

白腐真菌产木聚糖酶发酵条件的优化及酶学性质研究

岳晓禹^{1,2}, 张恒业¹, 刘艳娟³, 牛天贵², 刘相东⁴

(1. 郑州牧业工程高等专科学校质检系, 河南郑州 450011;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

3. 河南商业高等专科学校, 河南郑州 450044;

4. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 通过正交实验对白腐真菌 *Pleurotus ostreatus* SYJ042 产酶条件进行了优化, 研究了该酶的酶学性质。结果表明: 最适发酵条件为: 碳源为 5% 的麸皮和玉米芯 (1:1), 氮源为 0.5% 的蛋白胨, 接种量为每 50mL 发酵液接 4 块菌丝块, 发酵时间为 8.5d。该酶的最适温度是 50℃, 最适 pH 为 5.4; Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活性影响较小; Ag^+ 、 MnO_4^{2-} 影响较大。

关键词: 木聚糖酶, 发酵条件, 酶学性质

Study on the optimization of xylanase fermentation conditions by white rot fungi and the enzymological properties

YUE Xiao-yu^{1,2}, ZHANG Heng-ye¹, LIU Yan-juan³, NIU Tian-gui², LIU Xiang-dong⁴

(1. Department of Quality Detection and Management of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China;

2. Food Science & Nutrition Engineering College of China Agriculture University, Beijing 100083, China;

3. Henan Business College, Zhengzhou 450044, China;

4. Technical Institute of China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: By the orthogonal test, the optimal fermented condition of xylanase secretion by white rot fungi was obtained: 2.5% wheat bran + 2.5% corn cob, 0.5% peptone, 4 pieces per 50mL liquid volume, 8.5d. By the experimental method in the thesis, some properties of the xylanase were obtained: the optimal temperature was at 50℃. The optimal pH was 5.4. Ag^+ and MnO_4^{2-} evidently impacted on the xylanase activity.

Key words: xylanase; fermented conditions; properties

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)04-0197-04

木聚糖是木糖残基以 β -1,4 木糖苷键连接而构成的, 是植物细胞壁中的半纤维素多糖的主要成分, 约占植物碳水化合物总量的 1/3, 在自然界中是继纤维素之后的含量第二丰富的再生生物资源^[1]。木聚糖酶是能够水解木聚糖的一个复合酶系的总称, 主要的酶包括内切木聚糖酶 (1,4- β -D 木聚糖水解酶, EC3.2.1.8) 和 β -木糖苷酶 (1,4- β -D 木聚糖, 木寡糖水解酶)^[2]。由于木聚糖酶在半纤维多聚糖资源的利用以及工业应用方面的巨大潜力, 其广泛应用于饲料、食品、造纸、纺织和酿造工业, 是一种重要的工业用酶^[3]。国内已有不少研究者对链霉菌^[4]、曲

霉^[5]、黑曲霉^[6-7]、酵母^[8]、木霉^[9]等真菌及芽孢杆菌^[10-11]等细菌的木聚糖酶进行了研究。国外很多研究者也进行了微生物产木聚糖酶的生产及应用研究^[12-15]。但很少有采用白腐真菌作为木聚糖酶的来源进行研究, 而白腐真菌是安全且具有很高的营养价值^[16], 并且其中的许多代谢物是制药、食品的重要来源^[17]。本实验利用白腐真菌作为提取木聚糖酶的微生物来源, 以实验室分离保存的白腐真菌 (*Pleurotus ostreatus* SYJ042) 为研究菌种, 优化其产木聚糖酶条件, 并研究其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1% 木聚糖 将 1.000g 木聚糖 (Oat spelts, 购自 Sigma 公司) 加热溶解于 100mL 蒸馏水中定容后, 放于冰箱中备用; 缓冲液 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制碱性缓冲液, 柠檬酸和柠檬酸钠配制的酸性缓

收稿日期: 2010-10-08

作者简介: 岳晓禹 (1974-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品微生物。

基金项目: 郑州牧专博士科研启动资金资助项目。

冲液; DNS 试剂 称取 10g 3,5-二硝基水杨酸溶于水中,全部溶解后,加入 20g NaOH、200g 酒石酸钠,加入蒸馏水,使总体积至 500mL 左右,加热溶解后,加 2g 苯酚、0.5g 无水亚硫酸钠,加热搅拌至全部溶解,冷却,用水稀释至 1000mL,储于棕色瓶中,1 周后使用。

UV-2800A 紫外可见分光光度计 上海精密仪器仪表有限公司; 恒温摇床培养箱 东西仪(北京)科技有限公司; 生化培养箱 上海实验仪器厂; 超净工作台 上海人和科学仪器有限公司。

1.2 培养基组成

1.2.1 菌种筛选培养基 麸皮 5.0g, 蛋白胨 0.2g, 琼脂 1.8g, Mandels 盐溶液 100mL^[8]。[Mandels 氏组成 (g/1000mL): NaNO₃ 3.0g, KH₂PO₄ 3.0g, MgSO₄ 0.5g, CaCl₂ 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 7.5 × 10⁻³g, MnSO₄ · H₂O 2.5 × 10⁻³g, ZnSO₄ · 7H₂O 2.0 × 10⁻³g]。

1.2.2 初始发酵培养基 5.0g 麸皮, 0.2g 蛋白胨, 另外, 添加 Mandels 盐溶液 100mL(组成同上)。

1.2.3 发酵用液体培养基 2.5g 麸皮, 2.5g 玉米芯, 0.8g 蛋白胨, 添加 Mandels 盐溶液 100mL(组成同上)。

1.3 培养方法

实验过程中, 经过试管斜面培养、平板扩大培养和摇瓶液体发酵培养三个阶段组成。从菌种中接入斜面试管中, 25℃ 生长 7d 后放在 4℃ 条件贮存备用。然后将试管中培养好的一级菌种接入到平皿培养基中, 将平板 25℃ 条件下培养 7d, 长满平板后用于摇瓶液体培养。150mL 三角瓶装液量 50mL, 接入 4 块 0.25cm² 菌块, 置于旋转式摇床(转速为 160r/min)上, 26℃ 培养 120h。

1.4 木聚糖酶酶活的测定方法和酶活定义

木聚糖酶酶活测定采用 DNS 法^[9]。发酵液经 6000r/min 离心 15min 后, 取上清液作为测定酶液。取 1mL 酶液, 加入到 4mL 蒸馏水中(稀释 5 倍, 不同批次酶液稀释倍数不同), 分成 2 份, 其中 1 份沸水浴中煮沸 20min, 灭活作为空白。另外 1 份作为测定酶液。取 0.2mL 酶液(灭活酶液作为空白)加入到 0.2mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液配制的 1% 木聚糖溶液中, 50℃ 反应 15min, 煮沸 10min, 流水冷却后, 加入 5.0mL 蒸馏水, 540nm 条件下比色测吸光度。DNS 法测定还原糖是以木糖为标准, 在上述条件下, 每分钟产生的还原糖相当于 1μmol 木糖的所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.5 正交实验

参考岳晓禹等单因素实验结果^[20], 选发酵时间、接种量、氮源和碳源这 4 个重要的影响因素作四因素三水平的正交实验, 测定酶活从而得出最佳的培养条件。

1.6 酶液处理

1.6.1 硫酸铵沉淀 采用固体硫酸铵法。分别取 20mL 酶液, 室温下, 缓缓加入硫酸铵各 2.26、3.50、4.84、6.24、7.80、9.48、11.20g, 边加边搅拌, 使硫酸铵溶解, 饱和度分别达到 20%、30%、40%、50%、60%、

70%、80%。再放于 4℃ 下静置过夜, 离心收集沉淀。将沉淀溶解于 0.2mol/L、pH5.4 柠檬酸缓冲液, 测酶活及蛋白含量。计算酶活回收率和酶比活, 得出合适的硫酸铵饱和度。

1.6.2 酶液除盐 用中空纤维超滤器浓缩酶液, 截留分子量为 8000Da, 工作压力为 0.12MPa, 将酶液浓缩、除盐。

1.7 木聚糖酶学性质研究

1.7.1 酶的最适温度及热稳定性 调不同的水浴温度分别为 30、35、40、45、50、55、60、70、80℃。取混匀的 2.8mL 反应体系(1mL 1% 木聚糖和 1.8mL pH5.4 的柠檬酸缓冲溶液), 于不同温度下保持 10min, 然后按本文的测酶活方法, 测相应酶液的 OD₅₄₀, 再计算成相应酶活单位, 每个处理 3 个重复, 取其平均值。以得到的各个酶活为纵轴, 以不同反应温度为横轴作图, 得出最适温度。

调不同的水浴温度为 30、40、50、60、70℃。取 0.2mL 适当稀释的酶液, 于不同温度下静置 10min 后取出, 用流水冷却, 全部热处理结束后, 按本文的测酶活方法, 加入预热至 50℃ 的 2.8mL 反应体系, 测相应的 OD₅₄₀, 再计算成相应的剩余酶活力, 每个样 3 次重复, 取其平均值。以水浴温度为横坐标, 以相对剩余酶活力为纵坐标作图, 从而得出酶的热稳定范围。

1.7.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性 取 0.5mL 酶液与 pH 分别为 3、4、4.6、5、6、7、8 的 0.5mL 缓冲溶液混匀, 静置 15min 后, 适当稀释, 从中取出 0.2mL 酶液, 按本文的测酶活方法测相应的 OD_{540nm} 处的吸光度。再计算出相应酶活, 每个样 3 次重复, 取其平均值。以酶活为纵轴, 以不同缓冲液的 pH 为横轴作图, 得出最适 pH。

将 0.5mL 酶液与 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 0.5mL 缓冲溶液混匀, 4℃ 下静置 1h, 再加入 0.5mL pH5.4 的缓冲溶液混匀, 再室温静置 10min, 适当稀释后, 从中取出 0.2mL 酶液, 按本文的测酶活的方法测相应 OD₅₄₀, 再计算出相应剩余酶活。每个处理 3 次重复, 取其平均值。以不同 pH 为横坐标, 以相对剩余酶活力为纵坐标作图, 得出酶的 pH 稳定范围。

1.7.3 金属离子对酶活的影响 将浓缩酶液于 20mmol/L pH5.4 的 buffer 中透析 24h, 检查活性有无明显变化。选取不同的金属离子, 加入处理好的酶液中, 使金属离子的终浓度为 8mmol/L, 振荡、室温下静置 15min, 按本文的测酶活方法, 得到相应的剩余酶活力。以不同金属离子为横坐标, 以相对剩余酶活力为纵坐标作图, 从而得出部分金属离子对酶活的影响。

2 结果与讨论

2.1 正交实验

由表 2 结果可知, 各因素对酶活的影响主次顺序为氮源 > 接种量 > 发酵时间 > 碳源。最优化配方是 A₂B₃C₂D₃, 但这个组合在实验中没有出现。由实验得出的最佳处理是 A₂B₃C₂D₂, 重复这两个组合的处理, 证实最佳配方为 A₂B₃C₂D₃, 即碳源为 5% 的麸皮和

表3 硫酸铵沉淀实验结果

硫酸铵饱和度(%)	20	30	40	50	60	70	80	对照
总酶活(U)	35.76	99.52	207.12	251.84	291.36	341.92	305.08	416
酶活回收率(%)	8.60	23.92	49.79	60.54	70.04	82.19	73.34	100
总蛋白量(mg)	3.97	7.19	9.68	9.85	10.84	14.01	13.52	17.78
蛋白回收率(%)	22.36	40.43	54.42	55.4	60.97	78.80	76.04	100
比活(U/mg)	9.01	13.84	21.40	25.57	26.88	24.41	22.57	23.40

玉米芯(1:1),氮源为0.5%的蛋白胨,接种量为每50mL发酵液接4块菌丝块,发酵时间为8.5d。其它条件是初始pH为6.0,通气量为发酵液占容积的1/3。

表1 实验因素及水平

水平	因素			
	A 碳源 (麸皮:玉米芯 =1:1,%)	B 氮源 (蛋白胨, %)	C 接种量 (菌丝块, 块/50mL)	D 发酵 时间 (d)
1	2	0.1	2	5.5
2	5	0.2	4	7
3	8	0.5	6	8.5

表2 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	酶活 (U/mL)
1	1	1	3	2	2.12
2	2	1	1	1	1.80
3	3	1	2	3	4.11
4	1	2	2	1	4.35
5	2	2	3	3	3.48
6	3	2	1	2	2.20
7	1	3	1	3	7.25
8	2	3	2	2	9.19
9	3	3	3	1	2.13
K ₁	13.72	8.03	11.25	8.28	
K ₂	14.47	10.03	17.65	13.51	
K ₃	8.44	18.57	7.73	14.84	
k ₁	4.57	2.68	3.75	2.76	
k ₂	4.82	3.34	5.88	4.50	
k ₃	2.81	6.19	2.58	4.95	
R	2.01	3.51	3.30	2.19	

2.2 硫酸铵沉淀结果

从表3可知,随着硫酸铵饱和度的增加,析出的沉淀物中的酶活回收率逐渐增加,到70%时最高,但相应的酶比活是60%硫酸铵饱和度时最高,达到26.88U/mg,这可能是由于70%饱和度时杂蛋白较多的缘故。而60%和70%时的酶活回收率差别不是很大,所以采用60%饱和度。

用中空纤维超滤器将浓缩酶液除盐备用,截留分子量为8000Da,工作压力为0.12MPa。

2.3 木聚糖酶特性研究

2.3.1 酶的最适温度及热稳定性 从图1可以看出,在采用的测定条件下,该酶的最适作用温度是50℃。在低于最适温度时,酶活性随温度的升高而增强;在高于最适作用温度时,酶活性随温度的升高而降低。在60℃时有64.2%残余酶活(设50℃时的酶活为100%),80℃时残余酶活降到43.6%。

从图2可见,在测定条件下,该酶在30℃处理90min以内酶活残留都保持在89%以上,在40℃下,

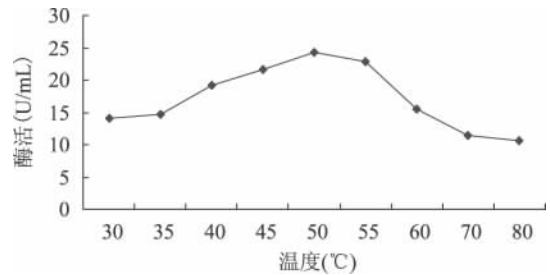


图1 酶的最适温度

处理90min以内酶活残留也基本都保持在85%以上,而在50℃处理15min残余酶活在58.7%,处理30、60、90min残余酶活分别为46.7%、41.2%、30.6%,在60℃下处理15min残余酶活仅剩20.3%,处理60、90min酶活基本全部损失,70℃处理15min残余酶活仅剩11.4%,此后延长处理时间酶活也基本全部损失,可见在低于40℃条件下该酶较稳定。说明该酶对温度很敏感,抗高温的能力较弱。

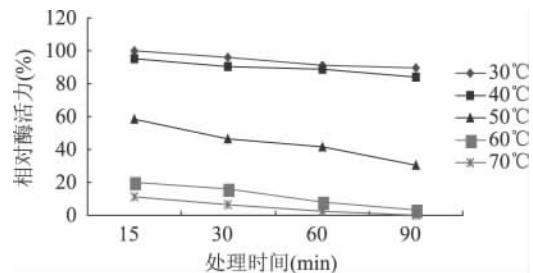


图2 酶的热稳定性

2.3.2 酶的最适pH和pH的稳定性 每种微生物都有其最适pH和一定的pH范围。最适pH实验结果见图3,可以得出实验所得木聚糖酶的最适作用pH为5.4。

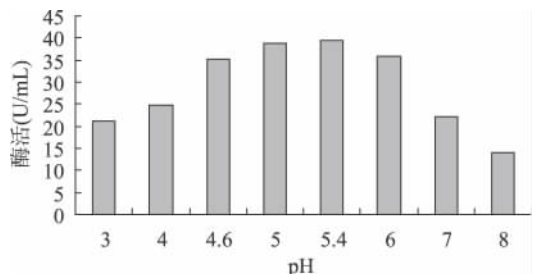


图3 酶的最适pH

pH的稳定性实验结果如图4,可以得出该木聚糖酶在pH3.0~11.0之间处理1h后恢复至pH5.4,酶活性均可恢复至85%以上,说明该酶对pH不敏感,对pH的稳定性较强。

2.3.3 不同金属离子对酶活的影响 用几种不同金属离子处理酶液后测定木聚糖酶活性,见图5。结果显示,在8mmol/L浓度下,所选取的几种金属离子对酶活性都有影响,Zn²⁺、Ca²⁺影响较小,酶活残留仍在

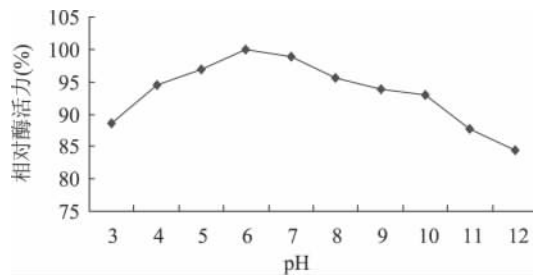


图4 酶的pH稳定性

80%以上; Ag^+ 、 MnO_4^{2-} 对酶活性影响较大,残留酶活分别为 58.7% 和 13.4%。

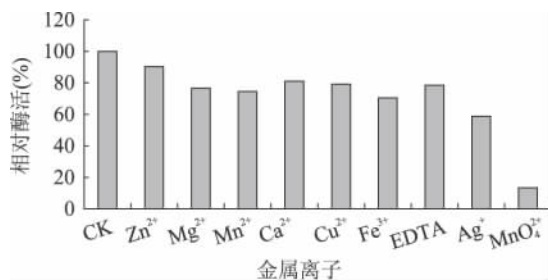


图5 金属离子对酶活的影响

3 结论

本研究的对象是白腐真菌,优化了该菌株的木聚糖酶产酶条件,并对其酶活性质进行了研究。该菌株产木聚糖酶的最适发酵条件为:碳源为5%的麸皮和玉米芯(1:1),氮源为0.5%的蛋白胨,培养温度为25℃,接种量为每50mL发酵液接4块菌丝块,发酵时间为8.5d,初始pH为6.0,通气量为发酵液占容积的1/3。酶液的硫酸铵沉淀采用60%饱和度时,所得的酶比活最高,达到26.88U/mg。在采用的测定条件下,该酶的最适作用温度是50℃;该酶对温度很敏感,抗高温的能力较弱,在低于40℃条件下,该酶较稳定。最适作用pH为5.4;该酶对pH不敏感,对pH的稳定性较强,在pH3.0~11.0之间处理1h后恢复至pH5.4,酶活性均可恢复至85%以上。金属离子在8mmol/L浓度下,对酶活性都有影响, Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 影响较小,酶活残留仍在80%以上; Ag^+ 、 MnO_4^{2-} 对酶活性影响较大,残留酶活分别为58.7%和13.4%。

参考文献

- [1] 岳晓禹,贺小营,牛天贵,等.木聚糖酶的研究进展[J].酿酒科技,2007,154(4):113-115.
- [2] Beg QK, M Kapoor, L Mahajan. Microbial xylanases and their industrial applications: a review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 326-338.
- [3] M L T M Polizeli, A C S Rizzatti, R Monti, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(5): 577-591.

[4] 李秀婷,余元莉,孙赞.链霉菌 F0107 液体发酵产木聚糖酶条件的优化 [J].农业机械学报,2009,40(7):153-157.

[5] 吴萍,史钧,骆丙国.真菌木聚糖酶产生菌的筛选及酶学性质研究 [J].食品科学,2009,30(1):159-163.

[6] 王晓晓,冯明光.利用生防真菌孢子粉生产中的废米生产饲用β-葡聚糖酶和木聚糖酶的黑曲霉固相发酵条件优化 [J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2009,35(1):39-44.

[7] 徐燕,田宝玉,黄建忠,等.木聚糖酶高产菌株的鉴定及产酶条件的优化 [J].生物技术,2009,19(1):51-54.

[8] 李富伟,汪勇,汤海鸥.重组毕赤酵母工程菌产木聚糖酶学性质的研究 [J].中国畜牧杂志,2009,45(3):43-45.

[9] 曹香林,王俊丽,聂国兴.康宁木霉产木聚糖酶的稳定性研究 [J].中国饲料,2009(16):41-44.

[10] 包怡红,李雪龙.木聚糖酶产生菌——类芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究 [J].中国食品学报,2008,8(2):36-41.

[11] 胡春霞,陆平,李卫芬.短芽孢杆菌耐碱性木聚糖酶(xylB)的分子生物学研究 [J].食品与生物技术学报,2009,28(1):86-90.

[12] Dobrev G T, Pishtiyski I G, Stanchev V S, et al. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design [J]. Bioresour Technol, 2007, 98(14): 2671-2678.

[13] Freixo M R, Karmalia A, Frazaoc Carlos, et al. Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates [J]. Process Biochem, 2008, 43(11): 1265-1274.

[14] Battana B, Sharmaa J, Dhimana S S, et al. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry [J]. Enzyme Microb Technol, 2007, 41(6-7): 733-739.

[15] Jacoba N, Asha Poornaa C, Prema P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus* [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(14): 6697-6701.

[16] Buswell JA, Chang ST. In Genetics and Breeding of Edible Mushrooms [J]. Gordon & Breach: Philadelphia, 1992, 37: 297-324.

[17] Jong SC, Donovick R. Antitumor and antiviral substances from fungi [J]. Adv Appl Microbiol, 1989, 34: 183-262.

[18] Mandels M, Sternberg D. Recent advance in cellulase technology [J]. J Ferment Technol, 1976, 54: 267-286.

[19] Miller G L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem, 1959, 31: 426-428.

[20] 岳晓禹,蔡青和,牛天贵,等.食用菌 *Pleurotus ostreatus* SYJ-012 产木聚糖酶的主要影响因素研究 [J].食品工业科技,2006,27(6):49-51.

权威·核心·领先·全面·实用