

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.

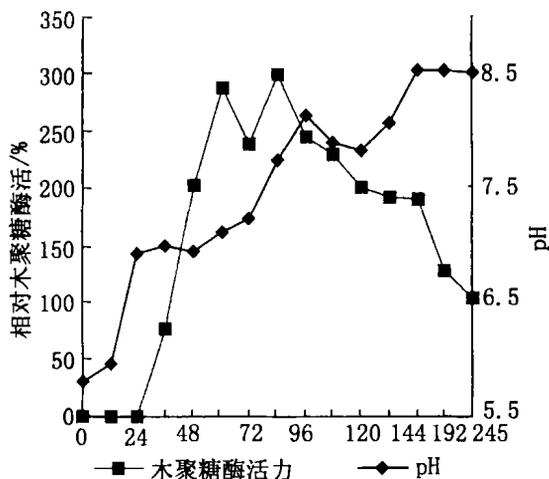


图 1 产酶曲线和 pH 变化情况

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%.

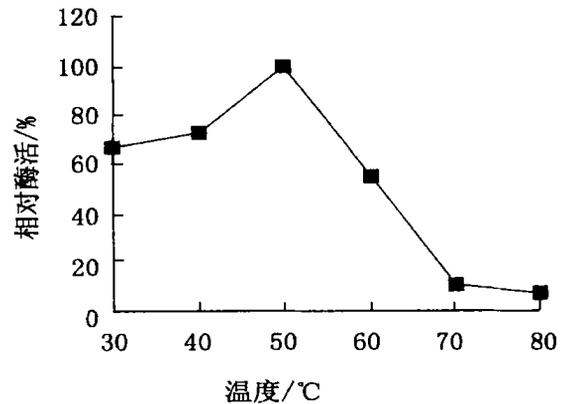


图 2 温度对木聚糖酶活力的影响

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.

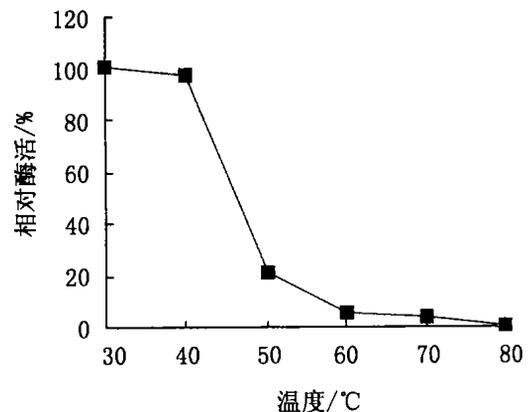


图 3 木聚糖酶的耐热性试验

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.

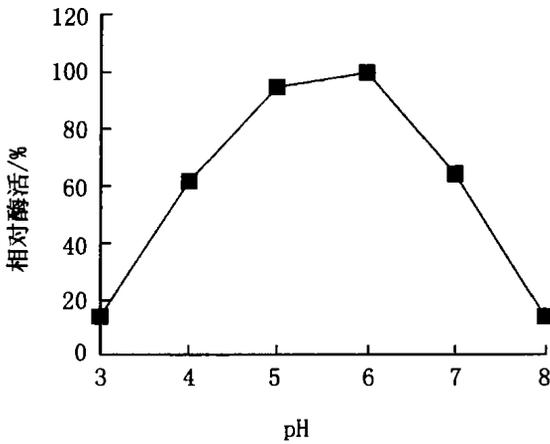


图 4 pH对木聚糖酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on xylanase activity

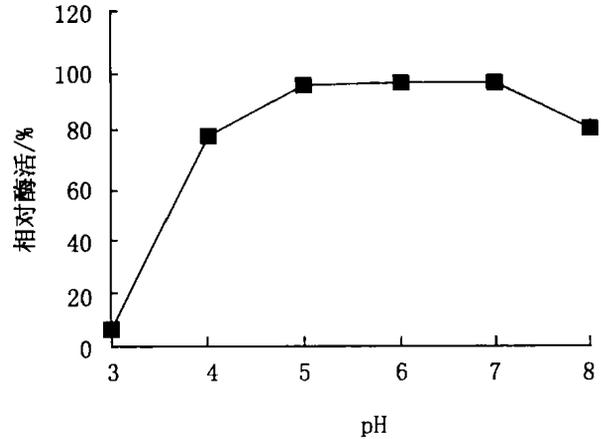


图 5 木聚糖酶的 pH稳定性

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 A J, 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