II 和 X-III 皆为均一成分, X-IV 中则仍杂有少量 X-III。X-I 的最适 pH 为 4.0, 最适温度 45℃, 在 pH 5.0—9.0 之间稳定, 保温 30 分钟时的半失活温度 $t_{1/2}$ 为 90℃。X-II 和 X-III 的最适 pH 分别为 4.5 及 5.0, 最适温度均为 50℃, 稳定 pH 范围分别为 6.0—10.0 及 7.0—10.0, $t_{1/2}$ 分别为 60 及 55℃。SDS-凝胶电泳法测得 X-I、X-II 和 X-III 的分子量分别为 26,500、35,500 及 22,000。薄层凝胶等电聚焦法测得三者的等电点分别为 4.7、4.4 和 4.0。在所测定的化学试剂中, Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 Mn^{2+} 对这三个酶均有较强烈的抑制作用。SDS 对 X-I 活力影响较小, 对 X-II 和 X-III 则有强烈的抑制作用。脲对 X-I 的抑制作用大, 对 X-II 和 X-III 的抑制作用小。

关键词 海枣曲霉; 木聚糖酶; 提纯与性质

木聚糖为一种在植物体内大量存在的半纤维素, 其分子结构为 β -1, 4-木糖苷键连接的木糖聚合物, 并在其木糖基的 O-2 或 O-3 位连有 α -L-阿拉伯糖, 或 4-O-甲基葡萄糖醛酸等分枝, 或连接由木糖、葡萄糖、半乳糖及阿拉伯糖等聚合成的较长的侧链^[1,2]。

木聚糖酶 (1, 4- β -D-xylan xylanohydrolase, E C. 3.2.1.8) 为一类以内切方式水解木聚糖分子中 β -1, 4-木糖苷键的酶, 其水解产物主要为木二糖与木二糖以上的寡聚木糖, 也有少量木糖和阿拉伯糖。该酶广泛存在于各种微生物中, 对于降解自然界大量存在的半纤维素起着重要作用^[3,4]。现在, 已有报道从黑曲霉 (*Asp. niger*)^[5], 乳白耙菌 (*Irpex lacteus*)^[6] 等真菌及短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)^[7] 和环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)^[8] 等细菌中提纯了木聚糖酶, 并研究了其性质。但目前对木

聚糖酶的研究大多不够深入, 且至今未见报道从海枣曲霉中提纯木聚糖酶。为了深入了解微生物来源的木聚糖酶的性质、作用机制及可能的应用价值, 我们从海枣曲霉中提纯到三个凝胶电泳均一的木聚糖酶, 并对其性质进行了较为深入的研究。本文报道这些酶的提纯及基本性质。

材料和方法

(一) 菌种

海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) AS 3.3143 为我所原纤维素酶组从海南岛分离到, 菌种保藏室提供, 并经一室齐祖同先生鉴定。

(二) 主要化学试剂

Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50, 低分子量标准蛋白 (LMW Kit Proteins) 及 Pharmalyte (pH 3—10) 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。稻草木聚糖为我所方一澄同志制备。其他试

本文于 1986 年 6 月 14 日收到。

剂均为分析纯或化学纯。

(三) 测定方法

1. 木聚糖酶活力的测定: 取酶液 0.5 ml, 40℃ 预热 3 分钟后, 加入已预热的稻草木聚糖 (用 pH 4.5、0.05 mol/L 乙酸缓冲液配制) 0.5 ml, 40℃ 反应 30 分钟后, 用 Somogyi-Nelson 法^[9]测定产生的还原糖。以木糖为标准, 在本实验条件下, 每分钟形成 1 μmol 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

2. 蛋白质测定: 柱层析时测定各管的吸光度 A_{280nm} , 一般分析采用 Lowry 法^[10]。

3. 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳 (PAGE): 按 Davis 法^[11], 凝胶浓度 7%, 缓冲液 pH 8.3。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 按 Weber-Osborn 法^[12], 凝胶浓度 10%, 电极缓冲液为 pH 7.2, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液。

5. 等电聚焦: 按 Vesterberg 薄层凝胶等电聚焦法^[13]。凝胶薄层大小为 100×200×1 mm, 凝胶浓度 7%, 内含 2% 两性电解质 Pharmalyte (pH 3—10)。聚焦在 10℃ 左右进行, 将电源的电压、电流和功率最高值分别限定为 1500 V、25 mA 和 15 W。聚焦 2 小时后, 从凝胶两边截下 1 cm 宽胶条, 切成 0.5 cm 小段, 用 3 ml 抽气的蒸馏水浸泡 10 小时, 测其 pH, 并绘 pH-距离图, 剩下的凝胶固定, 染色。

结果和讨论

(一) 酶的提纯

1. 粗酶的制备: 300 g 麦麸, 加 450 ml 自来水, 装入 5 升三角瓶内, 灭菌后接入培养好的种曲。28℃ 培养 3 天后, 加入蒸馏水 750 ml, 15℃ 浸泡 4 小时, 过滤, 滤液即为粗酶液。

2. 硫酸铵分段: 在粗酶液中慢慢加入固体硫酸铵到 35% 饱和度, 离心后取上清液, 加硫酸铵到 75% 饱和度, 离心取沉淀。

3. 异丙醇分段: 将硫酸铵分段的样品溶于蒸馏水, 经 Sephadex G-25 脱盐后, 加入 1/2 体积的异丙醇 (预冷到 -15℃), 离心后取上清液, 再加入该上清液 2 倍体积的异丙醇, 4℃ 静置 4 小时后, 离心取沉

淀。

4. Sephadex G-100 柱层析: 将异丙醇分段的样品溶于 30 ml pH 5.2、0.02 mol/L 的乙酸缓冲液中, 上样于同一缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱 (3.0 × 120 cm), 用同一缓冲液洗脱。待流出 150 ml 后, 再分部收集。30 分钟 1 管, 每管 9 ml。测定各管的 A_{280nm} 及水解稻草木聚糖的活力, 结果如图 1。将活力峰部分 (39—54 管) 合并。

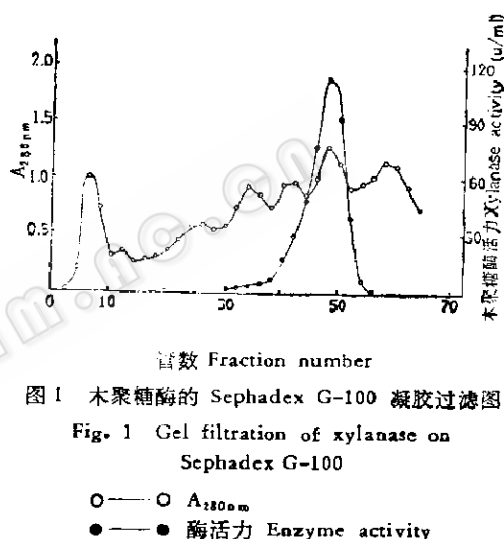


图 1 木聚糖酶的 Sephadex G-100 凝胶过滤图
Fig. 1 Gel filtration of xylanase on Sephadex G-100

○ — ○ A_{280nm}
● — ● 酶活力 Enzyme activity

5. DEAE-Sephadex A-50 柱层析: 将上一步提纯的样品加到已用 pH 5.2、0.02 mol/L 乙酸缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-50 柱上 (2.8 × 30 cm), 以同一缓冲液充分洗柱, 然后以含 0.025 mol/L NaCl 的 200 ml 同一缓冲液冲洗柱上的杂蛋白。再以 0.025—0.3 mol/L NaCl (各 600 ml) 线性梯度洗脱, 并分部收集, 45 分钟 1 管, 每管 10 ml, 测定各管的 A_{280nm} 及木聚糖酶活力 (图 2)。结果, 依次洗脱出 4 个具有木聚糖酶活力的峰。根据洗脱下来的次序, 将其分别称之为 X-I、X-II、X-III 和 X-IV。

上述木聚糖酶的整个提纯过程如表 1。

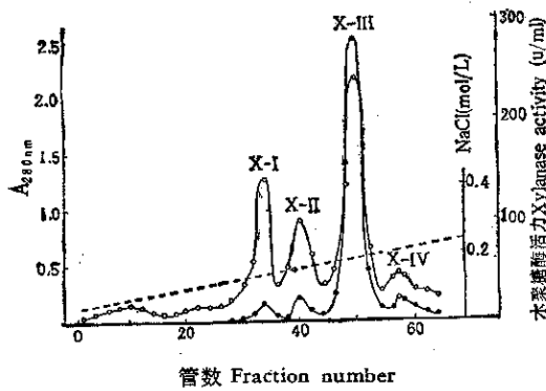


图2 木聚糖酶的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图

Fig. 2 Chromatography of xylanases on DEAE-Sephadex A-50

○ — ○ A_{280nm}
● — ● 酶活力 Enzyme activity
- - - NaCl 浓度 Concentration of NaCl

X-I 的提纯倍数小于 1，X-II 的提纯倍数也不大。这是因为 X-I、X-II 对稻草木聚糖的比活很低，而 X-III 的比活很高。粗酶液中的木聚糖酶实际上为 X-I、X-II 和 X-III 等的混合物，且 X-III 最多，故测到的比活较高。而在提纯后，X-I 的比活还低于粗酶液，故提纯倍数小于 1。同样，X-II 的提纯倍数也较低。

(二) 酶的纯度

将 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分

离到的四个木聚糖酶组分用 7% 凝胶浓度的 PAGE 分析,表明 X-I、X-II 和 X-III 均为均一成份, X-IV 则杂有少量 X-III (图 3)。

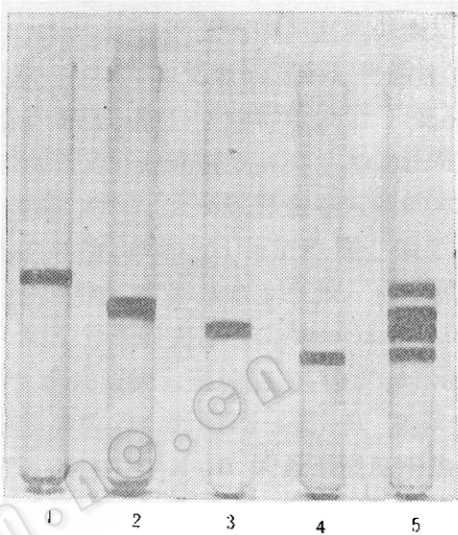


图3 提纯的木聚糖酶的盘状凝胶电泳图

Fig. 3 PAGE of purified xylanases

1. X-I; 2. X-II; 3. X-III; 4. X-IV;
5. X-I, X-II, X-III, X-IV

将以上 4 个组份用薄层凝胶等电聚焦法分析纯度,结果仍表明 X-I、X-II 和

表 1 海枣曲霉木聚糖酶的提纯

Table 1 Purification of xylanases from *Asp. phoenicis*

提纯步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	提纯倍数 Purification factor	收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude enzyme	4,729.6	45,650	9.2	1	100
硫酸铵分段 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	832.5	33,220	39.9	4.3	72.8
异丙醇分段 Isopropanol fractionation	397.0	20,350	51.3	5.6	44.6
Sephadex G-100	151.2	12,870	85.1	9.2	28.2
DEAE-Sephadex A-50					
X-I	8.3	73.8	8.9	0.96	0.2
X-II	6.5	338.1	52.0	5.6	0.7
X-III	29.3	9,240	315.4	34.3	20.2

X-III 为均一成分, X-IV 则有少量 X-IV 混杂(图 4)。

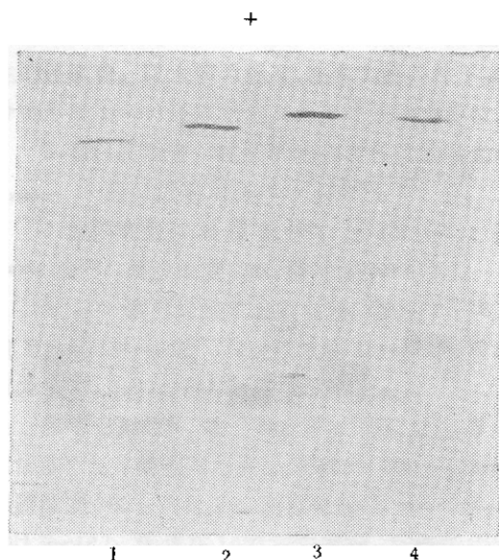


图 4 提纯的木聚糖酶的薄层凝胶电泳聚焦图

Fig. 4 PAGIF of purified xylanases

1. X-I; 2. X-II; 3. X-III; 4. X-IV

(三) 酶的性质

1. 酶的最适 pH: 在不同 pH 的 0.1 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中分别测定 X-I、X-II 和 X-III 水解稻草木聚糖的活力。X-I、X-II 和 X-III 的最适 pH 分别为 4.0、4.5 和 5.0 (图 5)。

2. 酶的最适温度: 分别在不同温度下测定上述木聚糖酶的活力。X-I 在 35—55℃ 的温度范围均显示较高的活力, 而在 45℃ 时活力最高, X-II 和 X-III 则在 50℃ 时显示最高活力 (图 6)。

3. 酶在不同 pH 的稳定性: 酶液在 0.05 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 3.0—8.0) 或 0.1 mol/L 甘氨酸- NaOH 缓冲液 (pH 8.5—11.0) 中, 于 30℃ 保温 24 小时, 加 pH 4.5、0.5 mol/L 乙酸缓冲液调回 pH, 按常法测活力。X-I 的稳定 pH 范围

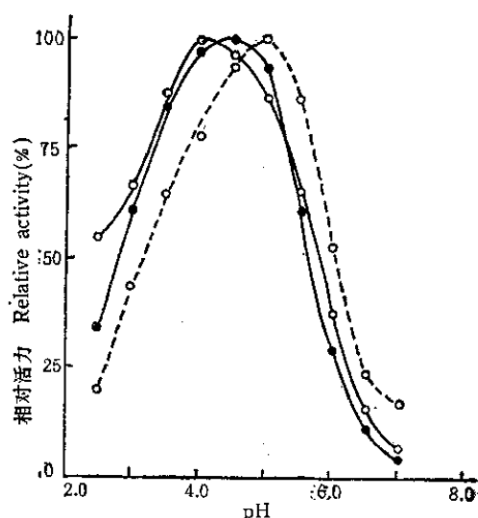


图 5 pH 对木聚糖酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on xylanases activity

○—○ X-I
●—● X-II
○---○ X-III

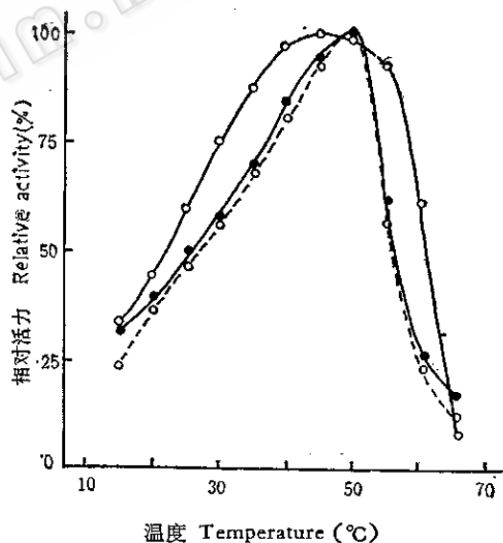


图 6 温度对木聚糖酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on xylanases activity

○—○ X-I
●—● X-II
○---○ X-III

为 5.0—9.0, X-II 为 6.0—10.0, X-III 为 7.0—10.0 (图 7)。

4. 酶的热稳定性: 将酶液分别于 30—95℃ 保温 30 分钟后, 立即冰浴, 然后按常

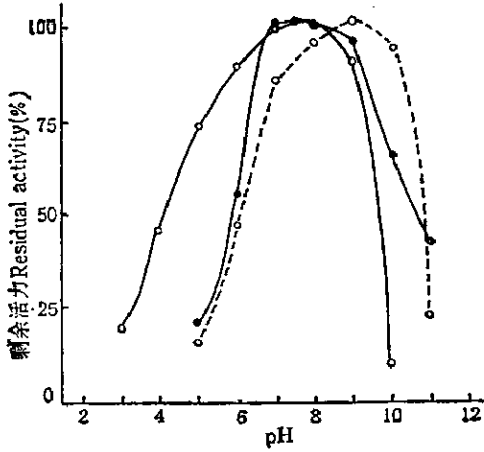
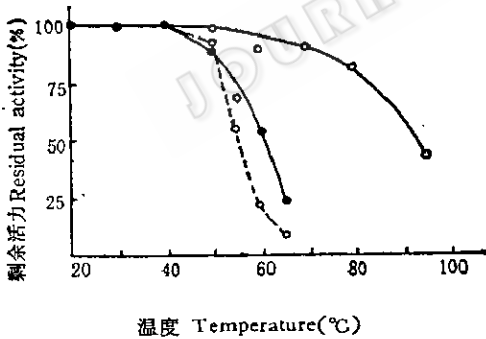


图7 木聚糖酶在不同 pH 的稳定性

Fig. 7 Stability of xylanases on different pH

- — ○ X-I
● — ● X-II
○ - - - ○ X-III

法测剩余活力。将剩余活力对温度作图,并以剩余活力为 50% 时的温度作为半失活温度 ($t_{1/2}$), 则 X-I、X-II 和 X-III 的 $t_{1/2}$ 分别为 90、60 和 55℃(图 8)。



温度 Temperature(°C)

图8 木聚糖酶的热稳定性

Fig. 8 Heat stability of xylanases

- — ○ X-I
● — ● X-II
○ - - - ○ X-III

从以上结果可以看到, X-I、X-II 和 X-III 的最适 pH 均在 4.0—5.0 左右,其稳定 pH 却在 6—10。这说明酶的最适 pH 和稳定 pH 之间虽有一定关系,但二者却又确实体现了酶两种不同性质。X-I 的最

适温度与 X-II 和 X-III 相差不大,而热稳定温度却比 X-II 和 X-III 高得多。这似乎表明,酶的最适温度虽然直接与其热稳定性有关,但却不一定与耐热温度完全一致,可能还受其他一些因素的影响。X-I 在 70℃ 以上的高温下并未失活,却不显示活力。而在耐热性试验中,高温保温后再降到较低温度,酶又重新显示催化活性。这大概是高温下酶分子的构象发生了变化,在常温下又可逆地恢复到有活力的正常构象。据报道^[3,4],大多数微生物来源的木聚糖酶的最适 pH 和 pH 稳定范围、最适温度与热稳定温度都基本上一致。只有黑曲霉^[5]和奇异长喙壳菌(*Ceratocystis paradoxa*)^[14]等来源的木聚糖酶,其稳定 pH 范围高于其最适 pH,而与 X-I、X-II 和 X-III 相似。X-II 和 X-III 的最适温度与热稳定性的关系也与乳白耙菌^[6]、硬毛栓菌(*Trametes hirsuta*)^[15]等来源的木聚糖酶相似。而像 X-I 那样,热失活温度远高于其最适温度,在微生物来源的木聚糖酶中并不多见。

5. 酶的抑制剂: 将酶液与终浓度为 1 mmol/L 的各种化学试剂于 30℃ 保温 30 分钟,再按常法测活力。测定结果如表 2。Ag⁺、Hg²⁺ 对 X-I、X-II 和 X-III 均有较强烈的抑制作用,这与大多数微生物来源的木聚糖酶一致^[3,6]。Mn²⁺ 对这三个酶也有较强烈的抑制作用,而 Ba²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 及 EDTA 对这三个酶的活力都没有明显影响,这表明金属离子不为这几个酶的活力所必需。10 mmol/L SDS 对 X-I 的活力影响不很显著,对 X-II 则有强烈的抑制作用,但 1 mmol/L SDS 对 X-II 的活力影响不大。然而,即使 SDS 浓度低到 0.1 mmol/L, 仍可使 X-III 的活力完全丧失。与此相反,4 mol/L 或 1 mol/L 脲均对 X-I 有较强烈的抑制

表 2 各种化学试剂对木聚糖酶活力的影响

Table 2 Effect of various chemicals on the activity of xylanases

试剂 Reagent	浓度 Concn. (mmol/L)	相对活力Relative activity(%)		
		X-I	X-II	X-III
Control	—	100	100	100
AgNO ₃	1	59.1	29.4	49.8
HgCl ₂	1	42.6	40.7	29.7
MnCl ₂	1	65.6	29.6	25.5
AlCl ₃	1	97.4	104.8	90.5
BaCl ₂	1	107.8	103.1	89.7
CaCl ₂	1	108.0	117.0	81.2
CuSO ₄	1	93.9	81.5	86.0
MgCl ₂	1	99.0	113.4	83.5
PbAc ₂	1	103.5	84.8	86.5
ZnSO ₄	1	87.8	87.0	105.5
EDTA	1	94.6	96.9	85.9
SDS	10	69.6	6.8	0
	1	96.1	77.8	0
	0.1	—	—	0
	0.025	—	—	68.6
脲Urea	4×10 ³	8.2	25.3	22.7
	1×10 ³	49.8	60.9	60.2

作用，而对 X-II 和 X-III 的抑制作用则要弱些。SDS 和脲均为常用的变性剂，然而，这二种试剂对同来源的 X-I、X-II 和 X-III 的活力影响大不相同，其原因很值得进一步研究。

6. 酶的分子量：用 Weber-Osborn SDS-PAGE 法测定。电泳后，根据标准样品的 R_m 值及分子量绘出标准曲线，据此由待测样品的 R_m 值求出其分子量。X-I、X-II 和 X-III 的分子量分别为 26,500、35,000 和 22,000 (图 9)。这几个酶的分子量都不大，而绝大多数微生物来源的木聚糖酶的分子量也都在这个范围^[3-8]。看来，分子量较小是微生物来源的木聚糖酶的一个特点。

7. 酶的等电点：由聚焦后酶蛋白在凝胶上的位置，从 pH-距离图上查得 X-I、X-II、X-III 和 X-IV 的等电点分别为 4.7、4.4、4.0 和 4.1 (图 10)。

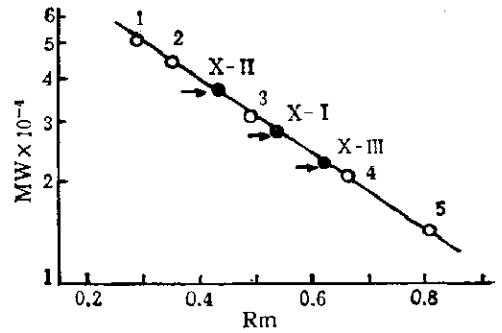


图 9 SDS-凝胶电泳法测定木聚糖酶的分子量

Fig. 9 Determination of molecular weights of xylanases by SDS-PAGE

1. γ -球蛋白重链 γ -Globulin, H-chain (50,000)
2. 卵清蛋白 Ovalbumin (43,000)
3. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30,000)
4. 大豆胰蛋白酶抑制剂 Soybean trypsin inhibitor (20,100)
5. α -乳清蛋白 α -Lactalbumin (14,400)

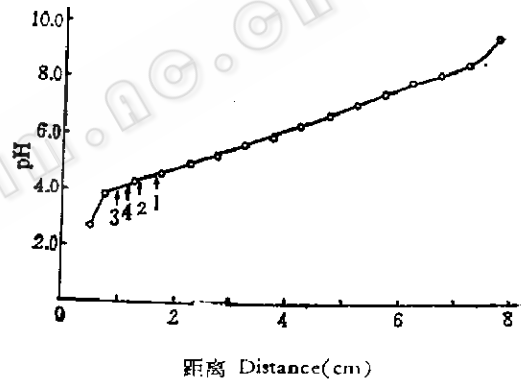


图 10 薄层凝胶电泳法测定木聚糖酶的等电点

Fig. 10 Determination of isoelectric point of xylanases by PAGE

1. X-I; 2. X-II; 3. X-III; 4. X-IV

X-I、X-II 和 X-III 在 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱上的洗脱次序及在盘状电泳时的 R_m 次序与这几个酶的等电点大小基本一致，而与其分子量的关系较小。但是，多次等电聚焦的结果均表明，X-IV 的等电点略高于 X-III，这与该酶在 DEAE-Sephadex A-50 层析时被洗脱下来的次序及在盘状电泳时的 R_m 次序相矛盾。这可能是 X-IV 的分子量远小于 X-III，或酶的分子形状不同，或含糖量较少，或其他某种未知原因所致。

8. 酶的紫外光谱: 样品溶在 pH 5.0、0.02 mol/L 乙酸缓冲液中, 用 Hitachi 557 双光束双波长分光光度计测定。X-I、X-II 和 X-III 分别在 276、277 和 277 nm 处显示最大吸收峰, 而在 248、250 和 252 nm 处显示低谷, 均为典型的蛋白质吸收峰。由其 280nm 处的吸收度, 可计算得 X-I、X-II 和 X-III 的 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 分别为 13.8、21.4 和 28.1。

参 考 文 献

- [1] Aspinall, G. O.: The Biochemistry of Plants (Ed. by Preiss, J.), Academic Press, New York, p. 473—500, 1980.
- [2] Wilkie, K. C. B. and S. L. Woo: *Carbohydr. Res.*, 57: 145—162, 1977.
- [3] Dekker, R. F. H. and G. N. Richards: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32: 277—352, 1976.
- [4] Woodward, J.: *Topics in Enzyme and Fermentation Technology*, 8: 9—30, 1984.
- [5] 福本寿一郎等: 日本农芸化学会志, 44: 447—456, 1970.
- [6] Hoebler, C. and J-M Brillouet: *Carbohydr. Res.*, 128: 141—155, 1984.
- [7] Panbangred, W. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 47: 957—963, 1983.
- [8] Esteban, R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 28: 733—739, 1982.
- [9] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195: 19—23, 1952.
- [10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [11] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427, 1964.
- [12] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406—4412, 1969.
- [13] Vesterberg, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, 257: 11—19, 1972.
- [14] Dekker, R. F. H. and G. N. Richards: *Carbohydr. Res.*, 39: 97—115, 1975; 42: 107—123, 1975.
- [15] Kubachova, M. et al.: *Folia Microbiol.*, 21: 28—35, 1976.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF XYLANASES FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zeng Yucheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Four xylanases, X-I, X-II, X-III and X-IV, in the culture medium of *Aspergillus phoenicis* were isolated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and isopropanol fractionation, gel filtration on Sephadex G-100, and ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50. X-I, X-II, and X-III were homogeneous on disc gel electrophoresis and polyacrylamide gel isoelectric focusing. X-I, X-II and X-III showed optimal activity at pH 4.0, 4.5, 5.0 and 45, 50, 50°C, respectively. X-I, X-II and X-III were stable in the pH range 5.0—9.0, 6.0—10.0 and 7.0—10.0. The temperature for loss half activity ($t_{1/2}$) in 30 min were: X-I, 90°C; X-II, 60°C; X-III, 55°C. The molecular weights of X-I, X-II and X-III were 26,500, 35,500 and

22,000 as estimated by SDS gel electrophoresis and their isoelectric points were 4.7, 4.4 and 4.0 as estimated by polyacrylamide gel isoelectric focusing. Ag^+ , Hg^{2+} and Mn^{2+} ions showed potent inhibitory effect on X-I, X-II and X-III. SDS showed little effect on X-I, but strong inhibitory effect on X-II and X-III. Urea was a potent inhibitor of X-I, and a weaker inhibitor of X-II and X-III. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ of X-I, X-II and X-III determined at 280 nm were 13.8, 21.4 and 28.1.

Key words

Aspergillus phoenicis; Purification and properties; Xylanase