

一种来源于 *Leifsonia shinshuensis* DICP 16 菌体的 β -D-木糖苷酶的分离纯化及其性质

栾宏伟^{1,2}, 胡莹^{1,2}, 刘兴宝¹, 郝大程^{1,2}, 杨凌¹

1 中国科学院大连化学物理研究所药用资源开发组, 大连 116023

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 采用盐析、DE 52、Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、Toyopearl Butyl 650C 疏水层析以及 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析联用的方法, 从 *Leifsonia shinshuensis* DICP 16 菌体中纯化出一种 β -木糖苷酶。分离后该酶在 SDS-PAGE 上呈单一蛋白质条带, 通过 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法, 测得该酶是一个由两个分子量约为 91 kD 的相同亚基组成的同源二聚体。其水解对硝基苯酚木糖苷(pNPX)的最适反应温度为 55°C, pH 值为 7.0。该木糖苷酶在 45°C 以下, pH 6.0~11.0 之间具有很好的稳定性。在 45°C, pH 值为 7.0 的条件下, 水解 pNPX 的 K_m , V_{max} 分别为 1.04 mmol/L, 0.095 mmol/(min·mg)。研究不同的金属离子对该酶的活性影响, 发现 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 是很强的抑制剂。通过对天然木糖苷化合物的水解测试, 发现该酶可以水解人参皂苷 Rb₃ 的木糖基, 产生人参皂苷 Rd, 却不能水解紫杉烷木糖苷的木糖基。

关键词: *Leifsonia shinshuensis*, β -木糖苷酶, 人参皂甙 Rb₃, 分离纯化

Purification and Characterization of a β -D-xylosidase from *Leifsonia shinshuensis* DICP 16

Hongwei Luan^{1,2}, Ying Hu^{1,2}, Xingbao Liu¹, Dacheng Hao^{1,2}, and Ling Yang¹

1 Laboratory of Pharmaceutical Resource Discovery, Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: A β -D-xylosidase from *Leifsonia shinshuensis* DICP 16 was purified to apparent homogeneity using a combination of ammonium sulfate precipitation, DE 52 anion-exchange, Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange, Toyopearl Butyl 650C hydrophobic-interaction and Sephacryl S-300 HR gel-permeation chromatography. The purified xylosidase consisted of two same subunits and had the relative molecular weight of 180 kD as determined by SDS-PAGE and gel-permeation chromatography. The maximal β -D-xylosidase activity occurred at 55°C and pH 7.0. It was stable at 45°C and retained its original activity for 60 min. The stability declined rapidly when the temperature rose above 55°C. The xylosidase was stable in the pH range from 6.0 to 11.0 for 20 h. At pH 7.0 and 45°C the K_m for *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (*p*NPX) was 1.04 mmol/L and the V_{max} was 0.095 mmol nitrophenol/min/mg xylosidase. The enzyme was inhibited strongly by Fe^{2+} and Cu^{2+} . It exhibited low levels of activity against other artificial substrates, compared to its activity against *p*NPX. When different natural xylosides were used as the substrates, the xylosidase showed distinct hydrolysis ability. It could hydrolyze 20-C, β -(1→6)-xyloside of ginsenoside Rb₃ (G-Rb₃) into ginsenoside Rd, but did not hydrolyze the other β -D-glucosidic bonds of G-Rb₃. Additionally, the xylosidase could not hydrolyze C-7 xylosyl-bearing taxanes.

Received: October 12, 2007; **Accepted:** December 10, 2007

Supported by: the "973" Program from Ministry of Science and Technology of China (No. 2003CB716005).

Corresponding author: Ling Yang. Tel: +86-411-84379317; Fax: +86-411-84676961; E-mail: yling@dicp.ac.cn

科技部 "973" 项目基金(No. 2003CB716005)资助。

Keywords: *Leifsonia shinshuensis*, β -D-xylosidase, ginsenoside Rb₃, purification

β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)是一类可以将木寡糖(如木二糖, 木三糖等)水解为木糖的生物催化剂^[1], 其与木聚糖酶协同作用, 可将木聚糖彻底分解, 是木聚糖降解的关键酶之一, 已在能源, 造纸等多个领域具有广泛应用^[2,3]。

另外, 这类酶在医药工业的应用前景也越来越引起人们的广泛关注。例如自然界中一些具有药用价值的萜类和甾体类化合物是以木糖苷的形式存在, 在 β -木糖苷酶的作用下, 这些化合物可以温和的脱去木糖基, 释放出具有药效活性的甙元部分, 例如人参皂甙 Rb₃ 和紫杉烷木糖苷, 通过去除木糖基分别可以产生具有活性的人参皂甙 Rd 和抗癌药物紫杉醇或其半合成前体。近年来国外对 β -木糖苷酶的研究已日趋深入, 而国内相关研究仍然报道甚少。虽然目前已从细菌、放线菌和真菌(包括酵母)等微生物和高等植物中分离得到多种 β -木糖苷酶^[4], 但是将其应用于天然木糖苷的生物转化的报道却很少, 由于这些天然木糖苷都具有结构大, 疏水性较强的特点, 不同于木糖苷酶的天然底物, 如木寡糖等, 因此需要对木糖苷酶水解这类物质的能力进行重新评价。

Leifsonia shinshuensis 菌属于放线菌目, 微杆菌科, 迄今为止并未见其产木糖苷酶的报道。最近, 我们从大连化物所土壤中分离到一株木糖苷酶高产菌株, 经鉴定为 *L. shinshuensis* 菌。本文从该菌菌体中分离纯化出一个胞内木糖苷酶, 并报道了其理化性质, 同时对该木糖苷酶水解上述两种重要的天然木糖苷类化合物的能力进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

木糖苷酶高产菌株由本实验室从大连化物所土壤中分离筛选得到。经鉴定并命名为 *Leifsonia shinshuensis* DICP 16, 已保存到中国典型培养物保藏中心, 保藏号: M 206026。

1.2 方 法

1.2.1 酶液制备

接种适量的 *L. shinshuensis* 菌悬液于产酶培养基中(桦木木聚糖 1%, 酵母浸膏 0.2%, 蛋白胨 0.2%, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.001% NaCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.001%

MnSO₄·4H₂O), pH 7.0, 30°C, 150 r/min 培养 104 h。发酵培养物在 4°C 下 8000 r/min 离心 15 min, 收集菌体。菌体用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液(缓冲液 A)洗 2 遍后, 再重新悬浮在缓冲液 A 中(含 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA), 于冰浴中进行超声破壁。15 000 r/min 离心 15 min 去除细胞及碎片, 上清液作为粗酶液进行下面的层析操作。

1.2.2 酶的分离纯化

将 350 mL 粗酶液在冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 50%饱和度, 8000 r/min 离心 30 min 后取上清液继续加入硫酸铵至 60%的饱和度, 再次离心后收集沉淀, 重新溶于 30 mL 缓冲液 A 中, 并用相同的缓冲溶液彻底透析脱盐。将上述经透析脱盐后的酶液, 高速离心后, 上清液加到已用缓冲液 A 平衡的 DE 52(Φ 2.6 cm \times 15 cm)阴离子交换柱上, 先用 100 mL 0.1 mol/L NaCl 洗掉无活性部分, 然后再用 600 mL 0.1~0.4 mol/L 的 NaCl 进行线性梯度洗脱。含酶组分(95 mL)合并后用缓冲液 A 稀释到 200 mL, 再上 Q Sepharose Fast Flow (1.6 cm \times 15 cm)阴离子交换柱, 用 0.25~0.55 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 活性组分加入固体硫酸铵至 1.0 mol/L 的浓度, 然后采用 Toyopearl Butyl 650C (Φ 1.0 cm \times 10 cm)疏水相互作用柱进行分离, 使用 1.0~0 mol/L 的硫酸铵溶液进行梯度洗脱, 活性组分合并, 并用 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 的缓冲液(缓冲液 B)彻底透析脱盐后冻干, 溶解在 3 mL 缓冲液 B 中, 上样到 Sephacryl S-300 HR(Φ 1.6 cm \times 70 cm)凝胶过滤柱。用缓冲液 B 进行洗脱, 收集有酶活性部分, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度。

1.2.3 酶活性检测

以对硝基苯酚木糖苷(pNPX)为底物检测酶活性, 反应体系 300 μ L, 其中含 150 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液 270 μ L, 10 mmol/L pNPX 10 μ L, 酶样品 20 μ L。45°C 反应 10 min 后加入 1.5 mL 0.25 mol/L NaOH 终止反应, 测定 405 nm 下的吸光值。单位时间内释放 1 μ mol 硝基苯酚的酶量定义为一个活力单位。

1.2.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[5], 以牛血清白蛋白制作标准曲线对蛋白浓度进行定量。

1.2.5 电泳及分子量测定

分子量测定采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法和凝胶过滤层析法进行。SDS-PAGE 方法依照 Laemmli^[6] 进行, 采用 Bio-Rad 公司 Mini-Protean III dual-slab cell 电泳系统, 分子量标准为 HMW-SDS Marker Kit(Pharmacia), 考马斯亮蓝染色。凝胶过滤层析填料为 Sephacryl S-300 HR, 蛋白标准曲线根据牛甲状腺球蛋白(669 kD), 过氧化氢酶(250 kD), 牛血清白蛋白(66 kD), 卵清蛋白(44 kD), 细胞色素 C(12 kD) 绘制。活性染色在 7.5%的天然 PAGE 上进行, 使用 0.1% 4-甲基伞形木糖苷作为底物。

1.2.6 de novo 测序与数据库搜索

(1) 酶切实验: 将电泳并染色后的单一木糖酶条带, 切成小条($<1\text{ mm}^2$), 用 500 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液洗胶, 涡漩震荡 1 h 后弃去, 再加入约 100 μL 的 50%乙腈/25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 涡漩振荡 10 min, 弃上清。重复两次后, 加入约 100 μL 乙腈, 涡漩振荡 10 min, 弃上清。离心真空干燥至干。再用 20 μL Trypsin 溶液重新溶胀胶。4 $^\circ\text{C}$ 冰浴孵育 30 min 后, 加入 20 μL 的 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 过夜孵育。孵育后的样品进行 HPLC-ESI-MS/MS 分析。

(2) HPLC-ESI-MS/MS 实验及 de novo 测序: Capillary LC-ESI-MS/MS 实验在 ThermoFinnigan 公司 LTQ 仪器上进行, 包括 Surveyor 液相色谱部分和线性离子阱质谱仪两部分。Surveyor 液相色谱部分主要由脱气装置、MS 泵和自动进样器以及自填装内径 150 μm , 外径 375 μm , 长度为 120 mm 的反相 5 μm ODS 毛细管液相色谱柱组成。线性离子阱质谱仪配备了一个 Microspray 的电喷雾系统, 加热毛细管的温度为 200 $^\circ\text{C}$, ESI 喷针所加电压为 3.0 kV, 归一化碰撞能量为 35.0%。分离使用的溶液 A 为 0.1% 甲酸, B 为含 0.1%甲酸的乙腈, 洗脱条件为: 0~120 min, 5%~35%的 B; 120~135 min, 80%~80%的 B, 流速为 200 nL/min。

质谱数据上传至 <http://www.bioinformatics.solutions.com/products/peaks/> 进行 de novo 测序^[7], 同时与 NCBI nr 数据库进行比对, 得到与已知木糖苷酶可能相同的肽段信息。

1.2.7 动力学参数的测定

以不同浓度的 pNPX 为底物在 β -木糖苷酶的线

性反应范围内, 按 Lineweaver-Burk^[8] 双倒数曲线求得 K_m 和 V_{\max} 值。

1.2.8 天然木糖苷类化合物的水解实验

人参皂甙 Rb₃ 的水解: 取 10 μL 酶溶液和 10 μL Rb₃(80 nmol) 加入到 30 μL 200 mmol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液, 40 $^\circ\text{C}$ 孵育 90 min 后加入 200 μL 的甲醇。10 000 r/min 离心 5 min, 取上清进液相测定。HPLC 方法参照文献^[9], 产物人参皂甙 Rd 的量通过峰面积进行计算。

7-木糖-10-去乙酰紫杉醇(10DAXT)的水解: 取酶液 80 μL 和 20 μL 10DAXT (83 nmol) 加入到 100 μL 200 mmol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液, 40 $^\circ\text{C}$ 反应 90 min, 加入 800 μL 甲醇, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清进液相测定。色谱条件: 色谱柱为反相 C18 柱($\Phi 4.6\text{ mm} \times 20\text{ cm}$); 检测波长: 227 nm; 流速: 1 mL/min; 流动相条件: 0~15 min, 70%~30%水, 30%~70%乙腈, 15~22 min, 0%~0%水, 100%~100%乙腈, 22~30 min, 70%~70%水, 30%~30%乙腈。

2 结果

2.1 木糖酶的分离纯化

L.shinshuensis 菌木糖苷酶经过硫酸铵沉淀, DE52, Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析, Toyopearl Butyl 650C 疏水层析以及 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析等纯化步骤后, 木糖苷酶纯化了 519 倍, 活性回收率为 29%(纯化结果见表 1)。变性和非变性凝胶电泳显示纯化后的木糖苷酶为单一条带(图 1), 并且非变性电泳后活性染色条带与考马斯亮蓝染色的条带迁移位置相同(图 1b), 说明该木糖苷酶已经为电泳纯。通过与标准分子量蛋白对照进行对比, 分子量为 91 kD, 而凝胶过滤层析法显示的结果为 180 kD(结果未显示)。以上结果表明, 该木糖苷酶是一个含两个相同亚基的二聚体, 分子量约为 180 kD。另外, 粗酶液活性染色条带只有一条, 且迁移率和纯酶的条带相同, 说明在 *L.shinshuensis* 菌体中只存在一种木糖苷酶的形式。

2.2 *L.shinshuensis* 菌木糖苷酶的最适温度和温度稳定性

在 20 $^\circ\text{C}$ ~70 $^\circ\text{C}$ 下分别测定木糖苷酶的活力, 结果见图 2, 木糖苷酶作用的最适温度为 55 $^\circ\text{C}$, 当温度高于 55 $^\circ\text{C}$ 时酶活性迅速降低, 60 $^\circ\text{C}$ 时的酶活性仅

为 55°C 时的 30%。温度稳定性实验是将木糖苷酶在不同温度(20°C~70°C)下保温 60 min, 然后测定残留酶活力。如图 2 所示, 此木糖苷酶在 45°C 以下较稳定, 经过孵育后, 活性基本无损失, 超过此温度, 酶

活性急剧下降。在 55°C 下处理 60 min 后, 木糖苷酶基本无活力残留, 由于 45°C 时显示了酶最高活力的 70%, 且条件相对温和, 所以在酶活性测定及其他研究中采用 45°C。

表 1 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶的纯化
Table 1 Purification of *L. shinshuensis* xylosidase

Purification steps	Total protein/mg	Total activity/u	Specific activity/(u/mg)	Yield/%	Purification fold
Crude enzyme	645.76	125.44	0.19	100	1.0
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	121.30	86.57	0.71	69.0	3.7
DE-52	22.67	52.06	2.30	41.5	12.1
Q-Sepharose Fast Flow	4.75	47.15	9.93	37.6	52.3
Toyopearl Butyl 650C	1.496	40.09	26.80	32.0	141.0
Sephacryl S-300 HR	0.369	36.36	98.60	29.0	518.9

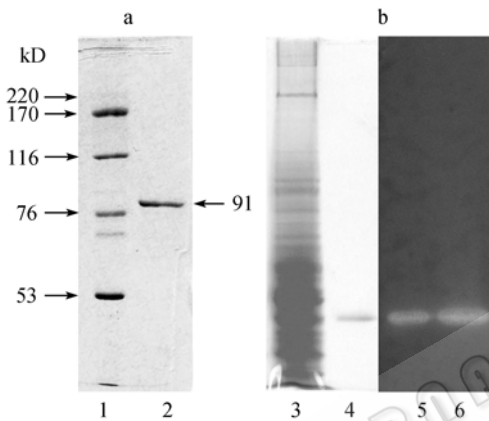


图 1 木糖苷酶的凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of xylosidase
(a) SDS-PAGE. (b) Non-denatured PAGE.

1: molecular weight marker; 2: purified enzyme. 3: crude enzyme with Coomassie Blue staining; 4: purified enzyme with Coomassie Blue staining; 5: purified enzyme with activity staining; 6: crude enzyme with activity staining

2.3 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶的最适 pH 和 pH 稳定性

在 pH 4.0~11.0 的缓冲液中测定木糖苷酶的酶活力, 结果见图 3。该酶作用的最适 pH 为 7.0, 在 pH 4.0~11.0 之间活性保留呈钟型曲线。pH 稳定性实验是在 30°C 下, 分别在不同 pH 3.0~12.0 下孵育 20 h 后测定残余酶活性。结果如图 3 所示, 该酶在 pH 6.0~10.0 的范围内保持性质稳定, 当 pH 达到 11.0 时, 仍然保持了 75% 以上的活性, 说明其碱性条件下稳定性较好, 但在 pH 5.0 下, 酶活性仅保留了原始活性的 40%。

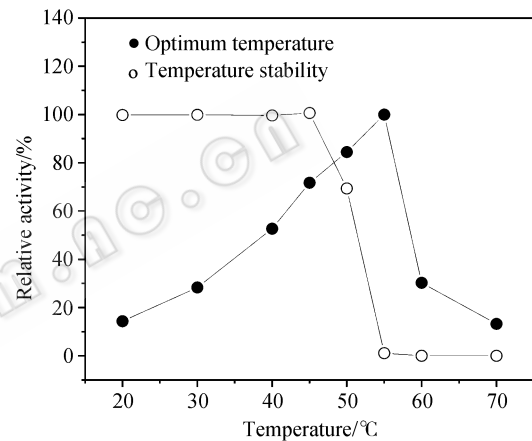


图 2 温度对木糖苷酶活力和稳定性的影响

Fig. 2 Effects of temperature on xylosidase activity and stability

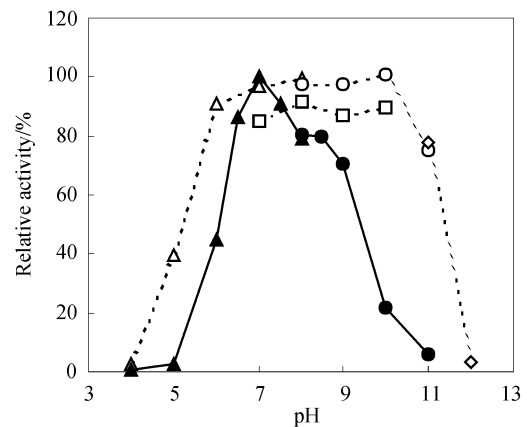


图 3 pH 对木糖苷酶活力(—)和稳定性(···)的影响

Fig. 3 Effects of pH on xylosidase activity (—) and stability (···)
The buffers used for pH 4~8 were 100 mmol/L Na₂HPO₄-citrate (▲, △), for pH 7~10 was 100 mmol/L Tris-HCl (□), for pH 8~11 was 100 mmol/L glycine-NaOH (●, ○) and 11~12 was 100 mmol/L Na₂HPO₄-NaOH (◇)

2.4 不同浓度甲醇对 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶活性的影响

不同浓度甲醇对木糖苷酶活性的影响结果见图 4。在 2%~20% 的甲醇溶液下, 木糖苷酶的活性随着甲醇浓度的升高而逐渐降低。当甲醇浓度为 5% 时, 酶活性保持在 80% 左右, 当甲醇浓度达到 20% 时, 酶活性仅有原始活性的 40%。

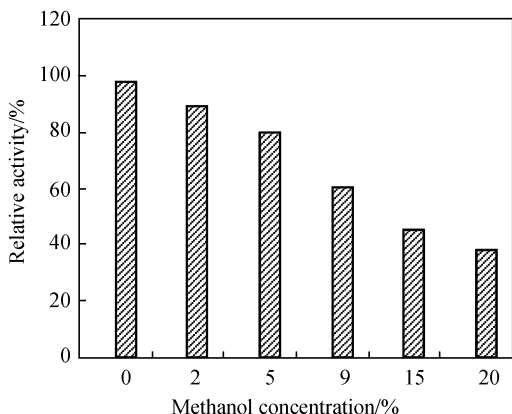


图 4 甲醇对酶活性的影响
Fig. 4 Effect of methanol on xylosidase

2.5 不同二价金属离子、EDTA 以及 SDS 对木糖苷酶活性的影响

向纯化后的木糖苷酶酶液中分别加入不同的二价金属盐离子、SDS 以及 EDTA, 使其终浓度为 1 mmol/L。同时以不加金属离子的酶液作为对照, 测定木糖苷酶的活性, 结果如图 5 所示。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能提高木糖苷酶的活力, 但激活作用不明显, 分别只达到 108% 和 113%。而 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 对该木糖苷酶有不同程度的抑制作用, 尤其是 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} , 在 1 mmol/L 的存在浓度下, 酶活性仅保留 1% 和 22%。SDS 和 EDTA 对 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶有微弱的激活作用, 活性分别达到对照的 123% 和 114%。

2.6 底物特异性

该木糖苷酶对 6 种不同人工糖苷类化合物的水解结果见表 2。可以看出该酶对 β-D-木糖苷底物具有很高的特异性, 而对其他糖苷类化合物基本无水解活性。

2.7 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶水解 pNPX 动力学参数的测定

以 Lineweaver-Burk 双倒数做图法, 求得以 pNPX 为底物的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 1.04 mmol/L 和 0.095 mmol/(min·mg)。

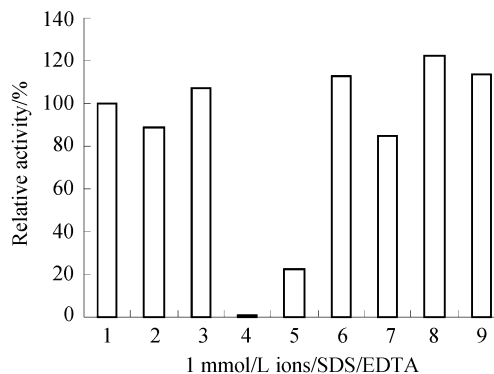


图 5 不同金属离子以及 SDS、EDTA 对木糖苷酶活性的影响

Fig. 5 Effect of various cations, SDS and EDTA on xylosidase activity
1: control; 2: Mn^{2+} ; 3: Mg^{2+} ; 4: Cu^{2+} ; 5: Fe^{2+} ; 6: Ca^{2+} ; 7: Zn^{2+} ; 8: SDS; 9: EDTA

表 2 木糖苷酶水解不同糖苷化合物的底物特异性
Table 2 Substrate specificity of xylosidase to various glycosidases

Substrates	Relative activity %
pNP-β-D-xylopyranoside	100
pNP-β-D-galactopyranoside	0.36
pNP-β-D-fucopyranoside	0.02
pNP-β-D-mannopyranoside	0.19
pNP-α-D-xylopyranoside	0.34
pNP-β-D-glucopyranoside	0.21

2.8 de novo 测序及同数据库比较结果

将电泳后的木糖苷酶条带酶切后进行 HPLC-ESI-MS/MS 检测, 使用 PEAKS 软件进行 de novo 测序, 结果经与 NCBI nr 数据库进行比对后发现, 该木糖苷与来自于 *Streptomyces* sp. CH7 的木糖苷酶序列有最高的相似性(coverage: 35%), 具体结果见图 6。

```

1  MNADV AAESP SAPSL WNDPT APVAA RVDAL IDAMT LQEK T AQLVG AWAGA
51  SDEGG EVAPH QHEME EPVDL DALLP HGLGQ LTRPF GTVPV DPALG ALSLA
101 RTQAR IAASN RFGIP ALAHD ECLAG FAAWG ATAYP VPLSW GAAFD PGLVR
151 RMAAA IGRDM RAVGV HQGLA PVLDV VRDVR WGRVE ETIGE DPYLV GTIGT
201 AVYQG LESAG IVATL KHFAG YSASR AGRNL APVSM GPRER ADVVL PPFEM
251 AVREG GARSV MNAYT DTDGV PSAAD ENLLT GLLRD TWGFD GTVVA DYFAV
301 AFLAT LHGVA ADWAD AAGTA LHAGI DVELP NVKTY GAPLT EAVAD GRVPE
351 ELVDR ALRRV LTQKV TLGLL DPDWD PVPAA LDGTD PADPE ALRGR VDLDS
401 PGNRA LARTL AEEAV VLLAN DGTLP LDRPR RIALI GPNAD EPTAV LGCYS
451 FPQHI GVQHP GTPLG IALPT LRETL ATEFP DAAVT YVRGT GVDDG DLTGL
501 DEAVR AAREA DTVVA VLGDR AGLFC RGTSG EGCYA ETLEL PGAQQ QL LDA
551 LLD SG TPVVT VLLAG RPYAL GRAVT ESAAI VQSFF PGEEG THAIA GVLSG
601 RVNPS GRLPV GVPRT PGLQP GTYLG ARLAH AGDAS AVDPA PAFPF GHGLS
651 YTRFD WDTLT ADTQE APTDG EFILA LTVRN KGDRP GTEVV QLYLH DPVAS
701 VVQPL QRLVG YTRVA LEPGE SRRLT VTPVA DLASF TGRDG RRIVE PGELE
751 LRLAA SSTDR RL T AR VTLIG TERHV DHTRR LHATF TQKPA T
    
```

图 6 *Streptomyces* sp. CH7 的木糖苷酶序列及 *L. shinshuensis* 木糖苷酶可能含有的肽段序列(黑体字)
Fig. 6 Sequence of the xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and possible peptide sequences of the xylosidase from *L. shinshuensis* (bold words)

2.9 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶对天然木糖苷化合物的水解

将木糖苷酶与人参皂甙 Rb₃ 孵育 90 min 后的 HPLC 结果见图 7, 除了原有的底物外, 产生了一个新峰, 根据 LC-MS 对分子量的测定结果(结果未显示), 结合保留时间与标准人参皂甙的比较, 判定水解产物为人参皂甙 Rd, 而且 Rd 的含量随水解时间的延长而增加。其他去葡萄糖基的低极性皂甙如 F₂, C-K 以及 20 (S) protopanaxadiol 均未检测到。

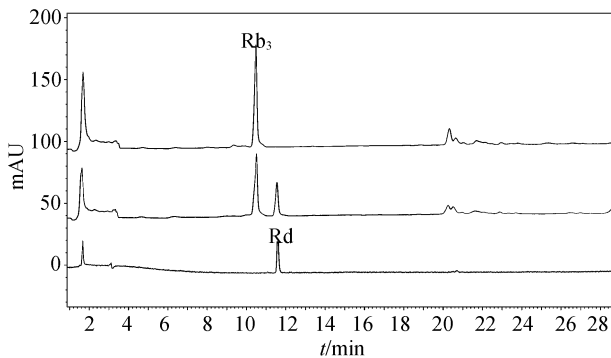


图 7 木糖苷酶水解人参皂甙 Rb₃ 的 HPLC 分析结果
Fig. 7 HPLC analysis of product of ginsenoside Rb₃ hydrolyzed by xylosidase

1: ginsenoside Rb; control; 2: after 90 min of incubation with xylosidase; 3: ginsenoside Rd standard

将该酶与 10DAXT 共同孵育 90 min 后, 未发现产物生成, 继续孵育 24 h 后, 仍无产物产生, 说明该木糖苷酶对 10DAXT 的木糖基无水解能力。

3 讨论

本研究首次报道了来源于 *L. shinshuensis* 菌的木糖苷酶分离纯化和性质研究。该木糖苷酶具有 98 u/mg 蛋白的比活力, 大大高于其他一些来自于真菌的木糖苷酶^[10-13]。对该酶的性质研究发现, 其最适 pH 在 7.0 左右, 且在一个偏碱性的 pH(6.0~11.0)条件下具有较高的稳定性, 这一点与大多数已知木糖苷酶不同, 目前已报道的木糖苷酶除了少数几个最适 pH 为中性或弱碱性外^[14-17], 其他均为酸性, 酶的这种性质与微生物生长的环境有很大关系。本文所报道的木糖苷酶来源于放线菌, 其最适生长条件为 pH 7.0 左右, 因此可能导致其所产生的酶的最适 pH 也在 7.0 附近。对于在酸性条件下稳定性差的底物的水解反应, 这类在中性或偏碱性稳定且有活性的酶具有很高的应用价值。另外该木糖苷酶在 5% 的甲醇

溶液中仍保留了 80% 以上的活性, 这一性质使得在水解一些极性较低的糖苷类化合物时, 可以通过加入少量甲醇达到提高底物溶解度, 从而提高底物浓度, 增加反应速度的目的。

使用 HPLC-ESI-MS/MS 对该木糖苷进行 de novo 测序及数据库比对后的结果表明, 本文报道的木糖苷酶与来自 *Streptomyces* sp. CH7 菌的木糖苷酶序列^[18]具有一定的相似性(覆盖率为 35%)。进一步对两个酶的性质进行对比发现二者在某些方面确实很相似: 如两个酶都是由两个相同亚基组成的二聚体, 亚基分子量分别为 91 kD 和 87 kD; 最适温度都是 55°C, 最适 pH 分别为 7.0 和 6.5; 都可以被 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 强烈抑制等。但二者在另外一些方面又存在很大不同: 如在 1 mmol/L Zn²⁺ 存在的情况下, 来自 *Streptomyces* sp. CH7 菌的木糖苷酶活性完全丧失, 而 *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶仍保持了 80% 以上的活性; 当使用 pNPX 作为底物时, 前者的 K_m 和 V_{max} 分别为 0.56 mmol/L 和 0.0263 mmol/(min·mg), 而后者为 1.04 mmol/L 和 0.095 mmol/(min·mg)。

对天然木糖苷化合物的水解实验发现, *L. shinshuensis* 菌木糖苷酶可以水解人参皂甙 Rb₃ C-20 位的木糖基, 产生具有药效活性的人参皂甙 Rd。由于 Rd 在各种人参制品中通常只占总皂甙含量的 4.3%~11.9%^[19], 因此 Rd 的制备除了常规的直接提取外, 更多研究集中在如何通过转化的方法从其他天然人参皂甙中获得, 目前已有利用葡萄糖苷酶, 阿拉伯糖苷酶, 鼠李糖苷酶分别将人参皂甙 Rb₁, Rc 和绞骨蓝皂甙-5 转化为 Rd 的报道^[9,20,21]。本文报道的木糖苷酶可以定向水解人参皂甙 Rb₃ 的木糖基, 为 Rd 的获得提供了一种新的生物转化途径。

紫杉烷木糖苷是广泛存在于红豆杉属植物中的一种紫杉烷化合物, 由于其具有与紫杉醇相同的母核结构, 因此可以作为生产紫杉醇的前体化合物, 但木糖基的去除仍是阻碍这类化合物有效利用的主要因素。Hanson 等人曾在 1997 年报道了利用莫氏杆菌菌体细胞水解紫杉烷木糖苷的木糖基^[22], 但迄今为止, 并没有使用纯木糖苷酶水解紫杉烷木糖苷的报道。利用本文报道的木糖苷酶对紫杉烷木糖苷进行水解发现, 该酶无法水解其 C-7 位木糖基。原因可能是由于这类化合物极性低、空间位阻大, 导致很难与酶活性中心有效结合; 或者即使能够结合,

但是转化能力极低, 从而导致无法水解紫杉烷木糖苷, 但真正的原因有待进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] Rodionova NA, Tavobilov IM, Bezborodov AM. Beta-Xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. *Journal of Applied Biochemistry*, 1983, **5**: 300–312.
- [2] Tuncer M, Ball AS. Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan-degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat-spelt xylan. *Journal of Applied Biochemistry*, 2003, **94**(6): 1030–1035.
- [3] Mao LS, You JX, Song XY, *et al.* Effects of endo-xylanase and xylosidase pretreatment on bleaching properties of wheat straw pulp, *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2003, **23**(2): 7–11.
毛连山, 尤纪雪, 宋向阳, 等. 内切木聚糖酶和外切木糖苷酶对纸浆漂白性能的影响. *林产化学与工业*, 2003, **23**(2): 7–11.
- [4] <http://www.brenda-enzymes.info/>
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254.
- [6] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
- [7] Ma B, Zhang K, Hendrie C, *et al.* Peaks: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, **17**(20): 2337–2342.
- [8] Lineweaver, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 1934, **56**: 658–666.
- [9] Luan HW, Liu X, Qi XH, *et al.* Purification and characterization of a novel stable β -D-glucosidase hydrolyzing ginsenoside Rb1 into Rd from China white jade snail. *Process Biochemistry*, 2006, **41**: 1974–1980
- [10] Garcia-Campayo V, Wood TM. Purification and characterization of a β -D-xylosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *Carbohydrate Research*, 1993, **242**: 229–245.
- [11] John M, Schmidt S. Xylanases and β -xylosidase of *Trichoderma lignorum*. *Methods in Enzymology*, 1988, **160**, 662–671.
- [12] Kiss T, Kiss L. Purification and characterization of an extracellular beta beta-D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, **16**(5): 465–470.
- [13] Tuohy MG, Puls J, Claeysens M, *et al.* The xylan-degrading enzyme system of *Talaromyces emersonii*: novel enzymes with activity against aryl beta-D-xylosides and unsubstituted xylans. *Biochemical Journal*, 1993, **290**: 515–523.
- [14] Wainø M, Ingvorsen K. Production of beta-xylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 2003, **7**(2): 87–93.
- [15] Saxena S, Fierobe HP, Gaudin C, *et al.* Biochemical properties of a beta-xylosidase from *Clostridium cellulolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 3509–3512.
- [16] Xu WZ, Shima Y, Negoro S, *et al.* Sequence and properties of beta-xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO. Contradiction of the previous nucleotide sequence. *European Journal of Biochemistry*, 1991, **202**: 1197–1203.
- [17] Bernier R, Desrochers M, Paice MG, *et al.* Isolation and characterization of beta-xylosidase from a recombinant *Escherichia coli* strain. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1987, **33**: 409–419.
- [18] Pinphanichakarn P, Tangsakul T, Thongnumwon T, *et al.* Purification and characterization of β -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, **20**: 727–733.
- [19] Ji QC, Harkey MR, Henderson GL, *et al.* Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 2001, **12**: 320–326.
- [20] Zhang CZ, Yu HS, Bao YM, *et al.* Purification and characterization of ginsenoside-alpha-arabinofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry*, 2002, **37**: 793–798.
- [21] Yu HS, Liu H, Zhang CZ, *et al.* Purification and characterization of gypenoside-alpha-L-rhamnosidase hydrolyzing gypenoside-5 into ginsenoside Rd. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 861–867.
- [22] Hanson RL, Howell JM, Brzozowski DB, *et al.* Enzymic hydrolysis of 7-xylosyltaxanes by xylosidase from *Moraxella* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1997, **26**: 153–158.