

# 海枣曲霉地衣多糖酶和木聚糖酶的底物特异性

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

海枣曲霉木聚糖酶 X-I、X-II 和 X-III 作用于不同底物时, X-I 对地衣多糖的水解活性最强, 对麦麸半纤维素 H 和 B 也有一定的水解活性, 因而该酶为具有木聚糖酶活性的地衣多糖酶 (Lichenase, 1,3-1, 4- $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1. 73)。X-II 对燕麦木聚糖, 麦麸半纤维素 B 和 H 均有很高的水解活性, 对其他木聚糖及地衣多糖的水解活性也较高, 因而为具有地衣多糖酶活性的木聚糖酶。X-III 对落叶松木聚糖的水解活性最高, 对其他木聚糖也有较高的水解活性, 但不能水解地衣多糖等  $\beta$ -葡聚糖, 故为一种专一的木聚糖酶。X-I 水解麦麸半纤维素 B、X-II 水解燕麦木聚糖及 X-III 水解落叶松木聚糖的  $K_m$  值分别为 9.9、2.1 和 1.8mg/ml。酶水解产物的纸层析分析结果表明, X-I 水解不同木聚糖后的产物主要为分子量较大的寡聚木糖, 未发现木二糖、木糖及阿拉伯糖。X-II 的水解产物主要为木二糖及木二糖以上的寡糖, 并有少量木糖和阿拉伯糖, 且阿拉伯糖远多于木糖。X-III 的水解产物中以木二糖为最多, 也有较多的木二糖以上的寡聚木糖, 木糖和阿拉伯糖的量较少, 且阿拉伯糖远少于木糖。

**关键词** 海枣曲霉; 地衣多糖酶; 木聚糖酶; 底物特异性

前文报道了海枣曲霉木聚糖酶的提纯及性质<sup>[1]</sup>, 本文进一步报道该酶的底物特异性、动力学参数及水解产物的类型等。

## 材料和方法

### (一) 酶的制备与提纯

按前文方法, 用海枣曲霉 AS. 3-3143 作为木聚糖酶 X-I、X-II 和 X-III 的产生菌, 制备粗酶, 并将其提纯到凝胶电泳均一<sup>[1]</sup>。

### (二) 主要化学试剂

落叶松木聚糖、燕麦木聚糖和各种对-硝基苯基- $\alpha$  或  $\beta$ -糖苷 (PNP- $\alpha$ -gal, PNP- $\beta$ -gal, PNP- $\alpha$ -glc, PNP- $\beta$ -glc, PNP- $\beta$ -man, PNP- $\beta$ -xyl), 均为 Sigma 公司产品。稻草木聚糖为我所方一澄同志制备。羧甲基纤维素钠 (CMC) 为中国长红塑料厂产品。 $\beta$ -1, 2-葡聚糖、昆布多糖 ( $\beta$ -1, 3-葡聚糖)、地衣多糖 ( $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖) 及石脐素 ( $\beta$ -1, 6-葡聚糖)、均为 Miles 公司何方先生所赠。

(三) 木聚糖酶活力及蛋白质浓度的测定均同前文<sup>[1]</sup>。

### (四) 纸层析

采用 Whatman 1<sup>®</sup> 滤纸, 展开剂为正丁醇: 吡啶: 水 (6:4:3), 上行法展开 2 次后, 以苯胺-二苯胺或苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。

## 结果和讨论

### (一) 底物的制备

1. 稻草半纤维素的制备: 基本上按福本寿一郎等的方法<sup>[2]</sup>。将稻草 300g 切成小段, 加水煮沸, 自来水漂洗过夜后, 再用次氯酸钠 (pH 6.0) 浸泡及自来水漂洗, 以除去木质素、淀粉和蛋白质等成份。然后, 挤去水份, 按 Adams 方法<sup>[3]</sup>, 加 2L 抽过气的 10% NaOH, 于 24 $^{\circ}$ C 浸泡 24 小时,

本文于 1986 年 6 月 14 日收到。

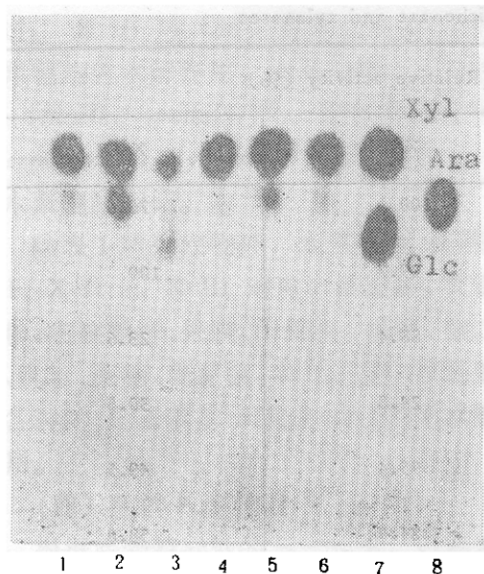


图1 各种半纤维素的酸水解产物的纸层析图谱

Fig. 1 Paper chromatogram of HCl hydrolysates of various hemicelluloses

- 1, 2, 3. 麦麸 HA, HB, HH Wheat bran HA, HB, HH  
4, 5. 稻草 HA, HB Rice straw HA, HB  
6. 稻草木聚糖 Rice straw xylan  
7, 8. 标准糖 Marker; D-Xylose (Xyl); D-Glucose (Glc); L-Arabinose (Ara)

过滤后, 滤渣再用 NaOH 重浸一次。合并两次碱抽提的滤液, 用 HCl 调 pH 到 4.5 左右, 离心取沉淀, 此即稻草半纤维素 A(HA), 于上清液中加等体积丙酮, 离心取沉淀, 即为稻草半纤维素 B(HB)。

2. 麦麸半纤维素的制备: 麦麸 200g, 先以苯-乙醇浸泡以除去脂溶性物质, 再按制备稻草半纤维素的方法进行预处理。然后挤干水份, 加蒸馏水 400ml, 煮沸 3 小时, 过滤取滤液, 向此滤液中加 2 倍体积乙醇, 离心, 并收集沉淀。为方便起见, 我们将此成份称之为麦麸半纤维素 H(HH)。过滤后的滤渣按制备稻草半纤维素的同样方法, 制备得麦麸半纤维素 A(HA) 及 B(HB)。

## (二) 底物半纤维素的糖组成分析

将按上述方法制备的 5 种半纤维素及原先的稻草木聚糖用 2% HCl 水解, 再用 NaOH 中和, 离子交换树脂脱盐后, 用纸层析法分析底物的组成, 结果如图 1。除麦麸 HH 外, 其他半纤维素均含有较多木糖, 少量阿拉伯糖, 不同来源的 HB 含阿拉伯糖量均高于 HA。麦麸 HB 和 HA 中的阿拉伯糖含量均相应地高于稻草 HB 和 HA。麦麸 HH 是按我们自己设计的方法制备的, 其特点是除了含有较多木糖和较少阿拉伯糖外, 还含有较多葡萄糖, 该成份的具体结构还有待进一步研究。

## (三) 酶的底物特异性

以各种木聚糖、 $\beta$ -葡聚糖及其他多糖为底物时, 按常法测定酶的水解活力。以纤维二糖和麦芽糖为底物时, 按标准条件反应, 并用葡萄糖氧化酶法测定产生的葡萄糖。以对-硝基苯基- $\alpha$  或  $\beta$ -糖苷作底物时, 则测定酶水解 1mmol/L 底物产生的对-硝基酚(测  $A_{400nm}$ ), 结果如表 1。X-I 对地衣多糖的水解活力最高, 对麦麸 HH 的水解活力次之, 对麦麸 HB 也有一定的水解活力, 对其他木聚糖的作用则很弱。因此, 该酶实际上是具有木聚糖酶活性的地衣多糖酶。X-II 对燕麦木聚糖、麦麸 HB 和 HH 均有很高的活力, 对稻草 HB、稻草木聚糖及地衣多糖的水解活力也较高, 对稻草 HA、麦麸 HA 及落叶松木聚糖的水解活力则要相对弱些。这表明, X-II 为具有地衣多糖酶活性的木聚糖酶。X-I 和 X-II 均对 CMC 有微弱的水解作用, 但都不能水解  $\beta$ -1,2-葡聚糖、昆布多糖和石脐素等, 因而二者虽有微弱的水解  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的活力, 却完全不能水解  $\beta$ -1,2-、 $\beta$ -1,3-、 $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键。X-III 对落叶松木聚糖的水解活力最高, 对其他木聚糖也有较强的水解作用, 但对麦麸来源的木聚糖, 特别是对麦麸 HH 的水解作

表 1 酶的底物特异性  
Table 1 Substrate specificities of lichenase and xylanases

底 物 Substrate	相对活力 Relative activity (%)		
	X-I	X-II	X-III
燕麦木聚糖 Oat spelts xylan	0.8	100	76.6
落叶松木聚糖 Larchwood xylan	1.9	29.7	100
麦麸 HH Wheat bran HH	32.9	88.4	23.6
麦麸 HA Wheat bran HA	4.2	24.8	30.5
麦麸 HB Wheat bran HB	12.8	95.4	49.3
稻草 HA Rice straw HA	1.4	24.9	58.8
稻草 HB Rice straw HB	6.5	76.1	72.6
稻草木聚糖 Rice straw xylan	3.3	58.9	74.6
羧甲基纤维素 CM-Cellulose Na	3.9	3.2	0
地衣多糖 Lichenin	100	57.6	0
昆布多糖 Larminarin	0	0	0
石脐素 Pustulan	0	0	0
$\beta$ -1, 2-葡聚糖 $\beta$ -1, 2-Glucan	0	0	0

用相对较弱。该酶对 CMC、地衣多糖及其他  $\beta$ -葡聚糖均无水解活力,因而为一种专一的木聚糖酶。

高等植物来源的木聚糖的骨架结构均为  $\beta$ -1, 4-木聚糖,但侧链不同。禾本科植物木聚糖的侧链主要为  $\alpha$ -1, 3-键连接的 L-阿拉伯糖,而裸子植物、硬木等来源的木聚糖的侧链则多为  $\alpha$ -1, 2-键连接的 4-O-甲基葡萄糖醛酸<sup>[4,5]</sup>。因此,本实验所用的落叶松木聚糖应为侧链主要为 4-O-甲基葡萄糖醛酸的  $\beta$ -1, 4-木聚糖,而其他木聚糖则为侧链为阿拉伯糖的  $\beta$ -1, 4-木聚

糖。从本实验的测定结果看,虽然 X-I、X-II 和 X-III 均显示  $\beta$ -1, 4-木聚糖酶活性,但 X-I 和 X-II 对阿拉伯糖侧链较多的木聚糖活力较高,X-III 则对 4-O-甲基葡萄糖醛酸侧链较多的木聚糖活力较高。

在已报道的木聚糖酶中,有不少都同时具有纤维素酶活性,如黑曲霉 (*Aspergillus niger*)<sup>[6]</sup>、奇异长喙壳菌 (*Certocystis paradoxa*)<sup>[7]</sup> 脱叶链霉菌 (*Streptomyces exfoliatus*)<sup>[8]</sup> 等来源的木聚糖酶。然而,X-I 和 X-II 对 CMC 的水解作用很微弱,却对地衣多糖和木聚糖均有很高的水

解活性。据笔者所知,这一性质还未见报道过。X-III 对 CMC 和地衣多糖等  $\beta$ -葡聚糖均无水解作用,因而与短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)<sup>[9]</sup>、盾状芽孢杆菌 (*Termitomyces clypeatus*)<sup>[10]</sup> 等来源的专一的木聚糖酶相似。

除表 1 所列底物外,本实验还表明,X-I、X-II 和 X-III 对可溶性淀粉、支链淀粉、右旋糖酐、果胶、田菁胶、菊糖、蜜二糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、水杨素及各种对-硝基苯基- $\alpha$  或  $\beta$ -糖苷均无水解作用。

#### (四) 酶的 $K_m$ 值及 $V_{max}$ 值

根据底物特异性的测定结果,以燕麦木聚糖作 X-II 的底物,落叶松木聚糖作 X-III 的底物,由于地衣多糖及麦麸 HH 的量太少,代之次麦麸 HB 作 X-I 的底物,于 50℃ 按常法测定上述酶水解相应底物(最终浓度为 0.1—10mg/ml) 的活力,并计算反应速度 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。将测定结果按 Woolf 法作图(图 2—4)。结果求得 X-I、X-II 和 X-III 水解各自底物的  $K_m$  值分别为 9.9、2.1 和 1.8mg/ml,  $V_{max}$  分别为 334、268 和 1030  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  蛋白。X-II 和 X-III 的  $K_m$  值与乳白耙

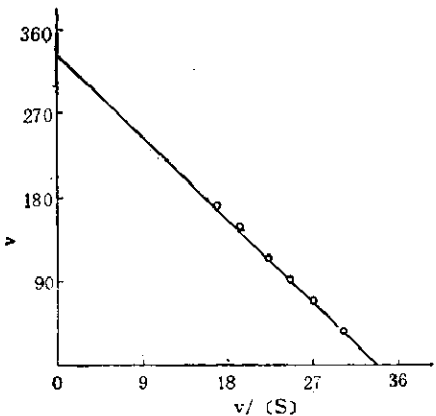


图 2 X-I 水解麦麸 HB 的 Woolf 图

Fig. 2 Woolf plot for the hydrolysis of wheat bran HB by X-I

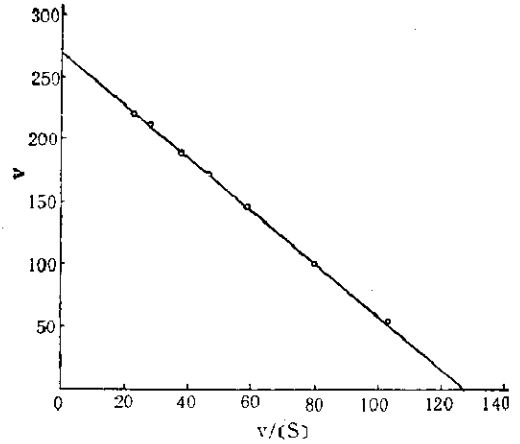


图 3 X-II 水解燕麦木聚糖的 Woolf 图

Fig. 3 Woolf plot for the hydrolysis of oat spelt xylan by X-II

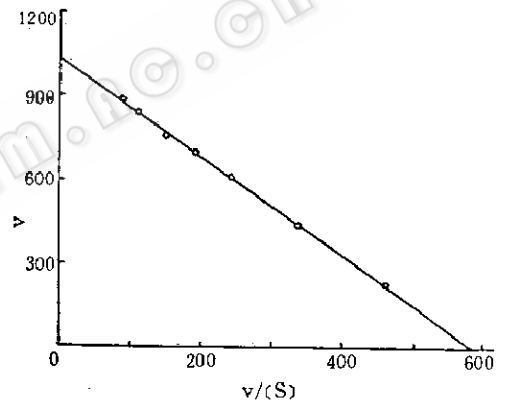


图 4 X-III 水解落叶松木聚糖的 Woolf 图

Fig. 4 Woolf plot for the hydrolysis of larchwood xylan by X-III

菌 (*Irpex lacteus*)<sup>[11]</sup>、芽孢杆菌 11-1S<sup>[12]</sup> 木聚糖酶的  $K_m$  值相似, X-I 的  $K_m$  则与环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)<sup>[13]</sup> 和裂褶菌 (*Schizophyllum commune*)<sup>[14]</sup> 木聚糖酶的  $K_m$  值较接近。

#### (五) 酶的水解产物

将麦麸 HA、HB、HH、稻草 HA、HB、或稻草木聚糖等配成 5% (W/V), 取 0.3ml, 加 pH5.0、0.1mol/L 乙酸缓冲液 0.1ml, 酶液 0.1ml (其中含蛋白量分别为: X-I、50 $\mu\text{g}$ , X-II 10 $\mu\text{g}$ , X-III 5 $\mu\text{g}$ ), 分

别于 40℃ 保温 24 小时后,加热中止反应,以纸层析法分析水解产物。结果表明, X-I 水解不同半纤维素底物时,产物主要为分子量较大的不同链长的寡聚糖,没有木糖、木二糖及阿拉伯糖。该酶水解麦麸 HB 和 HH、稻草 HB 及稻草木聚糖时,产物中还有微量葡萄糖及小分子量的寡糖。而水解麦麸 HA 和稻草 HA 时,则不易检测到这种葡萄糖及小分子寡糖。将 X-I 的水解产物进行纸层析后,以苯胺-二苯胺试剂显色,则该酶水解半纤维素所产生的大分子寡聚糖大都显示寡聚木糖所特有的棕黄色,只有少数聚合度不大的寡聚糖点显示寡聚葡萄糖的蓝灰色。在水解麦麸 HH 时,这种寡聚葡萄糖的蓝色点要比水解其



图 5 X-I 水解不同半纤维素产物的纸层析图  
Fig. 5 Paper chromatogram of X-I hydrolyzed various hemicelluloses

- 1, 2, 3. 麦麸 HA, HB, HH Wheat bran HA, HB, HH  
4, 5. 稻草 HA, HB Rice straw HA, HB  
6. 稻草木聚糖 Rice straw xylan  
7. 标准糖,自上至下为 D-木糖, D-葡萄糖和麦芽糖  
Marker: D-xylose, D-glucose and maltose, downward  
8. 标准糖,自上至下为 L-阿拉伯糖和纤维二糖  
Marker: L-arabinose and cellobiose, downward

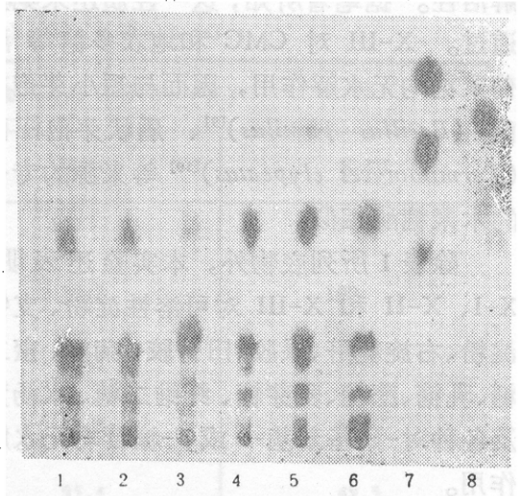


图 6 X-II 水解不同半纤维素产物的纸层析图  
Fig. 6 Paper chromatogram of X-II hydrolyzed various hemicelluloses  
1—8. 同图 5 Same as fig. 5

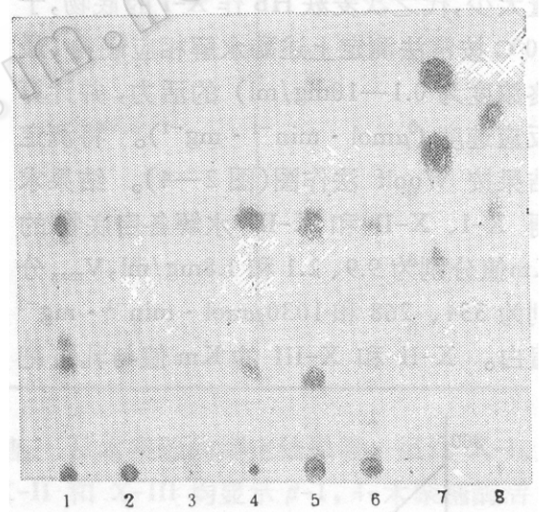
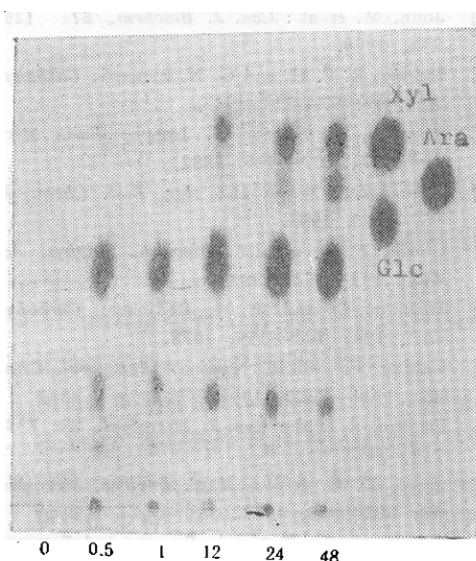


图 7 X-III 水解不同半纤维素产物的纸层析图  
Fig. 7 Paper chromatogram of X-III hydrolyzed various hemicelluloses  
1—8. 同图 5 Same as fig. 5

他底物时多一些。因此, X-I 水解各种半纤维素的产物中,以寡聚木糖为主(图 5)。

X-II 水解各种半纤维素的产物则主要为木二糖及木二糖以上的各种聚合度的寡聚木糖,并有少量阿拉伯糖及很微量的木糖。该酶水解不同底物时,产物类型差



保温时间 Incubation time (h)

图8 X-III 水解稻草 HB 的纸层析图

Fig. 8 Paper chromatogram of X-III hydrolyzed rice straw HB for various time

标准糖同图1 Marker, same as fig. 1

别不大(图6)。X-III 水解不同底物时,产物也主要为木二糖及木二糖以上的寡糖,且以木二糖的量为最多。与 X-II 明显不同的是, X-III 的产物中阿拉伯糖的量要远少于木糖。该酶水解不同底物时,产物类型也差别不大(图7)。然而,用苯胺-二苯胺显色证明, X-II、X-III 的水解产物中,除了寡聚木糖外,也有很少量聚合度不大的寡聚葡萄糖存在,特别是水解麦麸HH时,寡聚葡萄糖斑点更为明显。

为了解 X-III 在水解底物的不同时间过程中其产物的变化,取稻草 HB(0.5%, W/V) 0.3ml, 加 pH 5.0、0.1mol/L 乙酸缓冲液 0.1ml, X-III 0.1mg (含蛋白 5 $\mu$ g), 于 40 $^{\circ}$ C 水解 0—48 小时,用纸层析法分析水解产物,苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。结果表明,没有水解的底物本身只有一个停留在原点的成份,若水解 0.5 或 1 小时,产物主要为木二糖及木二糖以上的寡聚木糖,并有微量木糖,检测不到阿拉伯糖。随

着水解时间的延长,大分子寡聚木糖的量迅速减少,木二糖和木糖的量迅速增加,同时还产生少量阿拉伯糖(图8)。

根据以上结果,可以认为,虽然 X-I 对地衣多糖的水解活性最强,但该酶也能以内切方式水解木聚糖底物中的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键,因而也有一定的内切木聚糖酶活力。X-II、X-III 对木聚糖底物作用最强,且均以内切方式水解底物中的  $\beta$ -木糖苷键,故均应为内切型  $\beta$ -木聚糖酶。然而,从水解产物的类型来看,这三种酶的水解机制又不相同。X-I 的水解产物类型表明,该酶主要以随机方式水解底物分子内部的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键,不能水解分子末端的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键,也不能水解  $\alpha$ -1, 3-阿拉伯糖苷键,但有微弱的水解分子内部及末端  $\beta$ -葡萄糖苷键的能力。X-II 的水解产物类型表明该酶也主要以随机方式水解底物分子内部的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键,并有一定的从底物非还原端第二个木糖苷键水解底物的能力。该酶还能水解底物中  $\alpha$ -1, 3-阿拉伯糖苷键分枝,且这种水解分枝的活力远高于其水解底物分子末端  $\beta$ -1, 4-木糖苷键的活力。X-III 的产物类型虽然与 X-II 有些相似,但其产物中木二糖的比例显著高于木二糖以上的寡聚木糖,且在水解的前期即如此。产物中木糖也比阿拉伯糖出现早,数量也多得多。这说明该酶虽然也以内切方式水解底物内部的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键,但对非还原末端第二个  $\beta$ -木糖苷键有明显优先的水解作用。而且,该酶对底物分子末端的  $\beta$ -1, 4-木糖苷键也有一定的水解作用,对  $\alpha$ -1, 3-阿拉伯糖苷键分枝的水解活力则要低得多。据报道,现在已提纯的木聚糖酶中,大部份都没有水解  $\alpha$ -1, 3-阿拉伯糖苷键分枝的活力,因而产物中没有 L-阿拉伯糖<sup>[15]</sup>。只有奇异长喙壳菌<sup>[7]</sup>,嗜热真菌 *Talaromyces byssoch*

*lamydoides* YH-50<sup>[16]</sup> 等少数来源的木聚糖酶具有分解  $\alpha$ -1, 3-阿拉伯糖键分枝的能力, 因而产物中有 L-阿拉伯糖。显然, X-I 属于不能分解这一分枝的酶, X-II、X-III 则属于能分解的那一类酶。

### 参 考 文 献

- [1] 曾宇成、张树政: 微生物学报, 27(4): 343, 1987。
- [2] 福本寿一郎等: 日本农芸化学会誌, 44: 447—456, 1970。
- [3] Adams, G. A.: Methods in Carbohydrates (ed. by Whistler, R. L.), Academic Press, New York and London, 5: 144—145, 1965.
- [4] Aspinall, G. O.: The Biochemistry of Plants (ed. by Preiss, J.), Academic Press, New York, p. 473—500, 1980.
- [5] Wilkie, K. C. B. and S. L. Woo: Carbohydr. Res., 57: 145—172, 1977.
- [6] John, M. et al.: Can. J. Biochem., 57: 125—134, 1979.
- [7] Dekker, R. F. H. and G. N. Richard: Carbohydr. Res., 39: 97—114, 1975.
- [8] Sreenath, H. K. and R. Joseph: Folia Microbiol., 27: 107—115, 1982.
- [9] Panbangred, W. et al.: Agr. Biol. Chem., 47: 957—963, 1983.
- [10] Ghosh, A. K. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 612: 143—152, 1982.
- [11] Hoebler, C. and J. M. Brillouet: Carbohydr. Res., 128: 141—155, 1978.
- [12] Uchino, F. and T. Nakane: Agr. Biol. Chem., 45: 1121—1127, 1981.
- [13] Esteban, R. et al.: Can. J. Microbiol., 28: 733—739, 1982.
- [14] Paice, M. G. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 36: 802—808, 1978.
- [15] Woodward, J.: Topics in Enzyme and Fermentation Technology, 8: 9—30, 1984.
- [16] Yoshioka, H. et al.: Agr. Biol. Chem., 45: 2425—2432, 1981.

## SUBSTRATE SPECIFICITIES OF LICHENASE AND XYLANASES FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zeng Yucheng    Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The substrate specificities of X-I, X-II and X-III from *Aspergillus phoenicis* were investigated. X-I showed the highest activity toward lichenin, the relative activity of X-I toward lichenin, wheat bran hemicellulose H (HH) and B (HB) were 100, 32.9 and 12.8, respectively. Therefore X-I was a lichenase (EC. 3.2. 1.73) with xylanase activity. X-II showed higher activities toward oat spelt xylan, wheat bran HB and HH, and a somewhat lower activities toward lichenin and other xylans, so X-II was a xylanase with lichenase activity. X-III showed the highest activity toward larchwood xylan, high activities toward other xylans, but no activities toward lichenin, CMC and other  $\beta$ -glucans, so X-III was a spe-

cific xylanase. The Km of X-I for wheat bran HB, X-II for oat spelt xylan and X-III for larchwood xylan were 9.9, 2.1 and 1.8 mg/ml. The products of X-I from various xylans were mainly xylooligosaccharides, no xylobiose, xylose and arabinose; and that of X-II, X-III were mainly xylobiose, and xylooligosaccharides higher than xylobiose, with small amount of xylose and arabinose. X-II produced more arabinose than xylose, and vice versa for X-III.

### Key words

*Aspergillus phoenicis*; Lichenase; Xylanase; Substrate specificity