

海枣曲霉 β -木糖苷酶的提纯和性质

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) 麦麸培养物抽提液中, 通过聚乙二醇 6000-磷酸钾缓冲液双水相分离, 相继用 Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析、羟基磷灰石吸附层析、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、SE-Sephadex C-50 离子交换层析以及 Sephadex G-50 柱层析等提纯步骤, 提纯到凝胶电泳均一的 β -木糖苷酶。该酶的最适 pH 为 3.5, 最适温度为 65°C, 在 pH 3.5-6.5 之间稳定, 酶保温 30 分钟时的半失活温度 ($t_{1/2}$) 为 68°C。酶的分子量为 95 000, 等电点为 4.4。Hg²⁺ 和 Ag⁺ 对该酶有强烈的抑制作用。在所测定的底物中, β -木糖苷酶仅对 β -木糖苷 (pNP- β -Xy1) 有强水解作用, 其 K_m 值为 0.63 mmol/L, V_{max} 为 410 μ mol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹。D-木糖为 β -木糖苷酶的竞争性抑制剂, 其 K_i 值为 7.5 mmol/L。

关键词 海枣曲霉; β -木糖苷酶; 提纯和性质

β -木糖苷酶 (1,4- β -D-Xylan Xylohydrolase, EC 3.2.1.37) 是一种能水解 β -D-木糖苷及以外切方式从非还原端水解木二糖及木二糖以上的寡聚木糖的酶, 其水解产物为 D-木糖。1960 年 Howord 等即报道从瘤胃细菌中发现了这种酶^[1], 但直到 1970 年, 才报道了用亲和层析法将短小芽孢杆菌 β -木糖苷酶提纯到盘状凝胶电泳均一的样品^[2]。到目前为止, 已提纯的该酶的主要来源有黑曲霉^[3,4]、沃特曼青霉 (*Pen. wortmanni*)^[5]、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)^[6]、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)^[7] 及齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*)^[8] 等。上述来源的 β -木糖苷酶提纯比较困难, 最后一步往往需用制备凝胶电泳或等电聚焦法才能得到均一样品。

我们在海枣曲霉的粗提液中发现存在多种糖苷酶活性, 特别是有很高的木聚糖酶^[9]、 β -D-岩藻糖苷酶^[10]、 β -半乳糖苷酶^[11,12]、 β -葡萄糖苷酶^[13] 和 β -木糖苷酶活性。本文主要报道 β -木糖苷酶的提纯及性质的研究结果。

材料和方法

(一) 主要化学试剂

羟基磷灰石, 上海生化研究所产品。DEAE-Sephadex A-50、SE-Sephadex C-50、Sephadex G-100、Sephadex G-50 及两性电解质 (Pharmalyte pH 3-10) 均为 Pharmacia 公司产品。高分子量测定时 (用于梯度凝胶电泳) 所用分子量标准蛋白为 Pharmacia 公司产品, 低分子量标准蛋白 (LMW, 用于 SDS-凝胶电泳) 均为 Sigma 公司产品。各种对-硝基酚糖苷均为 Sigma 公司产品。纤维二糖, Fluka 产品。水杨素, B. D. H 产品。D-木

糖, E. Merk 产品。β-1,2-葡萄糖聚糖、昆布多糖(β-1,3-葡聚糖)、地衣多糖(β-1,3-1,4-葡聚糖)及石脐素为 Miles 公司何方先生赠。其余均为国产试剂。

(二) 主要仪器

等电聚焦, 采用 Pharmacia 公司电源及等电聚焦仪, 测定紫外光谱用 Hitachi 557 双光束双波长分光光度计。

(三) 分析方法

1. 酶活力测定: 反应体系为酶液 50μl, pH 6.0 的 0.1mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液 100μl, 50mmol/L 对硝基酚-β-木糖苷 (pNP-β-Xyl) 100μl, 40℃ 反应 15 分钟, 加 3ml 0.2 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 测定吸光度 A₄₀₀。在此条件下, 每分钟形成 1μmol 对硝基酚为一个酶活力单位。

2. 蛋白质测定: 一般测定用 Lowry 法, 柱层析时测定层析各管的 A₂₈₀。

3. 盘状凝胶电泳 (PAGE) 及 SDS-凝胶电泳 (SDS-PAGE) 操作方法和电泳条件均同文献 [14] 和 [15]。

4. 等电聚焦 (IEF) 按 Vesterberg 薄层凝胶等电聚焦法^[16], 凝胶浓度 5%, 内含 2% 两性载体电解质 Pharmalyte (pH3-10), 在 10℃ 聚焦, 将电源的最大电压、电流及功率分别限定为 1500V、25mA 及 15W。聚焦时间为 3 小时, 按杨寿钧介绍的方法^[17]测定凝胶的 pH 梯度及样品等电点。

结果和讨论

(一) β-木糖苷酶的提纯

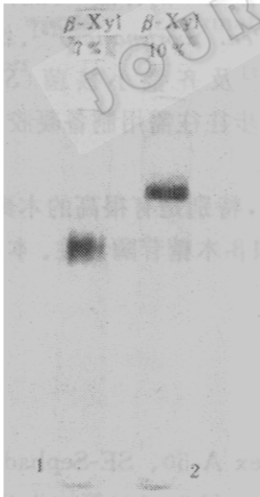


图 1 β-木糖苷酶的凝胶电泳图

Fig. 1 PAGE of purified β-Xylosidase on 7% and 10% of polyacrylamide gel
1. 7. 0% gel; 2. 10% gel
Protein 25μg

1. 粗酶液的制备、聚乙二醇 6000-磷酸胍缓冲液双水相分离、Sephadex G-100 和 DEAE-Sephadex A-50 柱层析其操作条件同 β-半乳糖苷酶提纯过程的 1-4 步^[11]。

2. 羟基磷灰石吸附层析: 柱规格 2.0×30cm, 平衡缓冲液为 pH6.0 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液, 用 0.002-0.50mol/L 磷酸缓冲液 (各 500ml) 进行线性梯度洗脱。

3. DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析: 柱规格为 3.0×30cm, 平衡及洗脱缓冲液为 pH4.9 的 0.02mol/L 乙酸缓冲液, 以 0-0.35mol/L NaCl (各 600ml) 线性梯度洗脱。

4. SE-Sephadex C-50 离子交换层析: 柱规格为 2.8×24cm, 平衡缓冲液为 pH3.6 的 0.02 mol/L 乙酸缓冲液。以 0.02mol/L NaCl 充分洗柱后, 再以 0.02-0.35mol/L NaCl (各 700ml) 线性梯度洗脱。

5. Sephadex G-50 柱层析: 柱规格为 3.0×60cm, 将柱用蒸馏水充分洗涤后上样, 再

用蒸馏水洗柱,以 0—0.4mol/L NaCl (各 500ml, pH4.5, 0.02mol/L 乙酸缓冲液)线性梯度洗脱。上样后,所有杂蛋白均直接从柱上流出来,而 β -木糖苷酶则吸附在柱上,当用 NaCl 洗脱时才从柱上流下来,即为均一样品。 β -木糖苷酶整个提纯过程见表 1。

将提纯的酶用 7% 和 10% 的凝胶进行电泳检查其纯度,结果为均一成份(图 1)。

表 1 β -木糖苷酶的提纯Table 1 Purification of β -Xylosidase from *Aspergillus 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	67060	3946	0.059	1	100
双水相分离 Biphasic separation	18970	2561	0.14	2.4	64.9
Sephadex G-100	875	619	0.70	12.0	15.7
DEAE-Sephadex A-50	148	443	3.0	51.0	11.2
羟基磷灰石 Hydroxyapatite	87.5	316	3.6	61.2	8.0
DEAE-Sephadex A-50	48.2	257	5.3	90.3	6.5
SE-Sephadex C-50	19.5	157	8.1	136.4	4.0
Sephadex G-50	7.5	112	14.7	249.8	2.8

(二) 酶的一般性质

1. 最适 pH: 在不同 pH 的 0.05mol/L 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中测定 β -木糖苷酶的水解活力。 β -木糖苷酶的最适 pH 为 3.5。

2. 最适温度: 在最适 pH 的缓冲液中,测定该酶在不同温度下水解底物的活力。酶的最适温度为 65℃。

3. 酶的 pH 稳定性: 将酶液在 0.05mol/L 不同 pH 的柠檬酸- Na_2HPO_4 (pH2.0—8.0) 或甘氨酸- NaOH (pH8.5—10.0) 缓冲液中,于 40℃ 保温 1 小时,然后加入 pH3.5 的 0.5 mol/L 乙酸缓冲液调回 pH,并测定剩余酶活力。 β -木糖苷酶的 pH 稳定范围为 3.5—6.5。

4. 酶的热稳定性: 将 β -木糖苷酶在 30—100℃ 温度下保温 30 分钟后测定酶活力, β -木糖苷酶失活 50% 的温度 ($t_{1/2}$) 为 68℃。

5. 酶的分子量: 用 SDS-PAGE 测定 β -木糖苷酶的分子量。凝胶浓度 7%。 β -木糖苷酶的分子量为 95 000; 用梯度 PAGE 法测定 β -木糖苷酶的分子量也为 95 000。

6. 酶的等电点: 用薄层凝胶电聚焦法测定 β -木糖苷酶的等电点 pI 为 4.4。

7. 酶的紫外吸收光谱: 将冷冻干燥后的 β -木糖苷酶用 pH5.0 的 0.02mol/L 乙酸缓冲液配成 0.5mg/ml 的溶液,用 Hitachi 557 双光束双波长分光光度计测定紫外光谱。在 278nm 有最大吸收,在 250nm 为低谷。由 280nm 的光吸收计算 β -木糖苷酶在 280nm 处的 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为 10.2。

(三) β -木糖苷酶的催化特性

1. 各种金属离子对酶活力的影响:反应体系中含金属盐(10-100nmol/L)50 μ l, pH4.0的0.01mol/L柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液200 μ l,酶液150 μ l,室温下放置30分钟后,加入pNP- β -Xy1 100 μ l,并按常法测定酶活力。 Hg^{2+} 和 Ag^+ 对 β -木糖苷酶有强烈的抑制作用,4mol/L脲对酶也有一定程度的抑制作用。 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、EDTA和SDS等常见的抑制剂对酶活力均无明显影响(表2)。

2. 各种碳水化合物对酶活力的影响:反应体系同上,只是将金属盐改为碳水化合物溶液。测定结果表明,产物D-木糖对 β -木糖苷酶有较强烈的抑制作用,甘油有一定的激活作用,其他碳水化合物对该酶活力无明显影响(表3)。据报道,D-木糖对齐整小核菌^[8]的 β -木糖苷酶也有一定的抑制作用,但未见甘油对该酶有激活作用的报道。

表2 金属离子对 β -木糖苷酶活力的影响*

Table 2 Effect of various chemicals on the activity of β -Xylosidase

化学试剂 Chemicals	相对活力 Relative activity(%)
None	100
AgNO_3	16.9
HgCl_2	13.7
FeCl_3	98.2
BaCl_2	99.6
CaCl_2	90.1
MnCl_2	96.2
CuSO_4	100.7
ZnSO_4	96.9
PbAc_2	98.1
SDS	82.6
脲 Urea	66.7
EDTA	96.5

*注:浓度除脲为4mol/L、SDS为10mmol/L外,其余均为1mmol/L。

Urea: 4mol/L, SDS: 10mmol/L, Others: 1mmol/L

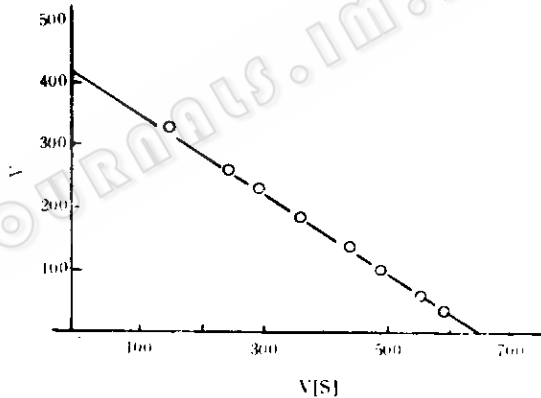
3. 酶的底物特异性:以 β -木糖苷酶水解pNP- β -Xy1的活力为标准,计算此酶对其他底物的相对水解活力。结果表明, β -木糖苷酶仅对pNP- β -Xy1有很高的水解活性,对pNP- β -葡萄糖苷、纤维二糖、水杨素等其他底物均无水解作用,因此为一种专一的 β -木糖苷酶。该酶的底物特异性与绿色木霉(*Trichoderma viride*)^[6]和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)^[18]等来源的较专一的 β -木糖苷酶相似。

4. 酶的动力学参数:在测定 β -木糖苷酶的动力学参数时,底物为pNP- β -Xy1,在60C及pH4.0的0.05mol/L柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中反应。其余反应条件及测定方法均同 β -半乳糖苷酶动力学参数的测定^[11]。将测定结果按Woolf法做图。由图2求得 β -木糖苷酶水解pNP- β -Xy1的 K_m 值为0.63mmol/L, V_{max} 为410 μ mol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹。

表 3 各种碳水化合物(10mmol/L)对酶活力的影响

Table 3 Effect of various carbohydrates (10mmol/L) on the activity of β -Xylosidase

碳水化合物 Carbohydrates	相对活力 Relative activity(%)
对照 Control	100
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	96.6
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	94.3
D-木糖 D-Xylose	41.5
L-岩藻糖 L-Fucose	102.5
D-半乳糖 D-Galactose	100.8
D-葡萄糖 D-Glucose	103.8
纤维二糖 Cellulbiose	91.1
乳糖 Lactose	89.4
麦芽糖 Maltose	97.4
木糖醇 Xylitol	98.6
山梨醇 Sorbitol	101.8
半乳糖醇 Dulcitol	100.4
水杨素 Salicin	101.3
D-葡萄糖酸- γ -内酯 D-Glucono- γ -lactone	96.9
D-半乳糖酸- γ -内酯 D-Galactono- γ -lactone	96.6
甘油 Glycerol	125.1

图 2 β -木糖苷酶水解 pNP- β -Xyl1 的 Woolf 图Fig. 2 Woolf plot for the hydrolysis of pNP- β -Xyl1 by β -Xylosidase

$$v \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}; [\text{S}] - \text{mmol/L}$$

5. 产物 D-木糖对 β -木糖苷酶的抑制类型与抑制常数:

(1) Lineweaver-Burk 作图法:按测 K_m 值的同样方法,测定存在或不存在终浓度为 2.5mmol/L 的抑制剂时, β -木糖苷酶水解 0.2—5.0mmol/L 的 pNP- β -Xyl1 的活力,并计算反应速度。将结果按 Lineweaver-Burk 法作图(图 3)。结果表明,反应体系中存在或不存在 D-木糖时, β -木糖苷酶水解 pNP- β -Xyl1 的双倒数曲线在 v^{-1} 轴上相交,而在 $[s]^{-1}$ 轴上的截距不同。因此,D-木糖对 β -木糖苷酶显示竞争性抑制作用。其 K_i 值为 7.2mmol/L。

(2) Dixon 作图法:按常规方法于 65 C 测定反应体系中存在 0—20mmol/L D-木糖,

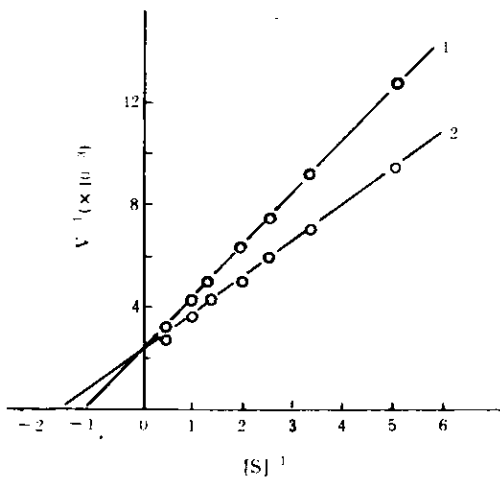


图3 在D-木糖存在下,β-木糖苷酶水解 pNP-β-Xyl 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of pNP-β-Xyl by β-Xylosidase in the presence of D-Xylose

1. D-木糖 D-Xylose; 2. 对照 Control

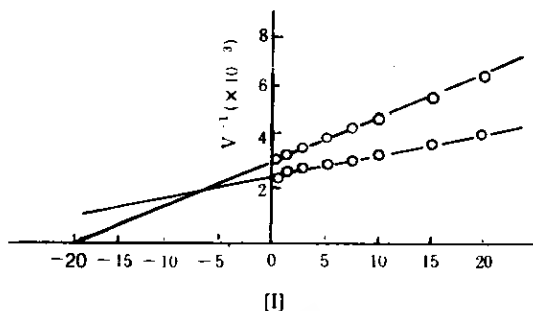


图4 D-木糖对β-木糖苷酶抑制作用的 Dixon 图

Fig. 4 Dixon plot for the inhibition of D-Xylose on β-Xylosidase

pNP-β-Xyl concentration:

1. 1mmol/L; 2. 2mmol/L

β-木糖苷酶水解 1mmol/L 和 2mmol/L pNP-β-Xyl 的活力。将结果按 Dixon 法作图(图4)。结果表明,反应体系中存在不同浓度 D-木糖时,β-木糖苷酶水解不同浓度的 pNP-β-Xyl 的 Dixon 曲线于第二象限相交,表明 D-木糖对 β-木糖苷酶显示竞争性抑制作用。由交点在 [I] 轴上所对应的座标值,求得 D-木糖抑制 β-木糖苷酶的 K_i 为 7.8mmol/L。上述结果表明,由 Lineweaver-Burk 作图法与 Dixon 作图法所得结果基本一致。

参 考 文 献

- [1] Howard, B. D. et al. : *Biochem. J.*, **74**:173-180,1960.
- [2] Claeysens, M. et al. : *FEBS. lett.*, **11**:336-338,1970.
- [3] Takenishi, S. et al. : *J. Biochem.*, **73**:335-343,1973.
- [4] John, M. et al. : *Can. J. Biochem.*, **57**:125-134,1979.
- [5] Deleyn, F. et al. : *Can. J. Biochem.*, **56**:43-50,1978;
- [6] Matsuo, M. et al. : *Agr. Biol. Chem.*, **48**:1845-1852,1984.
- [7] Esteban, R. et al. : *Can. J. Microbiol.*, **28**:733-739,1982.
- [8] Lachke, A. H. : *Enzyme Microb. Technol.*, **7**:445-448,1985.
- [9] 曾宇成、张树政:微生物学报, **27**(4):350-356,1987.
- [10] 曾宇成等:微生物学报, **32**(2):105-114,1992.
- [11] 曾宇成、张树政:生物化学杂志, **3**:552-560,1987.
- [12] 曾宇成、张树政:生物化学杂志, **4**(2):109-115,1988.
- [13] 曾宇成、张树政:微生物学报, **29**(3):195-199,1989.
- [14] Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**:404-427,1964.

- [15] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**:4406-4412, 1969.
[16] Vesterberg, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **257**:11-19, 1972.
[17] 杨寿钧: *微生物学通报*, **9**:186-191, 1982.
[18] Kersters-Hilderson, H. et al.: *Methods in Enzymology*, **83**:631, 1983.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β -XYLOSIDASE FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zeng Yucheng Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A β -Xylosidase has been purified to PAGE homogeneity from the wheat bran culture of *Aspergillus phoenicis* by PEG 6000-phosphate buffer aqueous twophase separation and successive chromatography on Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50, hydroxyapatite, DEAE-Sephadex A-50, SE-Sephadex C-50 and Sephadex G-50 columns. The enzyme showed optimum activity at pH 3.5 and 65°C, it was stable in the pH range 3.5-6.5. The molecular weight of the enzyme was 95000 as determined by SDS-PAGE and concentration gradient-PAGE. The isoelectric point was estimated to be pI 4.4. The enzyme showed the highest activity toward pNP- β -Xyloside. The K_m and the V_{max} values were 0.63mmol/L, and $410\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. The enzyme was strongly inhibited by Hg^{2+} , Ag^+ and D-Xylose. The K_i for D-Xylose was about 7.5 mmol/L, as determined by Lineweaver-Burk plot and Dixon plot.

Key words *Aspergillus phoenicis*; β -Xylosidase; Purification and properties