

## 燕麦木聚糖选择性吸附分离内切木聚糖酶



JIANG Hua

江 华, 薄开静

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

**摘 要:** 用水不溶性燕麦木聚糖吸附分离绿木霉木聚糖酶, 结果表明, 该木聚糖能选择性吸附分离木聚糖酶组分, 分离所得两组分均达到电泳纯。未吸附组分(Xyn I)和吸附组分(Xyn II)的分子质量分别为 29.5 和 26.5 ku, 它们对桦木木聚糖的米氏常数分别为 1.73 和 3.16 g/L。以纯化酶组分及其混合物水解燕麦木聚糖, 采用高效液相色谱分析相应的水解产物, 结果表明, Xyn I 降解燕麦木聚糖时, 主要降解作用发生在底物中没有取代基的区域, 水解产物的聚合度较高; Xyn II 对底物具有更强的适应性, 能降解底物中有取代基的区域, 相对 Xyn I 酶组分, Xyn II 酶组分对低聚合度的木聚糖的活性更高, 木二糖为主要降解产物。木聚糖酶组分均为酸性酶, Xyn I 耐酸性范围更宽, 而 Xyn II 对 pH 值更为敏感; Xyn I、Xyn II 的最适反应温度分别为 45 和 55 °C; 而它们的适宜 pH 值分别为 4.5 和 5.5。

**关键词:** 燕麦木聚糖; 木聚糖酶

中图分类号: TQ91; O636.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2008)04-0049-06

## Separation of Endoxylanases from *Trichoderma viride* by Selective Adsorption with Oat Xylan

JIANG Hua, BO Kai-jing

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Endoxylanases from *Trichoderma viride* were separated from each other by selective adsorption with insoluble oat xylan. Based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), both xylanases reached electrophoretically pure. The molecular weights of the bounded (Xyn II) and the unbounded (Xyn I) components were 26.5 and 29.5 ku respectively, and their  $K_m$ s toward birch xylan were 1.73 and 3.16 g/L, respectively. The hydrolysates from oat xylan using Xyn I, Xyn II and their mixture for hydrolysis were analysed by HPLC. It was showed that Xyn I hydrolyzed mainly the unsubstituted regions of oat xylan, and hydrolytes were high xylooligosaccharides; whereas Xyn II exhibited greater catalytic versatility than Xyn I and were able to attack substituted regions of the polysaccharide and showed greater activity to low xylooligosaccharides than Xyn I to give xylobiose as the main hydrolysate. The purified xylanases were acidic enzymes. Xyn II was sensitive to pH value, and Xyn I was stable in the wide range of pH values. The optimal reaction temperatures of Xyn I and Xyn II were 45 and 55 °C respectively, and their optimal pH values were 4.5 and 5.5 respectively.

**Key words:** oat xylan; endoxylanases

内切- $\beta$ -1,4-D-木聚糖酶( EC 3.2.1.8) 打开木聚糖主链中  $\beta$ -1,4 糖苷键, 降低木聚糖的聚合度。木聚糖酶水解木聚糖时对作用位点的选择取决于底物分子性质, 如底物分子链长、支链化程度<sup>[1-2]</sup>。在食品、饲料、医药、能源、造纸、纺织等许多行业中, 木聚糖酶具有广阔的应用前景, 特别在纸浆造纸工业中, 该酶可用于纸浆的漂白, 降低纸浆漂白过程中化学品的用量, 从而有效的降低造纸工业对环境所产生的污染<sup>[3]</sup>。因此, 为了规模化、高效利用木聚糖酶, 木聚糖酶的生物学特性及其作用机理已成为各国科学工作者研究的焦点之一。由于木聚糖结构的复杂性和组成的不均一性, 导致木聚糖酶系结构复杂而多变, 因此, 建立高效、快速的分离纯化木聚糖酶组分的技术显得特别的重要。国内外对不同来源微

收稿日期: 2007-09-26

基金项目: 江苏省高校自然科学研究(05KJB220051)

作者简介: 江华(1966-), 男, 江苏通州人, 副教授, 博士, 主要从事生物反应与分离工程与技术的研究。

生物木聚糖酶的分离纯化进行了大量的研究,近年来已报道从木霉<sup>[4]</sup>、曲霉<sup>[5]</sup>、青霉<sup>[6]</sup>等真菌和芽孢杆菌<sup>[7]</sup>、梭菌<sup>[8]</sup>等细菌以及链霉菌<sup>[9]</sup>等放线菌中纯化得到内切木聚糖酶。多种微生物尤其霉菌和放线菌能产生两种或两种以上的内切木聚糖酶<sup>[10-11]</sup>,但是,将内切木聚糖酶进一步分离得到几乎均质组分的报道却很少见。作者采用选择性吸附分离技术纯化绿色木霉(*Trichoderma viride*)木聚糖酶,得到内切木聚糖酶两个组分,并对它们的部分性质进行研究,研究结果可为木聚糖酶的定向制备和酶分子的生物学特性及其应用提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要实验仪器

材料:燕麦木聚糖、桦木木聚糖和 *T. viride* 木聚糖酶,美国 Sigma 公司;木糖、木二糖和葡萄糖标样,德国 Fluka 公司;低分子质量标准蛋白质,中科院上海生物化学研究所;其它试剂均为分析纯。

仪器:(UV-2 800)紫外可见光分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;(DYY-12 C)微电脑控制电泳仪,北京六一仪器厂。

### 1.2 测定方法

**1.2.1 木聚糖酶的吸附分离纯化** 准确称取一定质量的燕麦木聚糖,加入一定体积的 pH 值 3 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液,混匀,放入冰箱,于 4 °C 下浸泡 12 h,使其充分溶胀,过滤除去缓冲溶液之后,再用相同的缓冲液洗涤残渣 2~3 次;在所得的残渣中,加入适量的上述缓冲液及 200 IU 的木聚糖酶酶液,然后,再定容到一定体积,在 4 °C、一定搅拌速度下进行吸附实验,待吸附平衡后,离心(13 000 r/min),分别得到上清液部分和沉淀物,上清液中的酶称为未吸附组分(Xyn I,下同);用  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液洗涤沉淀物 1~2 次,再加入一定体积的 pH 值 7 的  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液,在 4 °C、一定搅拌速度下进行洗脱,60 min 后离心,分别得到上清液部分和沉淀物(燕麦木聚糖),此时上清液中的酶即为吸附组分(Xyn II,下同)。

**1.2.2 木聚糖酶活力测定** 在 25 mL 刻度试管中加入一定体积适当稀释的澄清酶液和 1.0 mL 用 0.05 mol/L、pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的 10 g/L 桦木木聚糖悬浮液。在 50 °C 下反应 30 min。取出迅速加入 DNS 溶液 3 mL,100 °C 煮沸 5 min,水浴冷却后定容至 25 mL,摇匀,550 nm 测定吸收值,求得内切木聚糖酶活力,根据木糖标准曲线(用木糖的绝对量对吸光度 A 值作图),找出反应所产生的木糖量(扣除空白值),以此计算出相应的酶活力。

**1.2.3 蛋白质含量测定** 采用 Sigma 公司的 Bradford 试剂测定蛋白质浓度,牛血清蛋白作为标准蛋白<sup>[12]</sup>。

### 1.3 部分酶学性质测定

酶组分动力学常数测定参照文献[13]。酶组分测定采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,(SDS-PAGE)参照文献[14]。

温度对酶活力的影响:在 30~80 °C 范围内,分别测定木聚糖酶各酶组分的酶活力。

酶组分的酸碱稳定性:将分离所得酶液与不同 pH 值的  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 值 2.5~8.0)缓冲液混合,并在 25 °C 水浴中保温 1.0 和 5.0 h,分别取出测定相应残余酶活力。

酶组分的最适 pH 值:在 pH 值 2.5~8.0 范围内,分别测定木聚糖酶各酶组分的活力。

### 1.4 水解产物的色谱分析<sup>[15]</sup>

采用高效液相色谱(HPLC)法分析水解产物,分别以木糖、木二糖、葡萄糖为标准溶液,在 Agilent 1100 高效液相色谱仪上,采用外标法分析相应的水解产物。操作条件如下:糖柱 Bio-Rad Aminex HPX-42C(300 mm × 7.8 mm);柱温 80 °C;流动相超纯水;流速 0.5 mL/min;检测器示差折光检测器(RI)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 木聚糖酶组分的分离与纯化

在 4 °C 条件下,以燕麦木聚糖为吸附剂,对木聚糖酶进行吸附分离,结果如表 1 所示。

表 1 分离所得组分的酶活特性

Table 1 Enzymatic characteristics of purified xylanase components

项目 items	木聚糖酶活 xylanase activity/IU	蛋白质 protein/mg
原酶 unpurified xylanases	200	55.6
未吸附组分 unbounded component (Xyn I)	37.4	33.2
吸附组分 bounded component (Xyn II)	150.3	18.2

由表 1 可见,燕麦木聚糖吸附了原酶中 75.2% 的木聚糖酶(以酶活力计),18.7% 的木聚糖酶未被木聚糖所吸附,而这些木聚糖仅吸附了原酶中约 32.7% 的蛋白质,由于木聚糖酶两组分之间可能有协同作用,故分离纯化后两组分活力总和小于原酶中木聚糖酶活力。图 1 为分离所得 Xyn I 和吸收组分的 SDS-PAGE 电泳图谱。

由图可见,3 和 4 呈现一条明显色带,说明,一定条件下燕麦木聚糖能有选择地吸附木聚糖酶中分子质量小的组分。根据标准曲线和分离组分的相对迁移率,计算得到 Xyn I 和 Xyn II 的分子质量分别为 29.5 和 26.9 ku。

## 2.2 木聚糖酶组分的反应动力学参数

以桦木木聚糖为底物,在 50 °C、pH 值 4.8 的条件下测定木糖生成速度与底物浓度之关系,然后利用 Sigma Plot 10 软件拟合求得木聚糖酶中两酶组分的反应动力学常数,结果如表 2 所示。

表 2 木聚糖酶组分动力学参数

Table 2 Kinetic constants of purified xylanase components

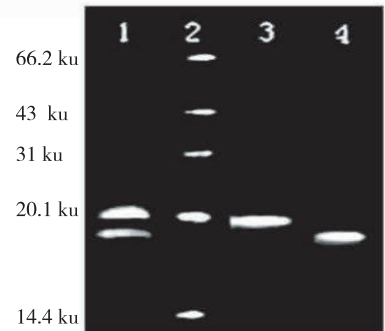
组分 components	最大反应速度 $V_{max}$ /( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	米氏常数 $K_m$ /( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	相关系数 $R^2$	残差平方和 residual sum of squares	预测值的标准误差 standard error of the estimate
Xyn I	0.885	3.16	0.9999	$3.59\text{e}-4$	$7.74\text{e}-4$
Xyn II	0.618	1.73	0.9975	$1.10\text{e}-3$	$1.40\text{e}-3$

表 2 表明,相关系数接近于 1,而且,残差平方和及预测值的标准误差非常小(在  $10^{-3}$  数量级),所以,拟合所求得的动力学常数认为是可信的。米氏常数  $K_m$  表示了酶催化反应过程中酶对底物亲和力的大小, $K_m$  越大,表示该酶对底物的亲和力越小;反之,亲和力越强。Xyn II 和 Xyn I 的  $K_m$  值分别为 1.73 和 3.16 g/L,文献报道各种木聚糖酶的  $K_m$  值一般在 0.1~15 g/L<sup>[16]</sup>。结果表明,Xyn II 对桦木木聚糖的亲和力大于 Xyn I 对该底物的亲和力。

## 2.3 木聚糖酶组分的酶解特性分析

在温度为 50 °C、pH 值 4.8 条件下,分别用 Xyn I 和 Xyn II 及它们的混合物(3:1,蛋白质质量比,下同)和原酶液酶解燕麦木聚糖,酶用量为 10 IU/g(以底物计),底物质量浓度为 10 g/L,酶解时间为 24 h,酶水解产物的 HPLC 图谱见图 2 和图 3。

由图 2 可见,Xyn I 酶解燕麦木聚糖时,所得酶解产物中高聚合度的低聚木糖含量较高,相对应的保留时间为 7~9.2 min。Xyn II 酶解燕麦木聚糖时,产物中保留时间小于 9.2 min 的高聚合度低聚木糖含量明显减少,而木二糖(保留时间为 10.6~11.6 min 的组分)含量增加了 55.5%,木糖(保留时间 10.0~14.0 min)含量下降了 23%。由此可以推断,尽管 Xyn I 和 Xyn II 均属于内切木聚糖酶,能随机切断木聚糖主链的  $\beta$ -1,4 糖苷键,生成聚合度较低的木聚糖,但是,这两种组分对底物燕麦木聚糖水解模式有所不同。Xyn I 降解燕麦木聚糖时,主要生成高聚合度的低聚木糖和木糖;而 Xyn II 降解燕麦木聚糖时,主要生成木二糖和少量木糖。图 3(a)为 Xyn I 和 Xyn II 以 3:1 混合后酶解燕麦木聚糖所得酶解



1. 原酶液 crude xylanases; 2. 标准蛋白质 marker; 3. Xyn I; 4. Xyn II

图 1 木聚糖酶及其纯化组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis pattern of xylanases and purified xylanase components

产物的 HPLC 图谱,同图 2(a) 相比较可见,添加少量的 Xyn II 之后,水解产物中高聚合度的低聚木糖(保留时间 7~9.2 min) 含量明显降低。根据糖基分析<sup>[17]</sup>,燕麦木聚糖含阿拉伯糖基、葡萄糖醛酸基等取代基,相对 Xyn II 酶组分而言,这些取代基对 Xyn I 产生严重的空间障碍,阻止 Xyn I 对燕麦木聚糖的水解作用,导致水解产物聚合度较高;而这些取代基对 Xyn II 的空间障碍较小,因此,Xyn II 水解燕麦木聚糖时的水解产物中高聚合度产物含量较低。这说明,Xyn I 酶组分主要水解底物分子中没有取代基的区域,而 Xyn II 酶组分对底物的适应性更强,能水解底物分子中有取代基的区域,能进一步降解 Xyn I 对木聚糖的降解产物。

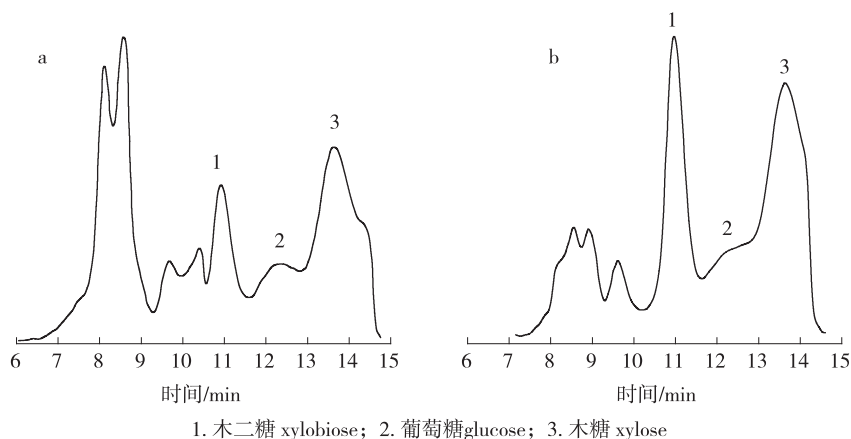


图 2 木聚糖酶组分 Xyn I (a) 及组分 Xyn II (b) 的酶解产物 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC spectra of hydrolysates from oat xylan by Xyn I (a) and Xyn II (b)

图 3 为 Xyn I 和 Xyn II 混合物(3:1)以及原酶液(Xyn I 和 Xyn II 之比 1:4)酶水解燕麦木聚糖时所得产物的 HPLC 图谱,该图谱表明,Xyn II 和 Xyn I 的比例为 1:3 时,保留时间在 7.6~10.4 min 的酶解产物对应的峰高基本相近,但是原酶(Xyn I 与 Xyn II 之比为 1:4)酶解燕麦木聚糖时,保留时间在 7.6~10.4 min 的组分明显减少,而木二糖组分(保留时间在 10.4~11.2 min)明显增加,由此可见,Xyn II 含量增加,酶解产物的聚合度会进一步降低,产物中木二糖含量增加而木糖含量相对降低。结果表明,相对 Xyn I 酶组分,Xyn II 酶组分对低聚合度的木聚糖的活性更高。

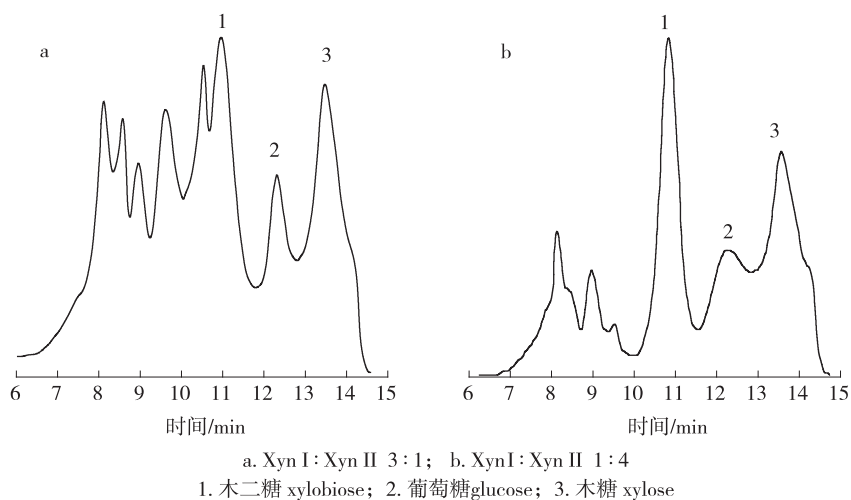


图 3 木聚糖酶组分混合物酶解产物 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC spectral of hydrolysates from oat xylan by the mixture of Xyn I and Xyn II

#### 2.4 木聚糖酶组分的最适温度

图 4 表示反应温度与木聚糖酶组分活力之间的关系。由图可见,反应温度较低时,温度升高,酶促

反应速率随之提高,所以最终表现为各酶组分活力随温度升高而增加。温度升高到一定值时,各酶组分的活力随反应温度升高而降低,温度较高时,由于酶的失活,导致酶组分活力下降。图 4 表明,当反应温度升高到 60 ℃ 时,Xyn II 的相对酶活为 85 %,而 Xyn I 的相对酶活仅为 60 %。Xyn II 的最适反应温度为 55 ℃,此时 Xyn I 的相对酶活仅有 75 %;而 Xyn I 的最适反应温度仅为 45 ℃,此时 Xyn II 的相对酶活力为 56 %。由此可见,木聚糖酶中各酶组分有各自最适反应温度,它们相差约 10 ℃,Xyn II 比 Xyn I 更耐温度。

### 2.5 木聚糖酶组分的酸碱稳定性及最适反应 pH 值

pH 值不仅影响着酶蛋白表面电荷分布,而且影响着酶活性部位的构象,最终表现为 pH 值对酶活力的影响。图 5 表示保温 1 和 5 h 情况下木聚糖酶组分的酸碱稳定性。在 20 ℃、保温 1 h 情况下,Xyn I 的相对酶活大于 90 % 时的 pH 值为 3.0~5.5,而 Xyn II 保持高活力(相对酶活大于 90 %)时的 pH 值为 5.0~6.0。当 pH 值 7.0 时,Xyn II 和 Xyn I 的活力分别下降到 70 % 和 59 %。保温 5 h 时,木聚糖酶组分稳定性的变化与保温 1 h 时的变化趋势相同,但是,在相同的 pH 值下,相对酶活均有所下降,可见分离所得木聚糖酶的两个组分均为酸性酶,但是,Xyn I 耐酸性范围更宽,而 Xyn II 对 pH 值更为敏感。

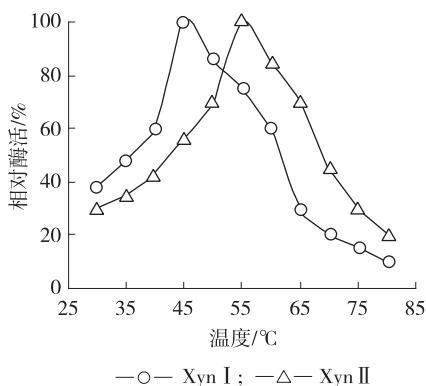


图 4 木聚糖酶组分的最适反应温度

Fig. 4 Optimal reaction temperature for purified xylanase components

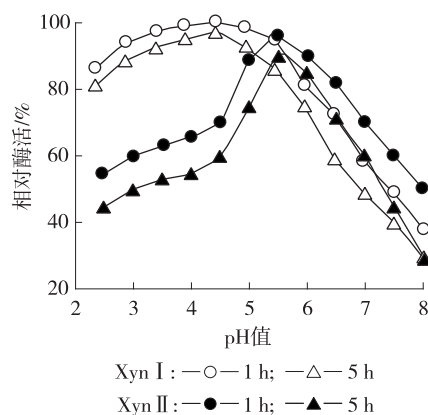


图 5 木聚糖酶组分的酸碱稳定性

Fig. 5 Stability of purified xylanase components under different pH values

图 6 表示了木聚糖酶组分的相对酶活与 pH 值之间关系,可见在本实验条件下,Xyn II 的最适 pH 值为 5.5,而此时 Xyn II 的相对酶活为 80 %;Xyn I 的最适 pH 值为 4.5,而此时 Xyn II 的相对酶活为 85 %。可见,木聚糖酶组分的最适 pH 值相差 1 个单位。但是,当 pH 值 4.8 时,两个酶组分的相对酶活力均大于 90 %。

## 3 结论

3.1 通过燕麦木聚糖的选择性吸附作用,能快速有效地对木聚糖酶组分进行分离,吸附分离所得两组分均达到电泳纯。Xyn I 和 Xyn II 的分子质量分别为 29.5 和 26.5 ku。它们对桦木木聚糖的米氏常数分别为 3.16 和 1.73 g/L。

3.2 Xyn I 降解燕麦木聚糖时,主要降解作用发生在底物中没有取代基的区域,水解产物的聚合度较高。Xyn II 对底物具有更强的适应性,能降解底物中有取代基的区域,相对 Xyn I 酶组分,Xyn II 酶组分对低聚合度的木聚糖的活性更高,木二糖为主要降解产物。

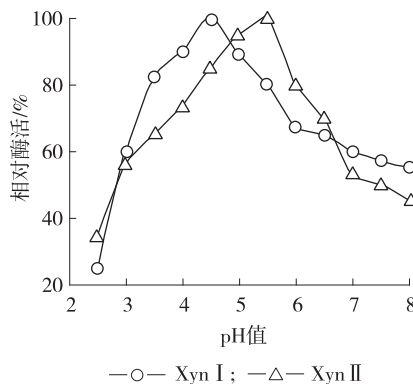


图 6 木聚糖酶组分的最适 pH 值

Fig. 6 Optimal pH value for purified xylanase components

3.3 分离所得木聚糖酶组分均为酸性酶, Xyn I 耐酸性范围更宽, 而 Xyn II 对 pH 值更为敏感; Xyn I 和 Xyn II 的最适反应温度分别为 45 和 55 °C; 而它们的适宜 pH 值分别为 4.5 和 5.5。

#### 参考文献:

- [1] REILLY P J. Xylanases, Structure and Function[M]. Hollaender A. Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals. New York: Plenum, 1981.
- [2] LI K, AZADI P, COLLINS R, et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 27: 89-94.
- [3] BAJPAI P. Application enzymes in the pulp and paper industry[J]. Biotechnol Prog, 1999, 15: 147-157.
- [4] CHEN C, CHEN J L, LIN T Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21: 91-96.
- [5] SANDRIM V C, RIZZATTI A C S, TERENCE H F, et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(5): 1823-1828.
- [6] RYAN S E, NOLAN K, THOMPSON R, et al. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(6): 775-785.
- [7] QURESHY, A F, KHAN L A, KHANNA S. Express of *Bacillus circulans* teri-42 xylanase gene in *Bacillus subtilis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 227-233.
- [8] RANI D S, NAND K. Purification and characterization of xylanolytic enzymes of a cellulase-free thermophilic strain of *Clostridium* CFR-702 [J]. Anaerobe, 2001, 7: 45-53.
- [9] ITO S, KUNO A, SUZUKI R, et al. Rational affinity purification of native *Streptomyces* family 10 xylanase[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 11: 137-142.
- [10] BLANCO J, COQUEJ J R, VELASCO J, et al. Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1,4-xylanase of *Thermomonospora* Alba ULJB1 with cellulose-binding ability[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48: 208-217.
- [11] XU J, TAKAKUWA N, NOGAWA M, et al. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 718-724.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] ROBERT A. Enzymes[M]. 2 版. [s. l.]: Wiley-VCH Inc, 2000.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] YUAN Q P, ZHANG H, QIAN Z M, et al. Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2004, 79: 1073-1079.
- [16] LI X L, ZHANG Z Q, DEAN J F D, et al. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3213-3218.
- [17] 郑建仙. 功能性低聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

## 本刊信息

## 通告

《林产化学与工业》、《生物质化学工程》编辑部已正式开通稿件采编系统, 编辑部将不再受理纸质稿件和 E-mail 投稿, 新的投稿网址如下, 如有疑问请与编辑部联系。

《林产化学与工业》网址: [www.cifp.ac.cn](http://www.cifp.ac.cn); 联系电话: 025-85482493; E-mail: [lchx@chinajournal.net.cn](mailto:lchx@chinajournal.net.cn)。

《生物质化学工程》网址: [www.bce.ac.cn](http://www.bce.ac.cn); 联系电话: 025-85482492; E-mail: [lchg@chinajournal.net.cn](mailto:lchg@chinajournal.net.cn)。

《林产化学与工业》编辑部  
《生物质化学工程》编辑部