文章编号:1009-038X(2004)05-0086-05

草菇木聚糖酶的纯化提取和酶学性质

胡沂淮[1,2]

(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. 淮阴工学院 生物工程和化学工程系,江苏 淮阴 223000)

摘 要:草菇产胞外木聚糖酶通过各级浓缩和纯化,获得接近电泳纯蛋白. 通过 SDS-PAGE 测得相对分子质量为 24 500. 木聚糖酶为糖基化修饰的蛋白,含有质量分数 20.24 % 的糖. O-糖基化能增加木聚糖酶的活性,O-和 N-糖基化都能提高木聚糖酶的稳定性. 5 min 反应,草菇木聚糖酶在 60 ℃和 pH 值 5.65 时活性最高. 在此条件下,该酶的 K_m 值为 3.87 mg/mL,V_{max} 为 1 250 IU/mg. 纯酶的稳定 pH 值为 6.54,57 ℃时半衰期为 1 h.

关键词:草菇;木聚糖酶;纯化提取;酶学性质

中图分类号:Q 556.2 文献标识码:A

Purification and Characterization of a New Xylanase form *Volvariella volvacea*

HU Yi-huai[1,2]

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Department of Biological Engineering & Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaiyin 223000, China)

Abstract: A new extracellular xylanase was purified to nearly gel electrophoretic homogeneity from the fermentation broth of the straw mushroon *Volvariella volvacea*. The molecular weight of the xylanase was determined as 24 500 by 12% SDS-PAGE. The xylanase a kind of glycoprotein containing 20.24% carbohyarates. O-linked glycosylation could enhance enzyme activity, and both N-linked and O-linked glycosylation increased enzyme stability to certain degree. Using 5 min assay, the xylanase exhibited the highest activity at 60 ℃ and pH 5.65 when oat spelt xylan was used as the substrate. Under above condition, the K_m and V_{max} values were 3.87 mg/mL and 1 250 IU/mg, respectively. When pH value was 6.54, the xylanase was most stable with a half-life of 1 h at 57 ℃.

Key words: *Volvariella volvacea*; xylanase; purification; characterization

---

木聚糖是组成半纤维素的主要成分之一,它在自然界中的含量仅次于纤维素,约占植物组织干重的 35%[1],是一种重要的可再生资源,对它的降解和利用的研究日益受到人们重视. 木聚糖的完全降解需要几种水解酶协同共同完成,其中木聚糖酶(EC 3.2.1.8)的作用是水解木聚糖 β-1,4-

收稿日期:2003-07-12; 修回日期:2004-02-24.

作者简介:胡沂淮(1970-),男,江苏淮安人,工学硕士.

万方数据

木糖苷主链.目前,人们已从许多不同的生物中发现并纯化、克隆了木聚糖酶及其基因,并对它们进行了理论和工业应用方面的研究.

草菇(*Volvariella volvacea*)是一种可食用的高等真菌,含有全套完整的纤维素和半纤维素降解酶系[2],能以草质秸秆为生长基质,这对草本木质纤维的生物转化具有重要的理论研究和经济应用价值.研究的主要目的是分离纯化草菇木聚糖酶并对其酶学性质进行研究.

1　材料与方法

1.1　菌种和培养方法

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

试管斜面接种于种子培养基(g/L)(羧甲基纤维素 5,木聚糖 5,蛋白胨 2,KH_2PO_4 0.6, $MgSO_4$ 0.5, VB_1 0.00 05)中,40 ℃,130 r/min 摇瓶培养 4 d,后将种子以体积分数 1% 接种量接种于 20 L 大罐培养基[质量分数 3% 稻草(磨碎后用 0.2 g/dL NaOH 煮沸 5 min,然后用 HCl 中和),$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/dL,NaH_2PO_4 0.5 g/dL]中,在 25 L 发酵罐搅拌通气培养 4 d.发酵罐培养过程中,定时取样,测定发酵液中蛋白质和可溶性多糖含量,以及木聚糖酶的比活力.

1.2　酶活测定方法

木聚糖酶酶活测定:用木糖作为标准.稀释后的酶液以 0.1 mL 的 0.5 g/dL 燕麦木聚糖为底物,在 60 ℃,pH 5.4 条件下先保温 5 min,然后加入 3 倍体积的对羟基苯甲酸酰肼(Sigma)试剂,沸水浴煮 10 min,冰水浴中冷却,最后用分光光度计测定 410 nm 下的吸光度[3].

一个国际单位(IU)为以 0.5 g/dL 的燕麦木聚糖为底物,每分钟产生 1 μmol 木糖所需要的酶量.

比活力为每毫克酶蛋白中含有的酶活力单位数.

1.3　蛋白质质量浓度测定

用 Bradford 法[4] 测定.以小牛血清白蛋白(Sigma)作为标准.

1.4　糖质量浓度测定

用苯酚-硫酸法[5] 测定.以葡萄糖作为标准.

1.5　酶的分离纯化

所有纯化步骤都加入质量浓度 0.02 g/dL 叠氮化钠以防杂菌污染,苯甲磺酰氟(0.1 mg/mL)防止蛋白质的降解.

1.5.1　硫酸铵沉淀　草菇木聚糖酶为胞外分泌蛋白,收集过滤后澄清的发酵液,以 80% 的硫酸铵饱和度在冰水浴中沉淀发酵液中的蛋白质.5 000 r/min 离心 10 min,留沉淀.

1.5.2　Phenyl-Agarose (Sigma)疏水柱(2.5 cm × 23 cm)层析　样品:将沉淀溶于含 0.75 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 pH 值 6.8 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液中.缓冲液:A 缓冲液:pH 值 6.8 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 + 1 mol/L $(NH_4)_2SO_4$.B 缓冲液:pH 值 6.8 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液.洗脱条件:B 缓冲液体积分数 25% ~ 100%,体积流量 1.5 mL/min,洗脱体积 800 mL.收集活性部分并用 80% 的硫酸铵饱和度沉淀.

1.5.3　DEAE-Sephacel (Sigma) (2.5 cm × 20 cm)阴离子交换层析　样品:将沉淀溶于 50 mmol/L pH 值 6.8 的磷酸钾缓冲液中,并在冰水浴中透析过夜.缓冲液:A 缓冲液:50 mmol/L pH 值 6.8 的磷酸钾缓冲液.B 缓冲液:pH 值 6.8 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 + 0.5 mol/L NaCl.洗脱条件:B 缓冲液体积分数 0 ~ 100%,体积流量 2 mL/min,洗脱体积 360 mL.收集活性部分并用 80% 的硫酸铵饱和度沉淀.

1.5.4　凝胶过滤层析 SOTOHAAS HW-55S (Tosoh)(1.6 cm × 96 cm)　样品:沉淀用 25 mmol/L pH 值 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解.缓冲液:0.2 mol/L NaCl + 50 mmol/L pH 值 5.5 邻苯二甲酸氢钾缓冲液.洗脱条件:体积流量 0.5 mL/min,洗脱体积 960 mL.CM-Agarose (Pharmacia)(1 cm × 16 cm)阳离子交换层析.样品:收集的活性部分用 50 mmol/L pH 值 5.5 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液冰浴透析.缓冲液:A 缓冲液:25 mmol/L pH 值 5.86 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液.B 缓冲液:25 mmol/L pH 5.86 邻苯二甲酸氢钾缓冲液 + 1 mol/L NaCl.洗脱条件:B 缓冲液体积分数 0 ~ 100%,体积流量 3 mL/min,洗脱体积 240 mL.

1.5.5　羟基磷灰石层析 Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (2.5 cm × 45 cm)　样品:用聚乙二醇浓缩收集的活性部分.缓冲液:A 缓冲液:1 mmol/L NaCl.B 缓冲液:1 mol/L NaCl.C 缓冲液:5 mmol/L $MgCl_2$.D 缓冲液:25 mmol/L pH 值 5.8 磷酸钾缓冲液.E 缓冲液:0.3 mol/L pH 值 5.8 磷酸钾缓冲液.洗脱条件:A 缓冲液平衡.C 缓冲液体积分数 20% ~ 100%,体积流量 0.5 mL/min,洗脱体积 80 mL.B 缓冲液 1% ~ 100%,体积流量 0.5 mL/min,洗脱体积 80 mL.E 缓冲液体积分数 33% ~ 100%,体积流量 0.5 mL/min,洗脱体积 80

万方数据

mL.

1.5.6 CM-Agarose (Pharmacia) (1 cm × 16cm) 阳离子交换层析 样品:用聚乙二醇浓缩收集的活性部分并于冰浴中透析. 缓冲液:A 缓冲液:50 mmol/L pH 值 5.0 柠檬酸缓冲液. B 缓冲液:50 mmol/L pH 值 6.6 柠檬酸缓冲液. 洗脱条件:B 缓冲液体积分数 0 ~ 100%,体积流量 3 mL/min,洗脱体积 240 mL.

1.5.7 HPLC TSK-GEL® G3000SWXL (Tosoh) (0.78 cm × 30 cm) 样品:用聚乙二醇浓缩收集的活性部分,在 Amicon Centricon 中用去离子水超滤浓缩液,所得的样品冷冻真空干燥,后用 20 μL 含有体积分数为 0.1% Triton X-100 和 0.2 mol/L NaCl 的 25 mmol/L pH 值 6.6 磷酸钾缓冲液溶解. 缓冲液:25 mmol/L pH 值 6.6 磷酸钾缓冲液 + 体积分数 0.1% Triton X-100 + 0.2 mol/L NaCl. 洗脱条件:体积流量 0.2 mL/min,洗脱体积 45 mL. 收集活性部分,所得的样品冷冻真空干燥.

1.6 酶的性质分析方法

1.6.1 相对分子质量的测定 酶相对分子质量用 12 g/dL 的 SDS-PAGE 在 150 V 电压下电泳测定,胶厚 0.75 mm. 标准蛋白从 Promega 公司购得.

1.6.2 酶的最佳反应条件的测定 最适反应温度为以 0.1 mol/L pH 值 5.4 的邻苯二甲酸氢钾-咪唑溶液为缓冲液,在 30 ~ 75 ℃ 范围内,每隔 5 ℃ 测定酶活力最高时的温度.

最适反应 pH 值为以 0.1 mol/L 的邻苯二甲酸氢钾-咪唑溶液为缓冲液,在 60 ℃ 时,不同的 pH 值条件下测定酶活力最高时的 pH 值.

1.6.3 酶的稳定性分析 以未保温酶的活性为对照,测定酶在不同 pH 值的 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液中 60 ℃ 保温 30 min 后的残余活性,得到酶相对稳定的 pH 值范围.

以未保温酶的活性为对照,在相对稳定的 pH 值下,在不同的温度下保温不同的时间后,测定酶的残余活性,从而得到不同温度下酶活力的半衰期. 为了方便与不同来源的酶进行比较,以半衰期为 1 h 的温度表示酶的稳定性.

1.6.4 酶的动力学研究 以不同质量浓度的燕麦木聚糖为底物和 0.1 mol/L, pH 值 6.2 邻苯二甲酸氢钾-咪唑溶液为缓冲液,按 Hanes 作图法计算 K_m 和 V_{max} 值.

1.6.5 糖基化对酶活性和稳定性的影响 在 20 μL 的体系中加入纯化的木聚糖酶 10 μg,pH 值 5.0 邻苯二甲酸氢钾缓冲液至 50 mmol/L,不加入(对照)或加入 0.02 IU α-N-乙酰半乳糖胺酶(切除 O-糖基化修饰)或/和 0.02 IU β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶(切除 N-糖基化修饰)(Sigma),置 30 ℃ 水浴 1 h 后转入冰水浴. 比较不同处理中木聚糖酶的活性和稳定性.

2 结果与分析

2.1 草菇培养过程中发酵液和酶活的变化

定期测定发酵液中的蛋白,可溶性多糖和木聚糖酶的比活力的变化,以木聚糖酶的比活力的变化为标准,确定发酵中止时间,在 94 h 停止发酵(见图 1).

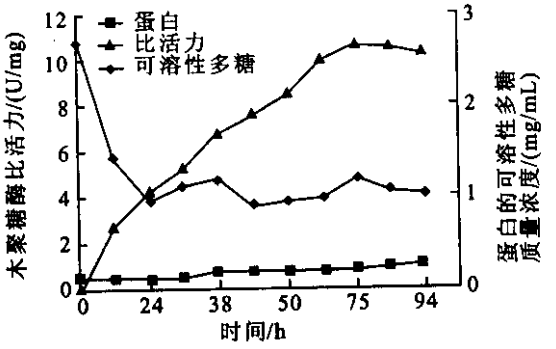


图 1 发酵液和酶活的变化

Fig. 1 Changes of fermentation broth and enzyme activity

2.2 酶的分离纯化

草菇的木聚糖酶为胞外分泌蛋白,发酵后收集发酵液. 由于体积较大,故先用硫酸铵沉淀浓缩,并调整样品中的 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度至 0.75 mol/L 后,将其注入 Phenyl-Agarose 疏水柱层析,木聚糖酶活性部分主要集中在上样流过液,洗柱液和洗脱液的前部. DEAE-Sephacel 阴离子交换层析,木聚糖酶出现在洗脱液的前部. 凝胶过滤层析,木聚糖酶出现在洗脱液的后部. CM-Agarose 阳离子交换层析,采用盐质量浓度梯度洗脱,木聚糖酶没有结合在 CM-Agarose 柱上,它全部在上样流过液和洗柱液中. 羟基磷灰石层析,木聚糖酶活性部分全部集中在 NaCl 线性梯度洗脱液中,该酶可能为中性蛋白. CM-Agarose 阳离子交换层析,采用 pH 值线性梯度洗脱,木聚糖酶没有结合在 CM-Agarose 柱上,但利用该步骤,大部分剩余杂蛋白可结合在 CM-Agarose 柱上并将它们去除. 利用 HPLC,剩余的微量杂蛋白可以去除. 收集活性部分,经过 12 g/dL SDS 变性胶凝胶电泳,证明得到了接近电泳纯的草菇木聚糖酶.

通过上述主要步骤,草菇木聚糖酶的纯化结果见表 1.

万方数据

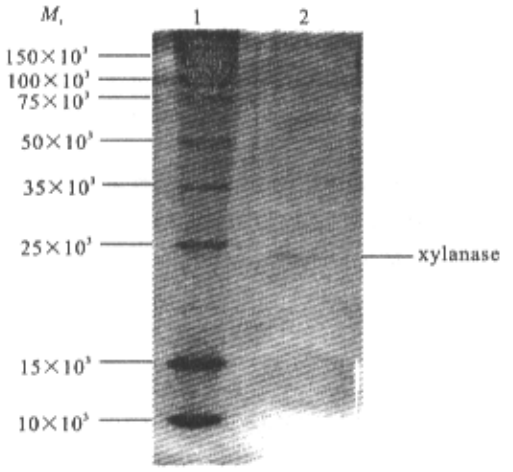
表 1　草菇木聚糖酶的纯化结果

Tab. 1　Summary of xylanase 's purification

步 骤	总蛋白质量/ mg	总酶活力/ IU	比活力/ (IU/mg)	纯化 倍数	得率/ %
发酵液	10555.1	10705	1.01	1	100
硫酸铵沉淀	4823.1	8315.6	1.72	1.7	77.7
Phenyl-Agarose 疏水柱层析	72.1	1353.1	18.76	18.5	12.6
DEAE-Sephacel 阴离子交换层析	59.7	1175.4	19.68	19.4	11
凝胶过滤层析	21.7	694.8	32.05	31.6	6.5
CM-Agarose 阳离子交换层析	16.1	569.5	35.3	34.8	5.3
羟基磷灰石层析	2.4	132.7	54.56	53.8	1.2
CM-Agarose 阳离子交换层析	1.5	96.3	66.02	65.1	0.9
HPLC	0.2	81.3	406.5	402.5	0.76

2.3　相对分子质量

经过 12% SDS 变性胶凝胶电泳,测得相对分子质量为 24 500. 见图 2.



1 :SDS-PAGE 标准分子量蛋白 ;2 :木聚糖酶

图 2　SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2　SDS-PAGE

2.4　酶的反应动力学和稳定性

经过 5 min 反应,草菇木聚糖酶在 60 ℃ 和 pH 值 5.65 时酶活最高(见图 3). 在此条件下,酶的 K_m 为 3.87 mg/mL 燕麦木聚糖,V_m 为 1 250 IU/mg. 纯酶的稳定 pH 值为 6.54,在 57 ℃ 时保温 1 h,还有 50% 的活性(见图 4).

2.5　糖的含量和糖基化对酶活的影响

木聚糖酶为糖基化修饰的蛋白,含有质量分数 20.24% 的糖. 酶的糖基化修饰对酶的活性和稳定性具有一定的影响作用(见图 5). O-糖基键的分解降低了木聚糖酶的活性,而 N-糖基化对酶活没有影响. 但 O-和 N-糖基化的切除都在不同程度上都降低了木聚糖酶的稳定性.

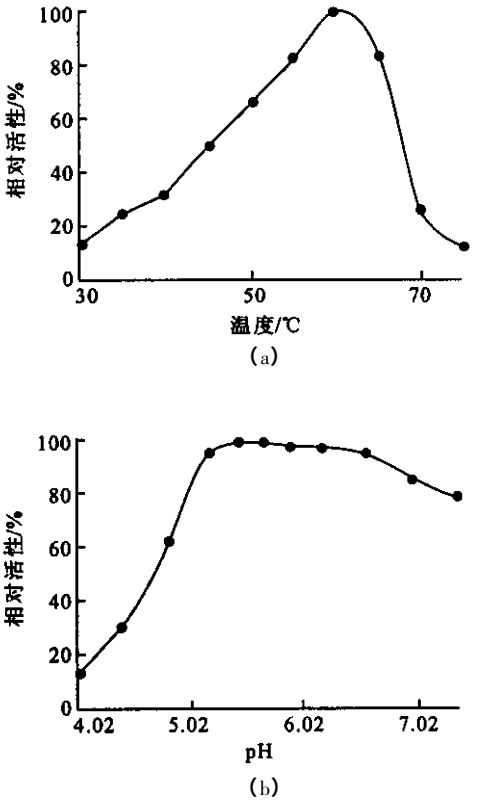
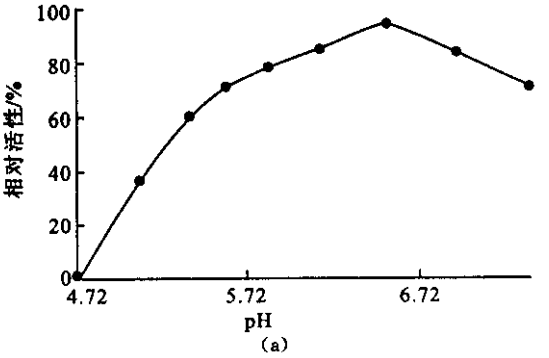
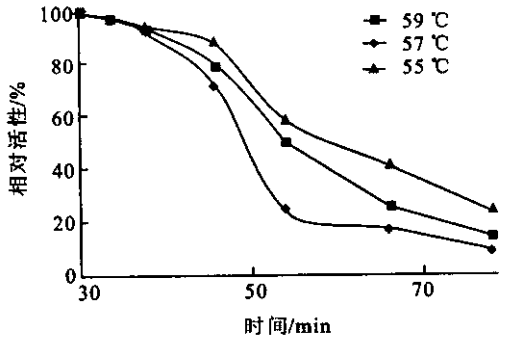


图 3　不同温度和 pH 值对酶活的影响

Fig. 3　Effect of temperature and pH on xylanase activity



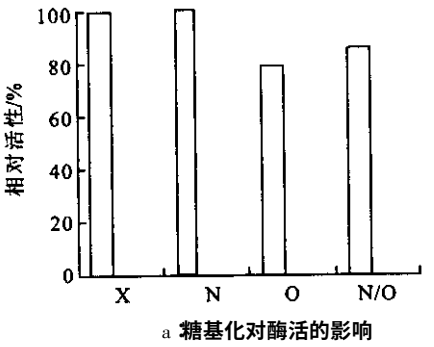
万方数据



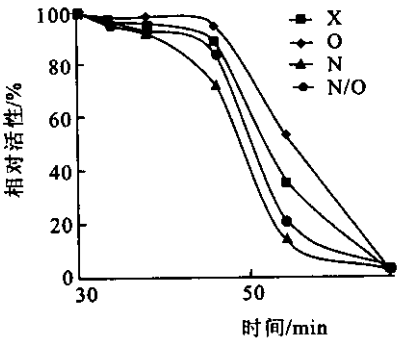
(b)

图 4 不同 pH 和温度对酶的稳定性影响

Fig. 4 Effect of pH and temperature on xylanase stability



a 糖基化对酶活的影响



b 糖基化对酶的稳定性影响

X:为未处理的木聚糖酶;N:为 β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶处理的木聚糖酶;O:为 α-N-乙酰半乳糖胺酶处理的木聚糖酶;N/O:为 β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶和 α-N-乙酰半乳糖胺酶同时处理的木聚糖酶

图 5 酶的糖基化修饰对酶的活性和稳定性影响

Fig. 5 Effect of glycosylation on xylanase activity and stability

3 结 论

通过 SDS-PAGE 测得草菇木聚糖酶相对分子质量为 24 500. 木聚糖酶为糖基化修饰的蛋白,含有质量分数 20.24% 的糖. O-糖基化能增加木聚糖酶的活性,而 N-糖基化对酶活没有影响. 但 O-和 N-糖基化都能提高木聚糖酶的稳定性. 草菇木聚糖酶在 60 ℃ 和 pH 值 5.65 时酶活最高. 在此条件下,该酶的 K_m 为 3.87 mg/mL 燕麦木聚糖,V_m 为 1 250 IU/mg. 纯化后的酶的稳定 pH 值为 6.54,在 57 ℃ 时保温 1 h,还有 50% 的活性.

参考文献:

[1] Dekker R F H. Biodegradation of the hetero-1,4-linked xylans[A]. Lewis N G, Paice M G. Plant Cell Wall Polymers[C]. Washington, D. C: American Chemical Society, 1989. 619-629.

[2] Cai Y J, Buswell A, Chang S T. Cellulases and hemicellulases of *Volvariella volvacea* and the effect of Tween 80 on enzyme production[J]. **Mycol Res**, 1994, 98: 1019 – 1024

[3] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. **Anal Biochem**, 1972, 47: 273.

[4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgrom quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248 – 254.

[5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al*. Coloimetric methed for determination of sugars and related substances[J]. **Anal Chem**, 1956, 28: 350 – 356.

(责任编辑 杨 萌)

万方数据