

木霉 No. 183 菌株木聚糖酶的研究*

解复红, 张克勤, 李文鹏

(云南大学 云南省工业微生物发酵工程重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:筛选到一株木聚糖酶高产木霉菌株(No. 183), 研究了该菌株产木聚糖酶的液态发酵和粗酶液的酶学性质. 结果表明, 以麸皮和木聚糖为主要碳源, 28 ℃, 190 r/min 摇瓶培养时, 木霉 No. 183 菌株在接种后 84 h 酶活最高, 达到 298.47 U/mL. 该木聚糖酶的最适反应温度为 50 ℃, 最适 pH 为该木聚糖酶在 pH 5~7 和 40 以下时相对稳定. Ca^{2+} , Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对该木聚糖酶有较强的促进作用, Fe^{3+} 和 Hg^{2+} 对该酶有较强的抑制作用.

关键词:木聚糖酶;木聚糖;木霉;酶活

中图分类号:Q 556.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2003)01-0081-04

木聚糖(β -1,4-xylan)是植物半纤维素的主要成分.它是自然界中含量仅次于纤维素的多糖,分别占被子植物和裸子植物干质量的 15%~30% 和 7%~12%^[1].木聚糖是吡喃木糖以 β -1,4-糖苷键连成主链的不均一多糖,侧链通常有 O-乙酰基, -L-呋喃阿拉伯糖基,葡糖醛酸基^[2].

完全降解木聚糖主要需要 2 种酶的参与:木聚糖酶(1,4- β -D-xylanase; EC3.2.1.8)和 β -木糖苷酶(1,4- β -xylosidase; EC3.2.1.27).木聚糖酶以内切的方式水解 β -1,4-糖苷键, β -木糖苷酶从木寡糖的非还原端切下木糖^[3].

木聚糖酶是一种重要的工业用酶,它可广泛被用于饲料、食品和酿造工业.自从 1989 年 Viikari 发现木聚糖酶可以用于对纸浆的漂白以来,国内外对木聚糖酶研究和开发越来越关注,主要原因是用木聚糖酶对纸浆进行预处理后,可大大减少后续漂白过程中氯化物的用量,降低环境的污染.近年来有关木聚糖酶对纸浆漂白的研究文献有很多^[5,6].

许多真菌、细菌和放线菌都能产生木聚糖酶,真菌中木霉属(*Trichoderma*)的许多种是木聚糖酶的高产菌.我们从保藏于云南省工业微生物发酵工程重点实验室的 400 多株木霉菌株中筛选到了一株木聚糖酶高产的木霉菌株(No. 183).本文介绍了该菌株的产酶特性及其木聚糖酶的一些性质.

1 材料和方法

1.1 菌种 木霉(*Trichoderma* sp.) No. 183.

1.2 化学试剂和仪器 桦木木聚糖(birchwood xylan)购自 Sigma 公司,其他药品和试剂均为国产分析纯.721-100 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),pHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂),HZQ-10 全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司).

1.3 培养基和培养条件

(1) 斜面种子培养基: PDA 培养基.

(2) 发酵产酶培养基(g/L): 麸皮 10;木聚糖 8;蛋白胨 6;酵母浸膏 1.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5; Tween 80 2.0; CaCl_2 0.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3; KH_2PO_4 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014; CoCl_2 0.002; 自然 pH.

(3) 培养条件: 500 mL 三角瓶装发酵培养基 100 mL, 190 r/min, 28 ℃ 培养 4 d.

1.4 粗酶液的制备 在 4 ℃ 的条件下将发酵液 10 000 r/min 离心 6 min, 上清液即为粗酶液.

1.5 木聚糖酶活力测定 在 25 mL 刻度试管中加入 1.8 mL 0.01 g/mL 用乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.8)配制的木聚糖溶液, 50 ℃ 水浴保温 5 min, 加入适当稀释的酶液 0.2 mL, 50 ℃ 水浴保温 10

* 收稿日期: 2002-09-20

基金项目: 云南省科技攻关资助项目(2001GG24).

作者简介: 解复红(1973-), 男, 湖北人, 硕士生, 主要从事微生物酶方面研究.

min. 加入 DNS(3,5-二硝基水杨酸)试剂 2 mL, 沸水浴保温 5 min, 冷却后加入蒸馏水 21 mL, 摇匀, 540 nm 测 OD 值. 每分钟产生相当于 $1 \mu\text{mol}$ 还原糖(以木糖计)的酶量定义为一个酶活力单位(U).

1.6 产酶历程 接种培养后每隔 12 h 取样一次测酶活, 用 pH 计测发酵液的 pH 值.

1.7 温度对木聚糖酶活力的影响 分别在 30~80 的水浴条件下测木聚糖酶活力

1.8 木聚糖酶的耐热性试验 木聚糖酶液分别在 30~80 水浴中保温 1 h, 冷却后按常规条件测定酶活力.

1.9 pH 对木聚糖酶活力的影响 分别用不同 pH 的 0.1 mol/L 柠檬酸钠和 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制 0.01 g/mL 的木聚糖溶液, 然后按常规条件测定酶活力.

1.10 木聚糖酶的 pH 稳定性试验 用上述不同的 pH 缓冲液稀释酶液, 在 40 水浴中保温 4 h, 然后按常规条件测定酶活力.

1.11 金属离子和其他试剂对木聚糖酶活力的影响 在木聚糖酶液中加入不同的化合物, 使最终反应体系中化合物的浓度为 1 mmol/L, 在 40 水浴中保温 30 min, 然后按常规条件测定酶活力.

2 结果和讨论

2.1 产酶历程和 pH 的变化情况 从图 1 中可以看出, 接种后 24 h 内几乎不产酶, 24 h 后, 酶活开始上升, 第 60~84 小时产酶最多, 84 h 以后产酶量逐渐下降. 在发酵过程中, pH 值逐渐升高.

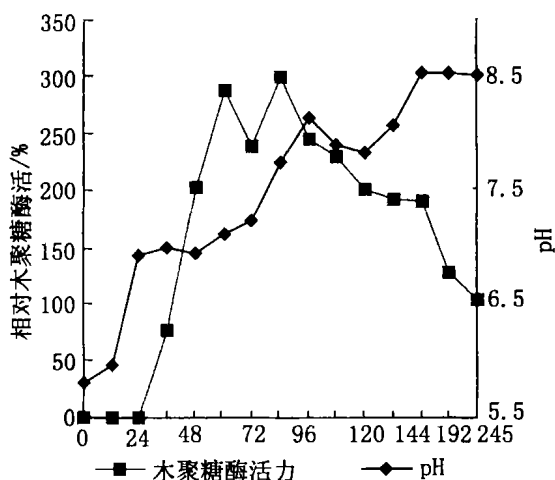


图 1 产酶曲线和 pH 变化情况

Fig. 1 Time course of xylanase production and pH variation

2.2 温度对酶活的影响 从图 2 中可以看出, 木聚糖酶的最适反应温度为 50, 60 时酶活保持在 55%, 70 时下降很快, 仅为 10.7%.

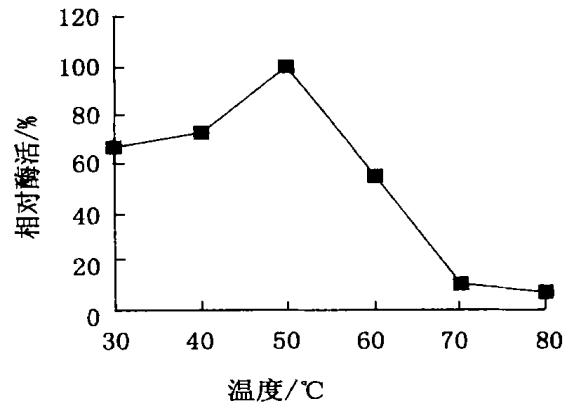


图 2 温度对木聚糖酶活力的影响

Fig. 2 The effect of temperature on the activity of xylanase

2.3 木聚糖酶的热稳定性 如图 3 所示, 木聚糖酶在 40 时比较稳定, 酶活力保持在 97.1%, 50 以上时酶活不稳定.

2.4 pH 对木聚糖酶活力的影响 如图 4, 木聚糖酶的最适反应 pH 为 6, pH 5 时相对酶活为 94.3%, pH 7 时为 63.8%.

2.5 木聚糖酶的 pH 稳定性 如图 5 所示, pH 在 5~8 的范围内, 相对酶活力保持在 82% 以上.

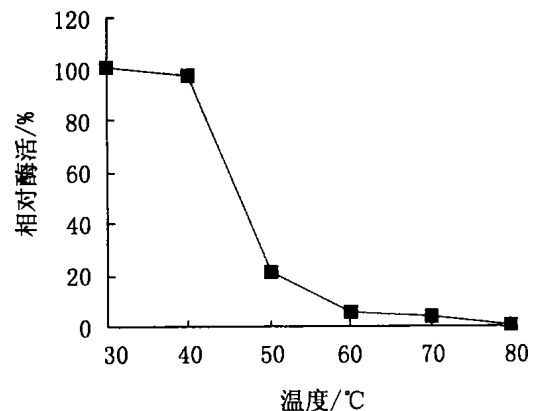


图 3 木聚糖酶的耐热性试验

Fig. 3 Thermostability of xylanase

2.6 金属离子和有机化合物对木聚糖酶活力的影响 如表 1 所示, Fe^{2+} , Ni^{2+} , - 巯基乙醇对酶既无促进又无抑制作用. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA, 尤其 Cu^{2+} 对酶有促进作用. Fe^{3+} 和 Hg^{2+} 对酶有较强的抑制作用.

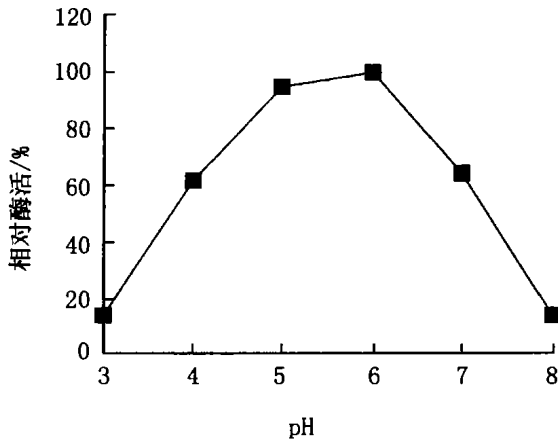


图 4 pH对木聚糖酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on xylanase activity

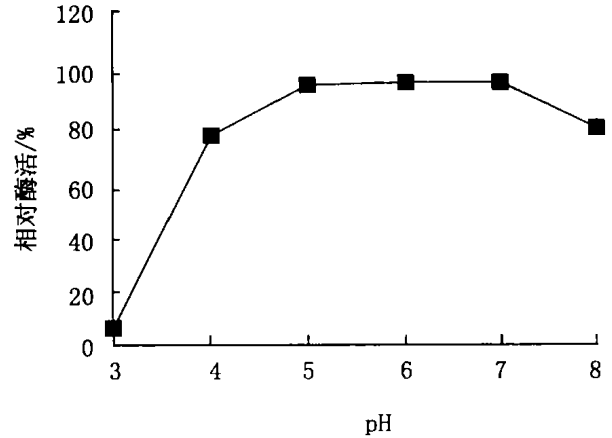


图 5 木聚糖酶的 pH稳定性

Fig. 5 pH stability of xylanase

表 1 化合物对木聚糖酶活力的影响

Tab. 1 Effect of ions and compounds on xylanase activity

化合物	相对酶活/ %	化合物	相对酶活/ %
Control	100	CaCl ₂	112.5
FeSO ₄	106.3	ZnCl ₂	116.3
FeCl ₃	20	HgCl ₂	45
CuSO ₄	137.5	CoCl ₂	106.3
NiCl ₂	100	EDTA	118.8
MnCl ₂	97.5	- ME	100
MgCl ₂	125		

2.7 小结 木霉 No. 183 木聚糖酶与温度及 pH 的关系表明,该酶为中温、酸性木聚糖酶。虽然其最适温度为 50 ,但由于 50 时酶的稳定性差,故使用时,反应温度控制在 40 为好。该酶对 pH 的耐受范围为中性偏酸,反应 pH 控制在 5~6 之间为宜。

致谢:吴文平先生为本课题的研究提供了许多资料,特此致谢!

参考文献:

[1] WONG K K Y, TAN L U L, SADDLER J N. Multiplicity of 1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications [J]. Microbiology Reviews, 1988, 52:

305—317.
 [2] KUL KARNI N, SHEND YE A, RAO M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23:412—416.
 [3] NAKAMURA S, YASHI K W, NAKAI R, et al. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59:2311—2316.
 [4] 孙建义,李卫芬,许梓荣. 里氏木霉 GXC 木聚糖酶的研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(2):184—190.
 [5] GARGA P, MCCATHY AJ, ROBERTS J C. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18:261—267.
 [6] GUPTA S, BHUSHAN B, HOONDAL G S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88:325—334.
 [7] 刘超纲,勇强,周庆庆,等. 里氏木霉选择性合成木聚糖酶的研究() [J]. 林产化学与工业, 1999, 19(2):8—12.
 [8] 洪枫,陈牧,勇强,等. 里氏木霉制备木聚糖酶的产酶历程[J]. 江苏:南京林业大学学报, 1998, 22(1):31—361.
 [9] CHEN H, CHEN Jan - lin, LIN T. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21:91—96.

Studies on the crude xylanase produced by *Trichoderma* sp. No. 183

XIE Fu-hong , ZHANG Ke-qin , LI Wen-peng

(Key Laboratory of Industrial Microbiology & Fermentation Technology
of Yunnan , Yunnan University , Kunming 650091 ,China)

Abstract : The enzymological characteristics of crude xylanase produced by *Trichoderma* strain 183 with high xylanase productivity were studied with the following results : cultured on the medium with wheat bran and xylan as the main carbon resource , under 28 and 190 r/ min shaking , the pH and enzyme activity of the broth kept increasing with the growth of strain 183 , the enzyme activity reached its peak at hour 84 after inoculation , up to 298.47 U/ mL . The enzyme has optimal reactive conditions of 50 and pH 6 , though the enzyme is relatively stable under 40 and pH 5 ~ 7 . Fe^{2+} and Hg^{2+} strongly inhibited the activity of this enzyme , while Zn^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} evidently promoted the activity .

Key words : xylan ; xylanase ; *Trichoderma* ; enzyme activity