文章编号:1009-038X(2004)03-0030-06

草菇中木糖苷酶的分离纯化及其酶学性质

吴华伟[1], 戴 军[2], 邵蔚蓝[1*]

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 草菇(*Volvariella volvacea*)在 20 L 发酵罐中以稻草粉为基质进行培养,所产生的β-木糖苷酶(β-1,4-xylosidase,EC 3.2.1.37)经硫酸铵沉淀、苯基-琼脂糖(Phenyl-agarose)疏水性柱层析、DEAE-Sephacel 阴离子柱层析、TOSOHASS-HW-5S 分子筛过滤分离等提纯步骤,达到了电泳纯,提纯倍数为 241 倍,收率为 14.5%. 该酶反应的最适 pH 值为 6.41～6.76,最适温度为 55 ℃;在 pH 值 5.78 ～ 7.68 之间酶活力相对稳定,52 ℃的半衰期($t_{1/2}$)为 1 h. 由凝胶过滤和 SDS-PAGE 测得酶由 4 个亚基组成,酶的相对分子质量为 2 825 000. 在所测定的底物中,β-木糖苷酶仅对对硝基苯基-β-D-木糖苷有专一性水解作用,其对对硝基苯基-β-D-木糖苷水解的动力学参数 K_m 值为 2.4 mmol/L, v_{max} 为 42 μmol/(min·mg). 该酶催化对硝基苯基-β-木糖苷水解将产物β-木糖反转成α-木糖.

关键词: β-木糖苷酶; 草菇; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 556 **文献标识码**: A

Purification and Characterization of β-Xylosidase from *Volvariella volvacea*

WU Hua-wei[1], DAI Jun[2], SHAO Wei-lan[1*]

(1. The Key Laboratory of Industry Biotechnology under Ministry of Education., Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Center of Analysis and Test. Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A β-xylosidase was purified from straw powder culture of *Volvareilla volvacea* through following steps: a) ammonium sulfate precipetation; b) hydrophobic interaction chromatography on Phenyl-agarose; c) ion exchange chromatography on DEAE-sephacel; and d) Gel filtration on TosoHaas-HW-55S. The purified enzyme showed a single band on SDS polyacrylamide gel electrophoresis with a purification of 241 fold, and a yield of 14.5%. The optimal reaction conditions for the enzyme were pH 6.41 ～ 6.76 at 55 ℃. At the pH range of 5.78 ～ 7.68, the enzyme was stable and had 1 h half-life at 52℃. The molecular weight was estimated by SDS-PAGE and by gel filtration as 70,100 and 282,500, respectively. Among all tested substrates, the enzyme exhibited the specific activity to *p*-nitrophenyl β-xylopyranoside (PNPX). The apparent Michaelis constant of the β-xylosidase was 2.4 mmol/L for PNPX, and v_{max} was 42 U/mg protein. The enzyme hydrolyzed PNPX with inversion of anomeric configuration, producing α-xylose from β-xylopyranoside.

Key words: β-xylosidase; *Volvareilla volvacea*; purification and characterization

收稿日期:2003-08-15; **修回日期**:2003-09-28.

作者简介: 吴华伟(1977-),男,湖北宜昌人,发酵工程工学硕士; * 为通讯作者.

万方数据

随着人口的不断增长和资源的进一步消耗，可再生资源的开发和利用已经成为国际社会和科学界共同关注的问题. 半纤维素是仅次于淀粉和纤维素的一大类可再生资源，我国是一个农业大国，每年有大量的秸秆产生，而秸秆干重的质量分数为24%～35%是木聚糖，这正是最容易提取、降解和利用的一类半纤维素. 不仅如此，半纤维素的生物降解还能释放出被其包裹的纤维素，从而使纤维素得到充分利用.

一个完善的半纤维素酶系统应该具有降解某种半纤维素所需要的各种酶. 来源于秸秆的木聚糖类半纤维素是由 β-1,4 木糖苷键连接成的主链上带有 1,3-L-阿拉伯呋喃糖基、1,2-葡萄糖醛酸和乙酰基等不同侧枝的杂多糖. 这类木聚糖的完全降解需要多种酶的协同作用. 首先，由 β-1,4-内切木聚糖酶(Endo β-1,4-xylanase, EC 3.2.1.8)随机断裂木聚糖骨架，产生木寡糖，降低了聚合度，然后由外切酶 β-木糖苷酶(β-1,4-xylosidase, EC 3.2.1.37)从非还原性末端将木寡糖和木二糖分解为木糖. 侧链取代基的存在能阻抑木聚糖酶和木糖苷酶的作用，因此水解木糖与侧链取代基之间的糖苷键的酶，如 α-L-阿拉伯糖苷酶(α-L-arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55)、α-D-葡萄糖醛酸酶(α-D-glucuronidase, EC 3.2.1.139)都是必不可少的.

研究半纤维素酶的目的可分为 2 种，其一是发展木聚糖酶或甘露聚糖酶的工业用途，如在纸浆造纸、食品/饮料加工中的应用，或用于饲料添加剂；而其它的研究则以实现半纤维素的彻底降解从而进行生物转化为目的，这就要求对完整的半纤维素酶系统展开研究. 我国科学家的研究目的以前者为主，因此，除了降低聚合度的木聚糖酶或甘露聚糖酶，其它半纤维素水解酶如对于单糖的产生起着关键作用的木糖苷酶等在国内还未见研究报道.

绝大部分微生物不具备完善的半纤维素酶系统，因此不能利用木质纤维为碳源发酵进行生物转化. 国际上研究较多的能利用木聚糖为碳源发酵的微生物系统主要包括嗜热菌[1]和一些子囊菌或半知菌纲的真菌，如木霉、曲霉等. 嗜热菌产生的酶具有较高的热稳定性，因此嗜热菌不但是参与农业有机肥料堆制的很好的菌种，而且可以是优质酶的来源和构建工程菌的基因源. 但是利用高温菌进行生物转化，或者进行工业发酵的技术还有待发展. 木霉、曲霉等丝状真菌的半纤维素酶系统研究的较成熟，而且霉菌是常用的发酵工程菌，有希望成为半纤维素的生物降解和转化的工程菌. 然而它们都不能以秸秆为原料进行快速生长，而且是植物致病菌或仓储酶菌，大规模的繁殖可能对环境产生污染.

高等担子菌草菇(*Volvariella volvacea*)是一种高温型食用菌，主产地在我国. 由于其生长温度较高，转化快，无毒，无致病，而且它拥有完备半纤维素酶系统，能以秸秆为原料进行大规模培养，作者认为它是构建降解和转化秸秆的基因工程菌的理想菌株. 对于高等担子菌产生的木糖苷酶在国际上还未见研究报道，本文报道了作者实验室对草菇木糖苷酶的纯化过程以及酶学性质的研究结果，为了解高等担子菌的半纤维素酶系统及其特性，并为基因克隆及工程菌的构建奠定基础.

1　材料与方法

1.1　试剂和仪器

1.1.1　主要试剂　木聚糖、果胶、木糖、小牛血清白蛋白、对硝基苯基-β-D-木糖苷、对硝基苯酚、Phenyl-agarose、DEAE-Sephacel、Acr-Bis：购于 Sigma 公司；TOYOPEARL HW-55S (SOTOHAAS)、SDS-PAGE 低相对分子质量标准蛋白：上海西巴斯生物技术有限公司产品；苯甲磺酰氟：上海源聚提供；叠氮化：上海博彩生物科技公司提供.

1.1.2　主要设备　分光光度计：Unico 生产；高速冷冻离心机：Thermo IEC 生产；pH 计：Delt320：梅特勒-托利多仪器公司生产；25 L 发酵罐：江苏镇江仪器设备厂生产；BioLogic LP 色谱系统：Life Science Group 生产.

1.2　菌种和培养

草菇菌株(*Volvariella volvacea*)，由南京师范大学何强泰教授惠赠.

马铃薯试管斜面培养基(g/L)：煮沸汁马铃薯 200，蔗糖 20，酵母粉 6，硫酸铵 3，琼脂 20.

液体菌种的制备：试管斜面菌种接种于含有 5 g/L 羧甲基纤维素，5 g/L 木聚糖，2 g/L 蛋白胨，0.6 g/L KH_2PO_4，0.5 g/L $MgSO_4$，VB_1 0.5 mg/L 的液体培养基中，于 40 ℃，转速 130 r/min，摇瓶培养 4 d. 液体菌种以体积分数为 1% 的接种量接入到 25 L 发酵罐中.

25 L 发酵罐培养基组成：3 g/dL 的稻草粉在 2 g/L NaOH 中煮沸 5 min，并用 HCl 调至 pH 值为 7.0，加入 5 g/L NaH_2PO_4 和 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$. 发酵罐起始 pH 值为 6.6，最终 pH 值为 6.76，通气量 V(空气)∶V(氧)为 1∶1，温度为 40 ℃，转速 120 r/min. 发酵 96 h，每隔 4 h 取样分析可溶性糖、蛋白质质量浓度和酶活，当酶活力高且稳定时下罐.

万方数据

1.3 蛋白质质量浓度和糖质量浓度的测定

用 Bradford 法[2]测定蛋白质质量浓度，以小牛血清白蛋白作为标准蛋白.

用苯酚-硫酸法[3]测定可溶性糖含量，以葡萄糖作为标准.

1.4 酶活力测定

采用分光光度法[4]，底物对硝基苯基-β-D-木糖苷(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside，PNPX)和酶液反应后用 Na_2CO_3 终止反应并显色，在波长为 405 nm 处测量光吸收的增加值. 一个酶单位定义为在该反应条件下，1 min 内催化产生 1 μmol 对硝基苯基所需要的酶量. 用对硝基苯酚作标准曲线.

1.5 酶的分离纯化

20 L 发酵液分别用纱布和尼龙布过滤，纯化步骤在 18 ℃进行，所有的缓冲液都加入 0.2 g/L 叠氮化钠以防止杂菌生长.

1.5.1 *硫酸铵沉淀* 加固体硫酸铵至饱和度 80%，在冰上静置过夜，10 000 r/min 于 4℃离心 10 min，弃去上清液，用 25 mmol/L 的 Tris-Hcl 缓冲液溶解沉淀物，再于 10 000 r/min 离心 30 min，最终得粗酶液 540 mL，取 180 mL 做提纯用.

1.5.2 *Phenyl-agarose 疏水柱层析* 向粗酶中加入等体积的含 2.5 mol/L 硫酸铵的磷酸钾缓冲液(50 mmol/L，pH 6.8)，溶液沉淀过夜(0～4 ℃)；沉淀再用磷酸钾缓冲液溶解，此时硫酸铵终浓度约为 0.33 mol/L，然后加入含 2.5 mol/L 硫酸铵的磷酸钾缓冲液至硫酸铵终浓度为 0.75 mol/L；离心后将上清液泵入 Phenyl-agarose 疏水柱(2.5 cm× 23 cm)，以含 0.75 mol/L 硫酸铵和不含硫酸铵的磷酸钾缓冲液进行梯度洗脱(1.5 mL/min)和分部收集(每管 8 mL，共 900 mL).

1.5.3 *DEAE-Sephacel 阴离子交换柱层析* 由上步合并的具有较高酶活的粗酶液经硫酸铵沉淀再溶解，然后于 2 L 磷酸钾缓冲液(50 mmol/L，pH 6.8)中透析过夜. DEAE-Sephacel 阴离子交换柱(2.5 cm× 20 cm)预先用同样的磷酸钾缓冲液平衡，然后将透析过的酶液注入柱中，以含 0～1 mol/L NaCl 的磷酸钾缓冲液进行梯度洗脱(体积流量为 2 mL/min)和分部收集(每管 6 mL，共 600 mL).

1.5.4 *TOSOHASS-HW-55S 分子筛层析* 合并收集上步的活性峰值部分，其中蛋白质经 50%饱和度的硫酸铵沉淀，再用尽可能少量的含 0.2 mmol/L NaCl 50 mmol/L pH 5.5 的邻苯二甲酸缓冲液溶解，离心除去不溶杂质后注入分子筛层析柱 TOSOHASS-HW-55S(1.6 cm× 96 cm)；然后用同样的缓冲液洗脱. 体积流量 0.5 mL/min，以每管 2 mL 分部收集. 收集酶活的峰值部分，用聚乙二醇20 000 浓缩后，以 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯度.

1.6 酶的性质分析

1.6.1 *β-木糖苷酶的反应时间曲线* 反应条件为 50 ℃，5 μL 酶液加 185 μL pH 5.8 磷酸缓冲液加 10 μL 底物，反应时间分别取 2，5，10，20，30，45 min，波长 405 nm 处测定吸光值作酶的时间反应曲线.

1.6.2 *温度对酶活力的影响*

1)纯酶的最适反应温度的测定：在 30～70 ℃范围内每隔 5 ℃ 分别测定酶活力，反应条件为 pH 6.76，10 min. 以最高活力为 100%，作温度曲线.

2) 纯酶的热稳定性的测定：分别将酶(1 mg/L)置于选定的温度下保温 0，10，20，40，60，90，120 min，然后加入底物于 55 ℃，pH 6.76 测定残留活力，以保存于冰浴中(未保温)的酶活力为 100%，作温度稳定性曲线，找到酶活力半衰期为 1 h 时的温度.

1.6.3 *pH 值对酶活力的影响*

1) 分析酶促反应的最适 pH 值：在 55 ℃下测定 pH 值的变化对酶活力的影响，以最高活力为 100%，作 pH 值曲线.

2) pH 值稳定性的分析：0.1 μg 酶置于 190 μL 不同 pH 值的缓冲液中，在 50 ℃保温 30 min，再加入底物测定残留酶活力，以冰浴保存的酶在相对应的 pH 值条件下的活力为 100%，比较酶在不同 pH 值条件下的稳定性. 所用缓冲液为 50 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液(pH 值 4.75～7.68).

1.6.4 *相对分子质量* 纯酶亚基相对分子质量用交联度 12% 的 SDS - PAGE 在 110 V 电压下电泳 85 min 后根据相对迁移率计算. 低相对分子质量标准蛋白质从上海西巴斯生物技术开发有限公司购得；全酶相对分子质量用 TosoH 公司的 Tsk-Gel3000 SWXL(7.8 mm×300 mm)柱子测定，流动相为 10 mmol/L pH 值 6.8 的磷酸缓冲液，体积流量为 0.8 mL/min，柱温 25 ℃，上样体积为 10 μL，酶质量浓度为 1 mg/mL，相对分子质量的标准蛋白(Cytochrome c 12 400，Carbonic Anhydrase 29 000，Albumin Bovin Serum 66 000，Alcohol Dehydrogenase 150 000，Amylase 200 000)均从 Sigma 公司购得.

1.6.5 *酶的动力学参数测定* 以不同浓度的对硝基苯基-β-D-木糖苷为底物和 50 mmol/L pH 6.74 的邻苯二甲酸-咪唑缓冲液，在 55 ℃下反应 10 min，采用双倒数作图法，计算 K_m 及 v_{max} 值.

万方数据

1.6.6　酶的底物特异性　在相同条件下测定 β-木糖苷酶分别对对硝基苯基-β-D-木糖苷(PNPX)、对硝基苯基-β-D-木糖苷、对硝基苯基-α-D-葡萄糖苷(PNPG)、对硝基苯基-α-L阿拉伯糖苷(PNPA)、木聚糖的催化活性.除木聚糖的质量浓度为 1 g/dL 外,其它底物浓度都为 1 mmol/L.

1.6.7　酶水解反应产物立体化学构象的测定　以高效液相色谱(HPLC)测定草菇木糖苷酶水解其底物对硝基苯基-β-D-木糖苷所产生的木糖的立体构象.所用层析柱为 Waters 公司的 TSK Gel Amide-80(1.5 mm × 80 mm),流动相体积分数为 70%乙腈,体积流量为 1 mL/min,样品体积为 10 μL.将对硝基苯基-β-D-木糖苷和酶液在 40 ℃反应,分别在 1,2,5,10 min 取样 10 μL 并立即进行 HPLC 分析,以在沸水中保温 5 min 的反应液和从 Sigma 购得的木糖为平衡状态的标准.

2　结果与分析

2.1　草菇培养过程中发酵液和酶活

由于稻草纤维和色素的干扰,在发酵过程中很难观察菌丝的生长,发酵滤液中没有发现杂菌细胞或孢子,发酵停止后收集到少量菌丝球.定时取样测定罐中发酵液中蛋白质浓度、可溶性糖浓度、木糖苷酶酶活和其它半纤维素酶活性的变化,在这次试验所给定的条件下发酵 60 h 后,β-木糖苷酶的活性提高到 13 U/L,此后继续发酵酶活增加缓慢(见图 1),96 h 后发现酶活稍有下降时终止发酵,离心收集上清液.

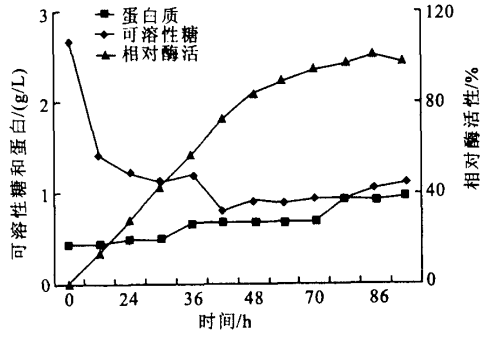


图 1　发酵液和酶活的变化

Fig. 1　Changes of soluble sugar, protein concentration and enzyme activity

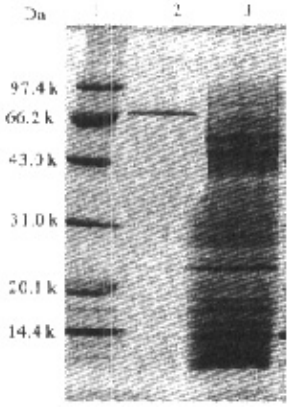
2.2　酶的分离纯化

Phenyl-agarose 疏水柱层析中洗脱结果中杂峰较多,共收集了 112 管,每管 8 mL,通过酶活性检测发现了一个包含 16 管的酶活单峰,蛋白质浓度测定结果显示蛋白质峰值与酶活峰值不吻合,说明仍含有较多的杂蛋白,最终选择 51～57 号(共 56 mL)管合并.DEAE-Sephcel 阴离子交换柱层析中共收集了 100 管,每管 6 mL,根据酶活测定,最后合并 77～84 号管(共 48 mL),用 50% 饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀酶液中的蛋白质,再用约 2 mL 缓冲液溶解后用于分子筛层析.从分子筛 TOSOHASS-HW-55S 柱层析收集的 130 根管中测出酶活,最终将 50,51,52 号管合并收集(大约 6 mL),经浓缩约为 1 mL,SDS-PAGE 电泳检测为单一条带,达到了电泳纯(见图 2).纯化步骤以及相应的纯化效果列于表 1,最终提纯倍数为 241 倍,收率为 14.5%.

表 1　草菇 β-木糖糖苷酶的纯化结果

Tab. 1　Purification of β-xylosidase from straw moshroom Volvariella volvacea

纯化步骤	总蛋白质/mg	比酶活/U/mg	总酶活/U	回收率/%	纯化倍数
原始发酵液	3,500	0.039	136.2	100	1
80%饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$	1,600	0.065	103.4	75.9	2
Phenyl-agarose	153	0.55	84.7	62.3	14
DEAE-Sephacel	12.8	4.71	60.3	44.2	121
TOSOHA-SSHW-55S	2.1	9.4	19.8	14.5	241



1. 标准相对分子质量蛋白;2. 纯酶;3. 原始发酵液

图 2　SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 2　SDS-PAGE

2.3　酶的性质

2.3.1　β-木糖苷酶的最适反应条件　在 pH 值接近中性的条件下,酶的最适活性峰出现于 55 ℃左

万方数据

右；在 30～55 ℃之间，酶的活性随着温度的提高而迅速上升，但是当温度高于 55 ℃时酶的活性急剧下降，说明酶已经较快地失活. 以邻苯二甲酸氢钾-咪唑为缓冲液，测出酶于 55 ℃时的最适 pH 值为 6.41～6.76 之间，属于中性酶；反应条件为 50 ℃，pH 值 5.8，酶质量浓度为 1 mg/L 时，酶促反应的时间曲线表明在这样的反应条件下该酶在 20 min 内保持了最高反应速度，在 20～40 min 内反应速度略有下降.

2.3.2 *酶的稳定性* 纯化的 β-木糖苷酶(1 mg/L 在 pH 值 5.78～7.20 之间酶活相对稳定，残留活性都在 70%以上，且曲线比较平稳. pH 值超出这一范围后酶活下降较快，说明该酶宜在中性条件下保存或进行催化反应. 中性条件下酶在 50℃的半衰期超过 2 h，52 ℃的半衰期为 1 h，56 ℃下酶失活很快，半衰期约为 25 min. 由此推断，该酶在草菇的生理状态下或生长过程中具有很好的稳定性.

2.3.3 *相对分子质量* SDS-PAGE 测出的酶亚基相对分子质量约为 70 100 (见图 2)；通过 Log M-Time 作图由凝胶过滤测得全酶相对分子质量约为 282 500，说明该酶可能由 4 个亚基组成.

2.3.4 *酶促反应的动力学* 参数 K_m 及 v_{max} 值根据 Lineweaver-Burk 作图法，算得的 K_m 值为 2.4 mmol/L，v_{max} 为 42 μmol/(min • mg).

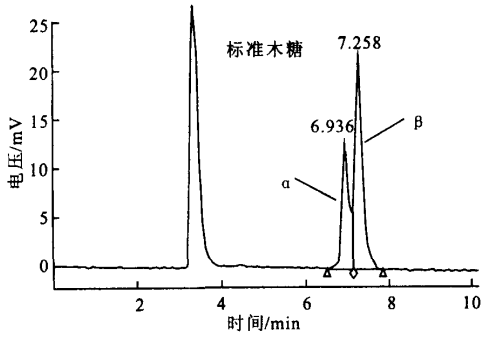
2.3.5 *酶的底物特异性* 该酶只对对硝基苯基-β-D-木糖苷有专一性活性，而对硝基苯基-β-D-木糖苷、对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷、对硝基苯基-α-L-阿拉伯糖苷、木聚糖均未检测出活性.

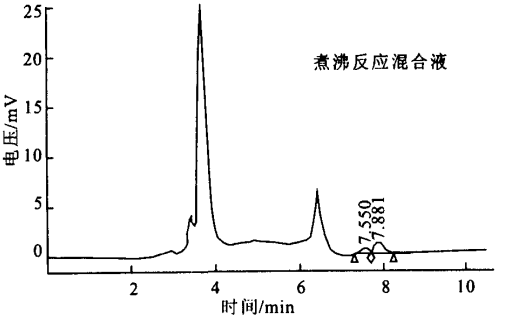
2.3.6 *水解产物的立体化学构象* 在自然平衡状态下，木糖以 α 构象和 β 构象的峰高比约为 1∶1.8[7]的比例存在，这种热力学平衡速度很快. 本实验在 50 ℃下进行反应，并且反应后以超滤离心除去样品中的酶，水解所产生的木糖已经进入自然平衡状态. 因此，将底物对硝基苯基-β-D-木糖苷和酶液混合在 40℃反应. 本实验所用的 TSK-Gel3000 SWL 柱子中，先出峰的都是 α-木糖. 色谱分析结果见表 2. 当酶促反应时间为 1 min 时，木糖苷酶水解底物对硝基苯基-β-D-木糖苷所生成的产物木糖还来不及达到热力学上的平衡状态，所以将反应液立即上柱后根据所显示的图谱就可以判断酶的水解产物立体化学构象的变化情况，结果显示 1 min 时初始水解产物绝大部分为 α-木糖，随着反应时间的延长，木糖开始在热力的驱动下向 1∶1.8(α∶β)的峰高比比例转移，如当酶促反应液在煮沸后，产物木糖在热力的驱动下已经完全达到了平衡，α∶β 已经达到了 1∶1.89(见图 3). 由此可以知道草菇来源的 β-木糖苷酶在水解反应过程中将产物 β-木糖反转成 α-木糖.

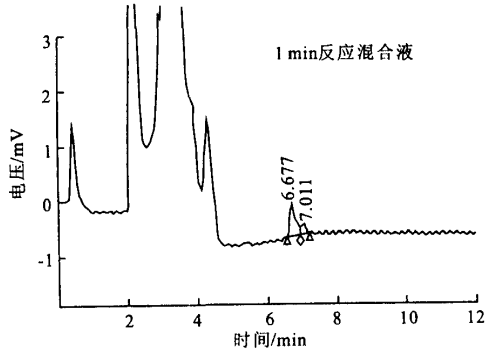
表 2 草菇 β-木糖苷酶水解产物的立体化学构象分析

Tab. 2 Stereochemical analysis of the catalytic reaction of β-xylosidase from *Volvariella volvace*

样 品	α∶β(峰高)	α∶β(峰面积)
木糖	1∶1.87	
反应时间		
1 min	1∶0.23	1∶0.23
2 min	1∶0.40	1∶0.40
5 min	1∶1.05	1∶1.05
10 min	1∶1.31	1∶1.31
煮沸反应液	1∶1.89	1∶1.89







万方数据

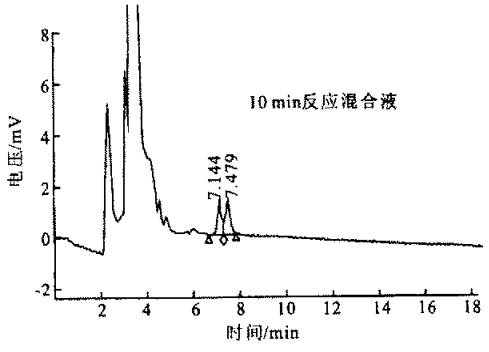


图 3　HPLC 分析 β-木糖苷酶酶促反应混合液中产物构象

Fig. 3　HPLC chromatograms of reaction mixtures containing p-NPXyl and β-xylosidase from *Volvariella volvacea*

3　讨　论

草菇中 β-木糖苷酶属于诱导酶. 在预备试验的摇瓶培养中，草菇在以木聚糖为碳源时 β-木糖苷酶的产生量要比以蔗糖或羧甲基纤维素为碳源时高得多，这一现象与文献报道一致[4]. 一般认为木聚糖降解酶系受木糖或木聚糖诱导. 用稻草作为生长基质进行发酵时很难测定细胞生长量，看上去菌丝很不明显，但是半纤维素酶包括木聚糖酶、β-木糖苷酶、β-阿拉伯糖糖苷酶等酶活非常高，其中 β-木糖苷酶的活性达到 13 U/L，比摇瓶培养高出约 100 倍，这意味着除底物诱导以外还有其它重要因素在起诱导作用，如饥饿、通气量等.

不同来源的 β-木糖苷酶性质各不相同，总的来说，细菌性木糖苷酶多属酸性酶，而真菌性的木聚糖酶多属中性或碱性酶. 草菇 β-木糖苷酶属中性酶，在 52 ℃的半衰期为 1 h，因此在生长条件下此酶的活性和稳定性应该处于最适状态. 文献中报道过的各种木糖苷酶的 K_m 值范围为 0.08～10 mmol/L[5,6] 之间，该酶的 K_m 为 2.4 mmol/L，最大反应速度为 42 μmol/(min·mg)，表明酶与底物的亲和力居中.

有些 β-木糖苷酶同时具有微弱的 α-阿拉伯糖苷酶活性，而从 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 纯化[1]并克隆的 β-木糖苷酶具有很强的 α-阿拉伯糖苷酶活性；也有的木糖苷酶能够水解对硝基苯基-α-D-木糖苷. 本研究所提纯的草菇 β-木糖苷酶只能专一性地水解对硝基苯基-β-D-木糖苷，未显示其它酶的活性，说明这个酶系统中一定有 α-阿拉伯糖苷酶存在.

糖苷酶水解产物糖环中异头碳的构象是水解酶家族分类的重要依据[8]，也是推断未知酶的作用机理的一个重要性状. 异头碳上的羟基或取代基与环在水平面上的称为 β 型，而与环面相垂直、位于环面下方的称为 α 型. 在酶促反应中，产物与底物的立体构象同型的为保持型，即 β>β，α>α；而产物与底物的立体构象相反则为反转型，即 β>α 或 α>β. 保持型的反应是通过酶的活性中心的天冬氨酸或谷氨酸侧链上的羟基与被切割基团进行反应；反转型酶的活性中心则包含了一个组氨酸残基. 草菇中的木糖苷酶属于反转型的酶，酶促反应将 β-木糖反转成 α 型的构象，据此推断其活性中心的氨基酸序列可能与其它反转型糖苷酶有同源性，这对于基因克隆所需要的探针或引物的设计具有指导意义.

参考文献：

[1] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable β- xylosidase from *Thmoanarerobacter ethanolicus* [J]. **J Bacteriol**, 1992, 174: 5848－5853.

[2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgrom quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248－254.

[3] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, *et al*. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. **Anal Chem**, 1956, 28: 350－356.

[4] Masaru M, Tsuneo Y. Purification and some properties of β-xylosidase from *Trichoderma viride*[J]. **Agri Bio chem**, 1984, 48 (7): 1845－1852.

[5] Rochelle C, Hudson Linley R. Purification and properties of an aryl β-xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*[J]. **Biochem J**, 1991. 273: 645－654.

[6] Poutanen K, J Puls. Characteristics of trichoderma reesei β-xylosidase and its use in the hydrolysis genes of solubilized xylans[J]. **App Microbiol Biltechnol**, 1988, 28: 425－432.

[7] Curtis Braun, Andreas Meinke, Lothar Ziser, *et al*. Simultaneous high-performance liguid chromatographic determination of both the cleavage pattern and the stero- chemical outcome of the hydrolysis reactions catalyzed by various glycosidase[J]. **Analytical Biochemistry**, 1993, 212: 259－262.

[8] Michael L Sinnott. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer[J]. **ChemL Rev**, 1990, 90: 1172－1202.

（责任编辑：杨　萌）

万方数据