

## 嗜热真菌耐热木聚糖酶的活性中心

李秀婷 江正强 李里特 杨绍青 田红梅

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

**摘要** 应用 NBS,WRK,DTNB,PMSF,Phenylgloxal hydrate,DEPC 等化学修饰剂对嗜热真菌所产的耐热木聚糖酶进行了化学修饰。分别作用于色氨酸残基和谷氨酸(或天冬氨酸)残基的 NBS 和 WRK 可使耐热木聚糖酶活性显著降低,而其他几种修饰剂无明显作用。木聚糖对 NBS 的修饰有抑制作用,3.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的桦木木聚糖底物可完全阻止 NBS 对耐热木聚糖酶的修饰作用,但木聚糖底物不能阻止 WRK 对耐热木聚糖酶的失活作用。实验结果表明,色氨酸残基和谷氨酸(或天冬氨酸)残基位于酶的活性中心,且色氨酸残基位于酶的底物结合中心,而谷氨酸(或天冬氨酸)残基可能位于酶的催化中心。

**关键词** 嗜热真菌;耐热木聚糖酶;化学修饰;活性中心

中图分类号 Q 55

文章编号 1007-4333(2004)04-0004-06

文献标识码 A

### Chemical modification of thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*

Li Xiuting, Jiang Zhengqiang, Li Lite, Yang Shaoqing, Tian Hongmei

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** The modification chemicals of NBS, WRK, DTNB, PMSF, Phenylgloxal hydrate, DEPC were used to react with a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. The thermostable xylanase could be inactivated by NBS (N-bromosuccinimide) and WRK (N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate). The tryptophan residues and glutamate/aspartate residues might be involved in the active site of the enzyme. Chemical modification of the xylanase with NBS and WRK revealed that tryptophan and glutamate/aspartate were essential for the activity. 3.0 mg·mL<sup>-1</sup> birchwood xylan could completely inhibit the inactivation of xylanase by NBS. The substrate had no effect on the modification by WRK. The results revealed that tryptophan was in the substrate binding site and glutamate/aspartate in the catalytic site.

**Key words** *Thermomyces lanuginosus*; thermostable xylanase; chemical modification; active site

目前,国内外研究木聚糖酶的成果及报道均较多<sup>[1~6]</sup>。在木聚糖酶活性中心研究方面,除刘瑞田等<sup>[7]</sup>关于碱性木聚糖酶活性部位的文献外,国内尚未见其他报道。国外对木聚糖酶活性部位的研究较为深入,已知木聚糖酶活性部位的氨基酸残基主要有色氨酸<sup>[3]</sup>、谷氨酸(或天冬氨酸)<sup>[4]</sup>、组氨酸<sup>[5]</sup>和半胱氨酸<sup>[6]</sup>,等等。

嗜热真菌(*Thermomyces lanuginosus*)是生长上限温度最高的一种真菌,可能成为真核生物中产胞外热稳定酶的最佳菌株。嗜热真菌所产的耐热木聚

糖酶在高温和碱性条件下有效且稳定,具有极大的工业应用潜力。笔者在完成对嗜热真菌所产耐热木聚糖酶的纯化及性质研究的基础上,对其氨基酸残基的化学修饰与酶活性关系进行了研究,同时,结合荧光光谱分析对耐热木聚糖酶的活性部位及功能进行了初步探讨,旨在为研究木聚糖酶的分子结构与其功能域的关系提供实验依据和证明,并为改造酶蛋白,提高其在生产实际中的应用价值提供理论依据。

收稿日期:2004-02-29

基金项目:教育部研究重点项目和国家“十五”攻关课题(2001BA708B04-06)

作者简介:李秀婷,博士研究生;江正强,副教授,博士,通讯作者,主要从事酶与发酵工程方面的研究,E-mail:zhqiang@cau.

edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

耐热木聚糖酶为本实验室改良的菌株嗜热真菌 *T. lanuginosus* CBS288.54 M-18 的发酵液经多步纯化得到的电泳级纯酶;化学修饰剂 NBS (N-bromosuccinimide), DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)), Phenylglyoxal hydrate, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), DEPC, WRK (N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate),  $\gamma$ -巯基乙醇和梓木木聚糖均为美国 Sigma 公司产品,其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1) 木聚糖酶活性的测定。木聚糖酶活性的测定参照 DNS 法<sup>[8]</sup>:将 0.1 mL 适当稀释的酶溶液,加入到 0.9 mL 质量浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的梓木木聚糖底物溶液(用 0.05 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制)中,50℃ 反应 10 min,用 DNS 法测定释放的还原糖含量,同时以木糖作为标准。木聚糖酶活性单位定义为:上述条件下,每 min 水解木聚糖生成 1  $\mu$ mol 木糖所需要的酶的物质的量为 1 U。

2) 蛋白质的测定。按照 Lowry 等<sup>[9]</sup>的方法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白质绘制标准曲线。

3) 酶的化学修饰。酶化学修饰的作用条件及有关文献见表 1。将各种化学修饰剂溶于 pH 7.5, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 缓冲液中,配成不同浓度的溶液后与酶液混合,25℃ 保温一定时间后终止反应,测定残余酶活性。以用缓冲液替代修饰剂且在 25℃ 保温一定时间的酶液作为对照,其相对酶活性为 100%。

表 1 酶化学修饰的作用条件

Table 1 The conditions of chemical modification of xylanase

氨基酸残基	修饰剂名称	修饰剂最大终浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	参考文献
Trp	NBS	40 × 10 <sup>-3</sup>	[10]
Gl u/ Asp	WRK	50	[11]
Cys	DTNB	20	[12]
Ser	PMSF	20	[13]
Arg	Phenylglyoxal	100	[14]
His	DEPC	100	[15]

4) NBS 与 WRK 对木聚糖酶的修饰作用。25℃ 条件下,用终浓度为 5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的 NBS 分别与酶液作用 10, 20, 30, 40 min 后,以色氨酸终止反应,测定残余酶活性<sup>[10]</sup>;用终浓度为 10, 20, 30, 40, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 的 WRK 分别与酶液作用 10, 20, 30, 40 min 后,以乙酸缓冲液终止反应,测定残余酶活性<sup>[11]</sup>;以不加修饰剂的酶液作为对照,计算相对酶活性。由相对酶活性的对数对反应时间作图得到的直线的斜率即为一级反应常数,由一级反应常数的对数对修饰剂浓度的对数作图,得到直线的斜率即为二级反应常数<sup>[16]</sup>。

5) 底物对化学修饰的抑制作用。酶液与不同浓度的木聚糖溶液于 0℃ 作用 10 min 后,分别加入 NBS 或 WRK,作用一定时间后终止反应,测定残余酶活性,同时,以不加修饰剂的酶液作为对照,计算相对酶活性。

6) NBS 的修饰作用与底物对酶荧光的影响。25℃ 条件下,终浓度为 20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的 NBS 与酶液作用 10 min 后测定其荧光,同时以不添加 NBS 的酶液作为对照。将酶液与 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的木聚糖溶液在 25℃ 下作用 10 min 后,测定与底物结合后的木聚糖酶的荧光光谱,同时以不添加木聚糖的酶液作为对照。将酶溶于 pH 7.5, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 缓冲液中,质量浓度为 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>。荧光测定使用 RF-5301 型荧光分光光度计,激发和发射光谱谱宽均为 5 nm,激发波长 289 nm,发射波长 250~450 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化学修饰剂对耐热木聚糖酶活性的影响

从不同化学修饰剂对耐热木聚糖酶活性的影响(图 1)可以看出,NBS 和 WRK 对木聚糖酶活性的影响极为显著(图 1(a)和(b)),但随着修饰剂浓度的增高,木聚糖酶的活性受到严重抑制,尤其是 NBS,很低浓度 NBS 的化学修饰作用即使木聚糖酶迅速丧失活性。由此可见,色氨酸残基和谷氨酸(或天冬氨酸)残基极有可能位于或接近于木聚糖酶的活性部位。

DTNB, PMSF, Phenylglyoxal hydrate 和 DEPC 等修饰剂的作用并不能使耐热木聚糖酶的活性产生显著变化(图 1(c)和(d)),说明这些修饰剂所修饰的氨基酸残基,即半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和精氨酸等并不处于该耐热木聚糖酶的活性部位。虽然有

些修饰剂对耐热木聚糖酶的活性有一定程度的影响,如DTNB和Pheny,但极可能是由于其作用于酶活性中心以外的其他相应的氨基酸残基,从而使木聚糖酶活性发生变化。Kitpreeghavanich等<sup>[17]</sup>报道来源于嗜热真菌 *Humicola lanuginosa* (曾用名)的木聚糖酶不能被 *p*-chloromercuribenzoic acid 所修饰而失去活性;而Tatjana和Vladimir在对来自于嗜热真菌 *T. lanuginosus* 另一株DSM5826的木聚糖酶的研究中却得到不同的结果<sup>[6]</sup>,即10 mmol

DTNB的修饰和25 mmol PHMB的修饰均能使其所研究的木聚糖酶丧失活性,并由此得到半胱氨酸位于该酶活性中心的结论。基于此,可以推测来自嗜热真菌不同菌株的耐热木聚糖酶有可能具有不同的二级或三级结构。空间结构的不同使酶分子功能域有所不同,因而决定了酶在反应过程中表现出不同的反应机制,当然,这一推测需要更加深入的实验研究来证实。

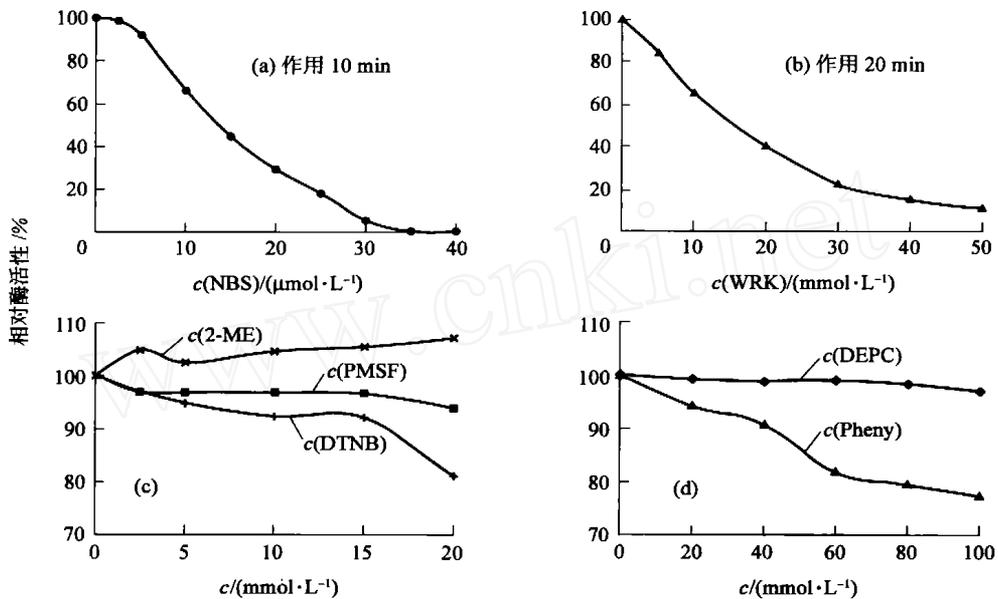


图1 不同化学修饰剂对木聚糖酶活性的影响(25 )

Fig. 1 Effect of different modifiers on xylanase activity(25 )

2.2 化学修饰剂对耐热木聚糖酶氨基酸的修饰作用

1) NBS对色氨酸的化学修饰作用。NBS通过氧化色氨酸残基的吲哚基,形成羟吲哚衍生物来完成蛋白质的修饰。图2示出不同浓度NBS对木聚糖酶的失活作用。实验中修饰剂相对于可能修饰的

残基是大过量的,故可以认为该失活反应是假一级反应,结合Levy等<sup>[16]</sup>的方法,得到二级反应常数1.170(图2(a)),表明有1个色氨酸残基被修饰而使酶失活,因此,整个酶分子中至少有1个色氨酸残基位于活性部位。

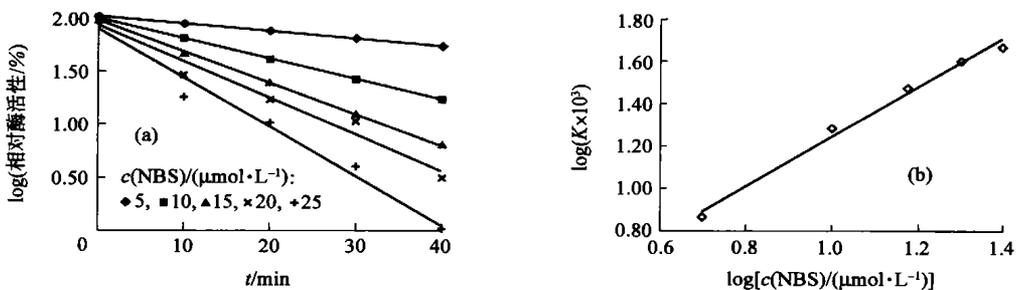
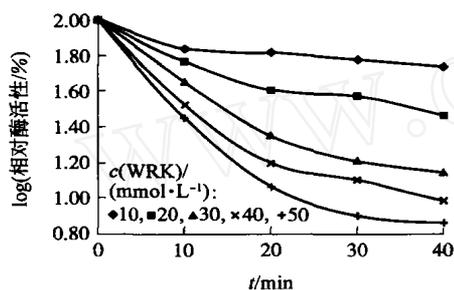


图2 不同浓度NBS对木聚糖酶的失活作用

Fig. 2 Inactivation of xylanase by NBS

许多对木聚糖酶活性部位的研究结果表明,色氨酸残基对于酶的催化作用非常关键。Kerskar 等<sup>[3]</sup>应用近似方法进行 NBS 的化学修饰,来研究耐热菌 *Streptomyces T<sub>7</sub>* 产木聚糖酶的活性中心,其结果证明酶分子中只有 1 个色氨酸残基位于该酶的活性部位。另外,Zhu 等<sup>[18]</sup>针对 *Fibrobacter succinogenes S85* 的木聚糖酶 C 分子的 3 个完全不同的区域 A、B、C 进行研究时,发现区域 A 和 B 均具有水解木聚糖的能力,且分别有 4.3 和 1.6 个色氨酸残基位于此 2 区域的活性部位,而区域 C 则不具备催化特性。

2) WRK 对谷氨酸的化学修饰作用。WRK 在酸性条件下选择性地修饰谷氨酸的羧基而对酶进行失活作用。不同浓度的 WRK 与耐热木聚糖酶作用



不同时间,测定残余酶活性,计算得到相对酶活性的对数与作用时间的关系(图 3(a))。可以看出,WRK 对酶活性的影响分为 2 个阶段,即快速失活阶段和酶活性平缓下降阶段,其原因可能与酶羧基修饰的特点有关<sup>[11]</sup>:在失活作用初期,酶分子表面的许多谷氨酸残基容易被修饰,从而引起活性中心微环境的改变,使酶活性快速下降。随着这一过程的延续,修饰剂特异性地与活性位点的羧基反应而产生的依赖于时间和修饰剂浓度的特异抑制,使其对酶的失活作用变缓。同样地,结合 Levy 等<sup>[16]</sup>的方法,得到二级反应速度常数 1.009(图 3(b)),表明有 1 个羧基被修饰而导致酶失活,可知酶分子中至少有 1 个羧基位于活性中心。

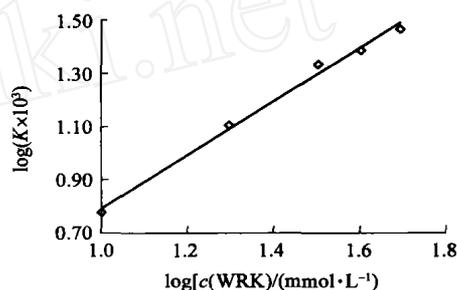


图 3 WRK 对木聚糖酶的失活作用

Fig. 3 Inactivation of xylanase by WRK

有较多的研究报道表明,谷氨酸或天冬氨酸残基位于木聚糖酶的活性中心,在酶的催化反应过程中起重要作用。Zhu 等<sup>[18]</sup>研究 *Fibrobacter succinogenes S85* 的木聚糖酶 C 分子的不同区域的催化特性时,证明羧基处于其活性区域的重要位置;Nath 和 Rao<sup>[19]</sup>在研究 pH 对嗜热细菌 *Bacillus sp. NCIM59* 所产木聚糖酶 Xyl 构象的影响时,同样采用了利用 WRK 进行化学修饰的方法,通过对位于活性中心的谷氨酸残基进行作用,证实了 pH 影响酶 Xyl 活性部位的微环境与电离情况,从而使酶表现出偏中性的最适 pH;另外,Mark 等<sup>[4]</sup>采用定点突变的方法,对来自 *Schizophyllum commune* 木聚糖酶 XynA 的活性中心进行研究时,讨论了处于活性部位的谷氨酸残基在其酶反应机制中所起的作用,得到谷氨酸残基提供质子形成亲核进攻而完成酶促反应的结论。由此可推测,在嗜热真菌耐热木聚糖酶的活性部位,谷氨酸(或天冬氨酸)残基可能处于其催化中心,通过亲核进攻而在酶催化反应过

程中起着至关重要的作用。

### 2.3 底物对化学修饰的抑制作用

在用 NBS 对木聚糖酶进行化学修饰之前,先将酶与底物木聚糖溶液作用,考察底物对化学修饰的保护作用。图 4 为经不同浓度木聚糖溶液作用的酶化学修饰后残余酶活性的变化情况。可以看出,随着底物浓度的增加,NBS 对酶的失活作用随之减弱,也就是说底物对酶的保护作用增强;当底物质量

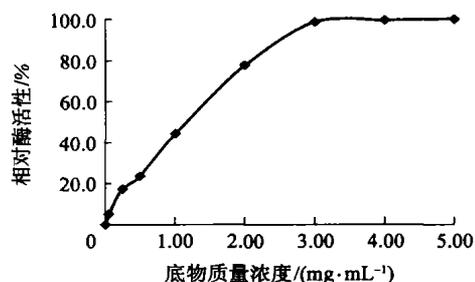


图 4 底物对 NBS 修饰的抑制作用

Fig. 4 Substrate protection of xylanase against inactivation by NBS

浓度增加至  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,其对酶的保护作用达到 100%。由此可推断底物与酶结合后,与 NBS 的结合位点被占据,无法再与 NBS 结合,即色氨酸残基处在酶与底物的结合位点。实验中还发现,底物对 WRK 的修饰几乎起不到抑制作用,表明谷氨酸(或天冬氨酸)不处在酶与底物的结合位点。Kerskar 等<sup>[3]</sup>在对一株链霉菌所产木聚糖酶活性中心的研究中,也得到色氨酸残基处于酶与底物的结合位点,对于酶的活性极为重要的结论。

#### 2.4 木聚糖酶的荧光光谱分析

1) NBS 修饰对木聚糖酶荧光的影响(图 5)。木聚糖酶的荧光光谱表现的是色氨酸残基,最大吸收峰在 344 nm 处。与正常色氨酸 348 nm 处的荧光发射光谱峰相比,耐热木聚糖酶的发射光谱峰位蓝移至 344 nm 处,表明该酶属于 B 类蛋白质。NBS 的修饰导致荧光猝灭,而且其最大吸收峰位由 344 nm 处蓝移至 338 nm 处,说明由于 NBS 对色氨酸残基的修饰,酶分子的构象发生了改变。

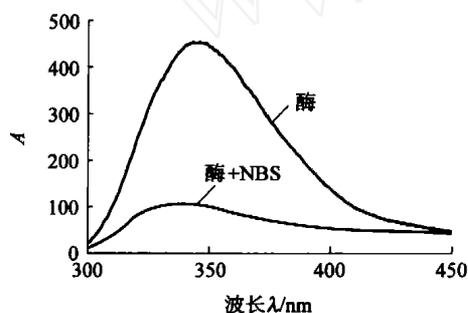


图 5 NBS 修饰对木聚糖酶荧光的影响  
Fig. 5 Effect of NBS on the fluorescence spectrum of xylanase

2) 底物对木聚糖酶荧光的影响。图 6 为木聚糖酶与底物结合后的荧光光谱图。可以看出,酶液中添加的木聚糖质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,酶蛋白的发射光谱峰发生红移,从 344 nm 迁移至 350 nm,

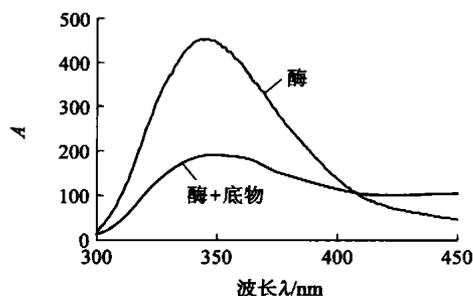


图 6 底物对木聚糖酶荧光的影响

Fig. 6 Effect of the substrate on the fluorescence spectrum of xylanase

峰的强度也有所下降,表明酶与底物的结合使该酶分子活性基团的微环境发生了改变。根据经验性规律可以推测,色氨酸残基可能位于酶分子表面,且位于酶蛋白的结合部位:由于酶蛋白分子与底物发生了结合,从而导致峰值降低。此结果再次证实了色氨酸残基不仅是该酶蛋白分子活性部位所必需的氨基酸残基,而且处于酶催化反应过程中至关重要的酶与底物的结合位点。

### 3 结论

色氨酸残基和谷氨酸(或天冬氨酸)残基是维持酶活性的重要基团:色氨酸残基处于耐热木聚糖酶的底物结合中心,而谷氨酸(或天冬氨酸)残基可能处于酶的催化中心,且整个酶分子中至少有 1 个色氨酸残基和 1 个羧基位于活性中心部位。半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和精氨酸等残基均不处于酶活性中心。木聚糖对 NBS 的修饰有抑制作用, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的桦木木聚糖底物可完全阻止 NBS 对耐热木聚糖酶的修饰作用,而木聚糖不能阻止 WRK 对耐热木聚糖酶的失活作用。

### 参 考 文 献

- [1] Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. *Cri Rev Biotech*, 1997, 17: 39 ~ 67
- [2] Hang Y D, Woodams E E. Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24: 389 ~ 392
- [3] Kerskar S S, Srinivasan M C, Denhpande V V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*[J]. *Biochem J*, 1989, 261: 49 ~ 55
- [4] Mark R B, Anthony J C. Identification of a glutamate residue at the active site of xylanase A from *Schizophyllum commune*[J]. *Eur J Biochem*, 1994, 219: 821 ~ 827
- [5] George S P, Rao M B. Conformation and polarity of the active site of xylanase I from *Thermomonospora* sp. as deduced by fluorescent chemoaffinity labeling: site and significance of a histidine residue [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(10): 2881 ~ 2888
- [6] Tatjana C, Vladimir M. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*[J]. *Enzyme Microbiol Tech*, 1996, 19: 289 ~ 296
- [7] 刘瑞田, 宋欣, 刘相梅, 等. 假单孢菌碱性木聚糖酶分子活性部位的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(5): 520 ~ 524

- [8] Bailey M J , Biely P , Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. J Biotechnol , 1992 , 23 : 257 ~ 270
- [9] Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L , et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem , 1951 , 193 : 265 ~ 275
- [10] Iwama M , Takahashi T , Irie M. Differentiation of two types of tryptophan residues related to enzymatic activity in a glucoamylase from a *Rhizopus* sp. by N-bromosuccinimide oxidation in the presence of tris (hydroxymethyl) aminomethane and maltitol[J]. Chem Pharm Bull , 1986 , 34(9) : 3812 ~ 3817
- [11] Russell A J , Thomas P G , Fersht A R. Electrostatic effects on modification of charged groups in the active site cleft of subtilisin by protein engineering[J]. J Mol Biol , 1987 , 193 : 803 ~ 813
- [12] Iwama M , Ohtsuki R , Takahashi T , et al. Modification of glucoamylases from *Rhizopus* sp. , with 1-cyclohexyl-3 (2-morpholino- (4)-ethyl) carbodiimide [J]. J Biochem , 1984 , 96(2) : 298 ~ 336
- [13] Sunil K , Peter E , Phaik L , et al. Primary structure , physicochemical properties and chemical modification of NAD dependent D-lactac dehydrogenase [J]. J Biol Chem , 1992 , 267(12) : 8499 ~ 8513
- [14] Spade T F , Witkop B. Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide[J]. Methods Enzymol , 1967 , 11(6) : 498 ~ 506
- [15] Dominici P , Tancin B , Voltattorni C B. Chemical modification of pig kidney 3 , 4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase with diethylpyrocarbonate[J]. J Bio Chem , 1985 , 260(19) : 10583 ~ 10589
- [16] Levy H M , Leber P D , Ryan E M. The action N-Bromosuccinimide[J]. J Biol Chem , 1963 , 238 : 3654 ~ 3659
- [17] Kitpreeghavanich V , Hayashi M , Nagai S. Purification and properties of endo-1 , 4- -xylanase from *Hemicella lanuginosa*[J]. J Ferment Technol , 1984 , 62 , 415 ~ 420
- [18] Zhu H , Parids F W , Krell R J , et al. Enzymatic specificities and modes of action of the Two catalytic Domains of the xynC xylanase from *Fibrobacter succinogenes* S85 [J]. J Bacter , 1994 , 176(13) : 3885 ~ 3894
- [19] Nath D , Rao M. pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. (NCIM 59) [J]. Enzyme Microb Technol , 2001 , 28 : 397 ~ 403