

碳氮比对里氏木霉合成木聚糖酶的影响*



毛连山, 宋向阳, 勇 强, 姚春才, 余世袁

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

MAO L S

摘 要: 以里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut G-30 为产酶菌, 研究了不同碳氮比对木聚糖酶合成的影响。结果表明, 低碳氮比有利于促进内切 β -木聚糖酶的合成, 抑制外切 β -木糖苷酶的合成, 有利于选择性合成低外切 β -木糖苷酶活的内切 β -木聚糖酶。高碳氮比使得木聚糖酶的合成滞后, 能够有效地抑制纤维素酶的合成, 提高木聚糖酶活与纤维素酶活的比值, 有利于选择性合成低纤维素酶活的木聚糖酶。

关键词: 里氏木霉; 木聚糖酶; 纤维素酶

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2002)02-0041-04

木聚糖酶是降解木聚糖半纤维素的一组酶的总称, 它主要包括作用于主链的内切-1, 4 β -木聚糖酶和外切 β -木糖苷酶, 以及降解支链取代基的辅助酶^[1], 而且以木质纤维材料为碳源时微生物往往同时会合成木聚糖酶和纤维素酶。对于不同的应用要求, 应选用不同的木聚糖酶酶系。低聚木糖生产用木聚糖酶, 要求不含外切 β -木糖苷酶或外切 β -木糖苷酶活很低, 这样才能得到高得率高纯度的低聚木糖产品^[2]。纸浆漂白用木聚糖酶, 要求不含纤维素酶或纤维素酶活很低, 因为在纸浆漂白过程中少量纤维素酶对漂白浆强度有一定的损伤^[3]。因此如何培养出低纤维素酶活的木聚糖酶已成为木聚糖酶在制浆造纸工业中应用的关键技术。

在木聚糖酶的制备过程中, 碳源的种类是影响微生物酶合成的重要因素^[4]。碳氮比大小也是影响微生物酶合成的重要因素, 碳氮比过低易出现微生物因氮源过多而生长过旺, 造成对碳源消耗过快, 导致酶合成水平下降; 碳氮比过高则易造成微生物因氮源不足而生长缓慢, 生命力减弱, 也不利于酶的合成。微生物酶的合成一般都有一个较合适的碳氮比范围, 碳氮比的大小不仅直接影响酶的活力和产率, 而且影响酶系的组成。笔者以粗木聚糖为产酶碳源, 里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut G-30 为菌种, 通过碳氮比的调控可分别产生低外切 β -木糖苷酶活的木聚糖酶和低纤维素酶活的木聚糖酶, 更好满足不同生产的需求。

1 材料与方法

1.1 菌种

产酶菌为里氏木霉 Rut G-30, 接种在马铃薯、木糖、琼脂试管斜面上, 在 28 °C 恒温培养 6~8 d 后, 于 4 °C 下保存备用。

1.2 粗木聚糖的制备

* 收稿日期: 2002-01-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070636)

作者简介: 毛连山(1970-), 男, 江苏兴化人, 讲师, 博士生, 从事林产生物化学加工研究。

一定量的玉米芯粉(风干重)用水抽提,然后按固液比 1:10 加入 5%~10% 的碱液,于 100 ℃左右抽提 30~60 min。抽提液经酸中和、离心洗涤、超滤脱盐后可获得湿样粗木聚糖,经纯度测定后作产酶碳源和木聚糖酶降解底物备用。

1.3 木聚糖酶的微生物培养

菌丝生长培养基和产酶培养基均按 Mandels^[5] 营养液配制,用 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液调 pH 值为 4.8。一定碳源、氮源组成的合成培养基经高温灭菌(121~125 ℃, 20~30 min)并冷却后,按体积接种量 5%~10% 接入培养 2 d 左右的菌丝悬浮液,放入旋转式恒温振荡器中于 28~30 ℃、150~170 r/min 下进行培养。培养过程中定期取样,样液于 2 000 r/min 下离心 20 min 后所得的清液即为粗木聚糖酶液。酶液装试剂瓶中密封后冷冻保存。

1.4 木聚糖酶水解

酶解条件和酶解得率的计算方法同文献[4]。

1.5 测定方法

木聚糖酶活的测定:0.5 mL 经适当稀释的酶液和 1 mL 用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液配制的质量浓度为 1% 的桦木木聚糖(Sigma 公司制造)悬浮液混合,于 50 ℃下保温 30 min,以 1 min 生成 1 μmol 还原糖(木糖为标准,采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[6]测定)为一个木聚糖酶活单位。纤维素酶活以羧甲基纤维素酶活计,其测定方法同文献[4],但以羧甲基纤维素(CMC)为底物。

2 结果与讨论

2.1 碳氮比对木聚糖酶合成的影响

以粗木聚糖为碳源,尿素、硫酸铵和蛋白胨按一定的比例组成混合氮源,配制成不同碳氮比(C/N)的合成培养基,进行摇瓶培养,实验结果见表 1。产酶条件:碳源质量浓度为 7.0 g/L,初始 pH 值 4.8,温度 28~30 ℃,150~170 r/min 转速下摇瓶培养,时间 3 d。

表 1 碳氮比对木聚糖酶合成的影响

Table 1 Effects of ratio of carbon to nitrogen on xylanase synthesis

碳氮比 C/N	木聚糖酶活/(IU mL ⁻¹) xylanase activity	CMC 酶活/(IU mL ⁻¹) CMCase activity	木聚糖酶活与纤维素酶活比 ratio of xylanase activity to CMCase activity
3.3	97.50	0.246	396
4.0	101.22	0.249	407
4.5	117.49	0.278	423
6.0	120.84	0.284	425
7.2	126.24	0.290	435
8.0	111.06	0.205	542
10.0	94.67	0.134	706

由表 1 可知:随着碳氮比的增加,木聚糖酶活值先上升后下降,这说明木聚糖酶的合成存在一个较合适的碳氮比范围。以粗木聚糖为碳源,里氏木霉合成木聚糖酶的较适碳氮比为 7.2 左右。同时可以看出,随着碳氮比的增大,木聚糖酶活和 CMC 酶活的比值增大,当碳氮比由 3.3 增大到 10.0 时,酶活比由 396 提高到 706,这说明高碳氮比不仅抑制里氏木霉合成木聚糖酶,而且更有效抑制 CMC 酶活的合成,致使酶活比提高,从而有利于选择性合成低纤维素酶活的木聚糖酶。

2.2 不同碳氮比合成木聚糖酶的历程

为了比较不同碳氮比的产酶历程,本实验分别进行了较低碳氮比 3.3、最适碳氮比 7.2 和较高碳氮比 10.0 的产酶历程试验,试验结果见图 1(产酶条件同表 1)。

由图 1 可以看出:以粗木聚糖为碳源,当碳氮比为 3.3 时对木聚糖酶的合成不利,这说明碳氮比过低易出现微生物因氮源过多而生长过旺,造成对碳源消耗过快,导致酶合成水平下降;当碳氮比为 7.2

时对木聚糖酶和纤维素酶的合成均有利; 当碳氮比为 10.0 时木聚糖酶活达到最大值所需时间较长, 并且能有效地抑制 CMC 酶活的合成。Hmove 及 Bielely 等人认为^[7], 酶的合成同时受酶诱导物和酶蛋白质前体的调控, 酶蛋白质的前体主要来自于氮源, 而诱导物主要来自于可利用的碳源。当合成酶蛋白质的前体缺少时, 酶的合成更加严格地受微生物所利用的碳源的诱导调控。在高碳氮比培养下, 由于存在的氮源很少, 合成酶蛋白质的前体也就很少, 因此, 酶的合成主要受可利用的碳源调控。粗木聚糖为碳源产酶, 微生物总是首先利用其中易消化的木聚糖, 因此在产酶前期酶的合成主要受木聚糖的诱导调控而主要合成木聚糖酶。在产酶中后期由于 pH 值的上升对纤维素酶的合成具有抑制作用, 导致纤维素酶的合成量下降。

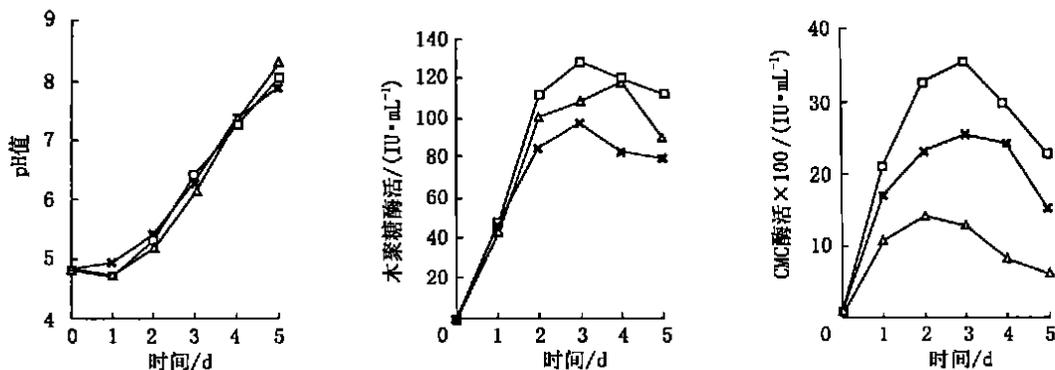


图 1 不同碳氮比产酶历程中各参数的变化

Fig. 1 Changes of parameters in the process of enzyme production at different ratios of carbon to nitrogen
 —x— 碳氮比 C/N 3.3; —□— 碳氮比 C/N 7.2; —△— 碳氮比 C/N 10.0

2.3 不同碳氮比合成的木聚糖酶酶解结果

木聚糖酶酶系的组成比较复杂, 不同组成的培养条件也有差异。有研究认为在培养过程中培养条件不断发生变化, 酶系中各种酶的比例也有所变化, 初始 pH 值 4.0 时不仅有利于内切木聚糖酶的合成, 更有利于外切木糖苷酶的合成, 并且培养初期微生物主要合成内切木聚糖酶^[8]。那么碳氮比的不同可能也会导致酶系的组成有所变化, 将不同碳氮比第三天合成的木聚糖酶进行酶解试验, 试验结果见表 2。其中, 酶解条件为: 温度 50 °C, 酶量 120 IU/g 木聚糖, 酶解时间 2 h, 振荡速度 80 r/min。

表 2 不同碳氮比所产的木聚糖酶酶解粗木聚糖的结果

Table 2 Result of enzymatic hydrolysis by xylanase synthesized at different C/N ratios

碳氮比 C/N	酶解得率/% yield of enzymatic hydrolysis			低聚糖/木糖 ratio of xylo-oligosaccharides to xylose	低聚糖/总糖 percentage of xylo-oligosaccharides in total sugar/%
	木糖 xylose	低聚糖 xylo-oligosaccharides	总糖 total sugar		
3.3	5.20	16.27	21.47	3.13	75.78
4.0	3.38	17.65	21.03	5.22	83.92
4.5	5.88	13.81	19.69	2.35	70.14
6.0	5.96	12.99	18.95	2.18	68.56
7.2	5.86	12.83	18.69	2.19	68.65
8.0	6.46	12.59	19.05	1.95	66.09
10.0	5.06	8.31	13.37	1.64	62.15

由表 2 数据可知: 碳氮比越低, 合成的木聚糖酶酶解自制的粗木聚糖时酶解得率越高, 并且低碳氮比合成的木聚糖酶酶解产物中低聚糖的含量较高, 其中碳氮比为 4.0 时合成的木聚糖酶酶解产物中低聚糖的比例最高。这说明低碳氮比有利于内切-β-木聚糖酶的合成, 其中碳氮比为 4.0 时最有利于内

切- β 木聚糖酶的合成。高碳氮比合成的木聚糖酶酶解产物中低聚糖的比例较低,这说明高碳氮比有利于外切- β 木糖苷酶的合成。

3 结论

3.1 以粗木聚糖为碳源,里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶的较适碳氮比为7.2左右。

3.2 低碳氮比有利于促进内切- β 木聚糖酶的合成,抑制外切- β 木糖苷酶的合成,有利于选择性合成低外切- β 木糖苷酶活的内切- β 木聚糖酶。该酶系的组成适合于低聚木糖生产。

3.3 高碳氮比使得木聚糖酶的合成滞后,能够有效的抑制纤维素酶的合成,提高木聚糖酶活与纤维素酶活的比值,有利于选择性合成低纤维素酶活的木聚糖酶。该酶系的组成适合于纸浆漂白。

参考文献:

- [1] SADDLER J N. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues[M]. Oxford: CAB International, 1993. 131-182.
- [2] 洪枫. 里氏木霉合成木聚糖酶及制备功能性低聚木糖的研究[D]. 南京:南京林业大学, 1998. 50-60.
- [3] TOLAN J S. Pulp quality impact of contaminating cellulase in commercial xylanase preparations[J]. J Pulp & Paper Science, 1995, 21(4): 132-137.
- [4] 毛连山, 徐勇, 宋向阳, 等. 以酶解渣为碳源制备木聚糖酶的研究[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 33-38.
- [5] MANDELS M, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use condition[J]. Biotechnol Bioeng, 1981, 23: 2 009-2 026.
- [6] MILLER G I. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [7] HRMOVA M, BIELEY P, VRSANAKA M. Cellulose and xylan- degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *A. niger* [J]. Enzyme and Micobiol Technol, 1989, (11): 610-616.
- [8] 洪枫, 陈牧, 余世袁. 木聚糖酶最适 pH 值的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2000, 8(2): 13-17.

EFFECTS OF THE RATIO OF CARBON TO NITROGEN ON XYLANASE SYNTHESIS BY *TRICHODERMA REESEI* RUT G-30

MAO Lian-shan, SONG Xiang-yang, YONG Qiang, YAO Chun-cai, YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Effects of different ratios of carbon to nitrogen on xylanase synthesis by *Trichoderma reesei* Rut G-30 were studied. The results indicated that low ratio of carbon to nitrogen could stimulate the synthesis of endo-1, 4- β -D-xylanase and depress the synthesis of exo- β -xylosidase, which enhanced the synthesis of xylosidase-poor xylanases. High ratio of carbon to nitrogen could not only retard the synthesis of xylanase, but also depress the synthesis of cellulase and increase the ratio of xylanase to cellulase, therefore enhanced the synthesis of cellulase-poor xylanase.

Key words: *Trichoderma reesei*; xylanase; cellulase