

# 以酶解渣为碳源制备木聚糖酶的研究\*



毛连山, 徐 勇, 宋向阳, 勇 强, 余世袁

(南京林业大学 化工学院, 江苏 南京 210037)

MAO L S

摘 要: 以里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut G-30 为产酶菌, 低聚木糖制备过程中酶解渣为碳源可诱导产生含低纤维素酶活(0.106 IU/mL)的木聚糖酶(154.67 IU/mL), 两种酶活的比值达 1 459, 与粗木聚糖为碳源产木聚糖酶相比, 木聚糖酶活提高了 1.67 倍, 而纤维素酶活没有增加。此酶在 50 ℃ 条件下酶解粗木聚糖和酶解渣时, pH 值 5 时酶解效率最高, 酶解产物通过 HPLC 分析, 主要是木糖。该酶系的组成主要是外切- $\beta$ -木糖苷酶。

关键词: 里氏木霉; 酶解渣; 木聚糖酶; 酶解

中图分类号: Q556; TS245.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2001)04-0033-06

木聚糖酶是降解半纤维素木聚糖的一组酶的总称, 它主要包括作用于主链的内切-1, 4- $\beta$ -木聚糖酶和外切- $\beta$ -木糖苷酶, 以及降解支链取代基的辅助酶<sup>[1]</sup>。近年来, 国际上十分重视对该酶的研究<sup>[2]</sup>, 这主要是该酶在轻工造纸、食品、能源、饲料以及环保等领域的应用正日益广泛, 尤其是用木聚糖酶定向酶解制得的低聚木糖是双歧杆菌增殖因子<sup>[3]</sup>, 潜力巨大。然而迄今为止, 木聚糖酶活力和产率均较低, 生产周期长, 成本高, 而且以木质纤维材料为碳源时微生物所产生的木聚糖酶等胞外酶中含有纤维素酶是普遍现象, 木聚糖酶漂白中少量纤维素酶对漂白浆强度有一定的损害<sup>[4]</sup>。这些都严重阻碍了其工业化的应用, 如何提高木聚糖酶活力和产率, 降低生产成本以及降低纤维素酶活力已成为亟待解决的重大课题。

在木聚糖酶的制备过程中, 充当碳源的物质不但是微生物生长代谢的能量来源, 而且也是酶合成诱导物的重要来源。碳源的类型和性质不仅直接影响酶的活力和产率, 而且影响酶系的组成。笔者以低聚木糖制备过程中酶解渣为产酶碳源, 里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut G-30 为菌种, 可产生低纤维素酶活的木聚糖酶, 而且该木聚糖酶的酶系的组成主要是外切- $\beta$ -木糖苷酶。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

\* 收稿日期: 2001-02-28

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。

产酶菌为里氏木霉 Rut G 30, 接种在土豆斜面培养基上, 于 4 °C 下保存。

### 1.2 粗木聚糖的制备

玉米芯粉在一定温度下经水和碱抽提, 抽提液通过中和、洗涤、超滤脱盐后得到粗木聚糖, 木聚糖浓度为 46.14 mg/mL。

### 1.3 酶解渣的制备

粗木聚糖通过木聚糖酶(主要是内切 1,4-β-木聚糖酶)酶解生产低聚木糖后的剩余物, 其主要成分是木聚糖, 浓度为 48.88 mg/mL。

### 1.4 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<sup>[5]</sup> 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灭菌冷却后, 接入在生长培养基中培养 2 天的里氏木霉菌丝悬浮液, 于 28~30 °C、150~170 r/min 下进行摇瓶培养。定期取样, 离心(2000 r/min, 10 min)收集上清液, 装试剂瓶后于冰箱中保存。

### 1.5 木聚糖酶水解

酶解条件为: 木聚糖溶液 10 mL(浓度为 46.14 mg/mL), 酶液量 2%(木聚糖酶活为 180.46 IU/mL), 用不同 pH 值柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释至总体积 20 mL, 在 50 °C 条件下水解一定的时间, 水解液经适当稀释, 用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定总还原糖浓度, 进一步计算酶解得率:

$$\text{酶解得率}(\%) = \frac{\text{还原糖质量}(\text{g}) \times 0.9 \times 100}{\text{木聚糖体积} \times \text{纯度}}$$

木糖的测定采用 HPLC 法, 计算木糖得率:

$$\text{木糖得率}(\%) = \frac{\text{木糖质量}(\text{g}) \times 0.9 \times 100}{\text{木聚糖体积} \times \text{纯度}}$$

### 1.6 测定方法

总还原糖的测定采用 DNS 法<sup>[6]</sup>; 可溶性蛋白质浓度的测定采用 Bio-Rad 公司标准测定法<sup>[7]</sup>; 木聚糖酶活测定: 0.5 mL 经适当稀释的酶液和 1 mL 用 0.05 mol/mL 柠檬酸缓冲液配制的 1%(质量/体积)的桦木木聚糖(Sigma 公司制造)悬浮液混合, 于 50 °C 下保温 30 min, 以 1 min 生成 1 μmol 还原糖(木糖为标准)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, 其测定方法同上, 但以羧甲基纤维素(CMC)为底物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解渣浓度对产木聚糖酶的影响

以酶解渣作碳源可产生较高活力的木聚糖酶, 且纤维素酶活较低。为了进一步提高木聚糖酶活, 适当提高碳源的浓度是必要的, 但随着碳源浓度的提高同时会产生一些负面效应。表 1 是不同酶解渣浓度下的产酶结果。

如表 1 中结果, 当碳源的浓度由 5 g/L 提高到 7 g/L 时, 木聚糖酶提高到 180.46 IU/mL; 进一步提高酶解渣浓度, 木聚糖酶活有所提高, 但提高的幅度不大。对此可作如下解释: 木聚糖酶的合成量与诱导物存在的时间有关, 延长诱导物存在的时间可提高木聚糖酶活。但成倍的增大酶解渣的浓度并没有成倍延长产酶的时间, 主要是由于酶解渣浓度的提高将使微生物生物量增大, 从而导致酶解渣消耗的速度加快, 因而酶解渣的有效利用率降低, 木聚糖酶得率下降。另外, 随着碳源浓度的提高, 碳氮比也上升, 任何微生物酶的合成一般都有

一个合适的碳氮比范围, 碳氮比过低易出现微生物因氮源过多而生长过旺, 造成对碳源的消耗过快, 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。

表 1 酶解渣木聚糖浓度对木聚糖酶合成的影响\*

Table 1 Effect of concentration of xylan in residue of enzymatic hydrolysate on synthesis of xylanase

酶解渣木聚糖浓度 concn. of xylan in residue of enzymatic hydrolysis (g/L)	碳氮比 ratio of carbon to nitrogen	木聚糖酶活 xylanase activity (IU/mL)	CMC 酶活 CMCase activity (IU/mL)	酶活比 ratio of xylanase activity to CMCase activity	木聚糖酶产量 yield of xylanase (IU/g 木聚糖) (IU/g xylan)
5	4.5	154.60	0.178	868.5	30920
7	6.0	180.46	0.282	639.9	25780
10	8.2	182.73	0.314	581.9	18273

\* 培养条件: 初始 pH 值 4.8, 28~30 °C 摇瓶培养, 培养时间为 3 d

从表 1 还看出, 随着酶解渣浓度的提高, 由于带入的纤维素的增加, CMC 酶活也上升, 导致木聚糖酶活和 CMC 酶活的比值不断下降, 由此可见, 维持低碳源浓度培养有利于提高木聚糖酶的得率和纯度。

## 2.2 酶解渣产酶和粗木聚糖产酶的比较

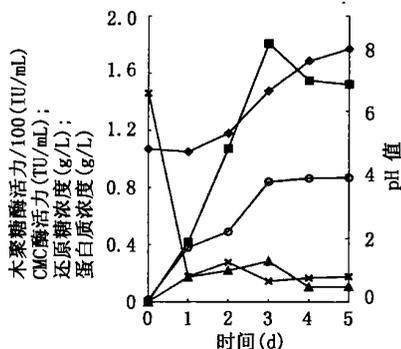


图 1 酶解渣产酶历程中各参数的变化

Fig. 1 Variation of parameters in the process of enzyme production from residue of enzymatic hydrolysis

—■—木聚糖酶活力 xylanase activity; —▲—CMC 酶活力 CMCase activity; —×—还原糖浓度 concn. of reduce sugar; —●—蛋白质浓度 concn. of protein; —◆—pH 值 pH value

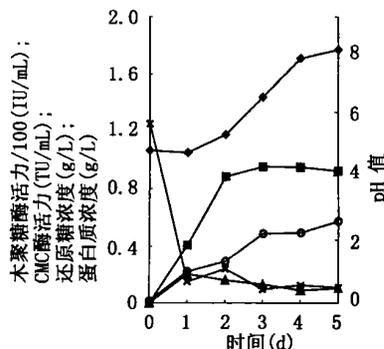


图 2 粗木聚糖产酶历程中各参数的变化

Fig. 2 Variation of parameters in the process of enzyme production from coarse xylan

—■—木聚糖酶活力 xylanase activity; —▲—CMC 酶活力 CMCase activity; —×—还原糖浓度 concn. of reduce sugar; —●—蛋白质浓度 concn. of protein; —◆—pH 值 pH value

由图 1 和图 2 产酶历程的实验数据比较可以得出如下相同点和不同点。

2.2.1 相同点 产酶第 1 天内, 由于培养液中营养条件较好, 菌丝细胞主要是增殖, 通过显微镜观察发现菌丝体比较饱满, 而且浓度较高, pH 值略有下降, 在这一阶段, 培养液中的木糖含量迅速下降, 消耗率达 85% 左右, 胞外蛋白质浓度有所上升, 但浓度维持在低水平, 木聚糖酶活力上升很快, CMC 酶活力上升也较快, 但活力维持在低水平。产酶第 2 天内, 菌丝细胞通过显微镜观察仍然比较饱满, pH 值明显上升, 木聚糖酶活力上升迅速, 培养液中的木糖含量有所上升, 这主要是木聚糖酶酶解木聚糖所产生。产酶第 3 天内, 菌丝细胞通过显

显微镜观察开始死亡,菌丝体浓度下降, pH 值明显上升,此时,木聚糖酶活力上升迅速,CMC 酶活力有所下降,主要此时的 pH 值抑制微生物产生 CMC 酶,却能够促进微生物产生木聚糖酶。产酶后期,随着 pH 值的稳步上升,CMC 酶活力逐渐下降。

2.2.2 不同点 用酶解渣产酶,产酶第3天,胞外蛋白质大幅度上升,木聚糖酶活力也迅速上升,高达 180.46 IU/mL,随后又大幅度下降,降至 152.00 IU/mL,这可能是由于酶解渣中含有一定量的可溶性低聚木糖,诱导微生物合成大量的木聚糖酶。另外,用酶解渣产酶的最大 CMC 酶活值和最大木聚糖酶活同时到达,并且比用粗木聚糖产酶高(酶解渣产酶 CMC 酶活是 0.284 IU/mL,木聚糖产酶 CMC 酶活是 0.219 IU/mL),而且达到最大 CMC 酶活值的时间延迟了 2 d,这可能是由于酶解渣中的可溶性低聚木糖在培养液中存在的时间较长,除了能够促进微生物合成木聚糖酶外,对 CMC 酶的合成也有一定的促进作用。

### 2.3 酶解渣和粗木聚糖的酶水解

2.3.1 pH 值对酶水解的影响 配制不同 pH 值的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,取酶解渣所产的木聚糖酶液使其在 pH 4~6 和 50 °C 的条件下,分别以粗木聚糖和酶解渣为底物进行酶解反应,反应 4 h 后取酶解液做高效液相色谱分析和还原糖测定,实验结果见表 2。

表 2 pH 值对酶解的影响

Table 2 Effect of pH value on enzymatic hydrolysis

底物 substrate	pH 值 pH value	酶解得率 <sup>a</sup> (%) yield of enzymatic hydrolysis	糖得率 yield of sugar (%)			木糖低聚木糖 xylose-xylo- oligosaccharides
			木糖 xylose	低聚木糖 <sup>b</sup> * xylo-oligosaccharides	总糖 <sup>c</sup> ** total sugar	
酶解渣 residue of enzymatic hydrolysis	4	3.86	3.60	0.29	3.89	12.41
	5	13.40	10.64	2.34	12.98	4.55
	6	10.13	7.67	3.00	10.67	2.56
粗木聚糖 coarse xylan	4	6.39	5.28	0.74	6.02	7.14
	5	12.10	8.67	2.30	10.97	3.77
	6	9.08	6.37	2.47	8.84	2.58

\* 采用 DNS 法测得; \*\* 低聚糖指木二糖至木五糖之和; \*\*\* 总糖指木糖至木五糖之和; 酶量为 2% (体积比)

表 2 数据显示,酶解得率与总糖得率基本相符,说明总糖定义为木糖至木五糖之和基本可行,另外,试验数据还显示,木糖与低聚糖之比随着 pH 值的增加呈下降趋势,这表明与内切木聚糖酶相比,随着 pH 值的上升, pH 值对  $\beta$ -木糖苷酶的抑制作用更大。Poutanen K 等<sup>[8-10]</sup>在研究 pH 值对酶解结果影响时,发现  $\beta$ -木糖苷酶的最适 pH 值为 3.0~4.0,内切木聚糖酶的最佳 pH 值为 4.0~5.0,而且酶解效率较高,达 35%~42%,其中低聚木糖是主要产物。然而本研究的酶解产物中木糖的含量较高,而且酶解得率较低,这说明用酶解渣为碳源所产的木聚糖酶,其中外切  $\beta$ -木糖苷酶活力高,比例大,而内切  $\beta$ -木聚糖酶则相反。这种酶系的组成对木聚糖的酶解有很大的抑制作用,从而说明了在木聚糖酶解过程中内切  $\beta$ -木聚糖酶起主导作用,而外切  $\beta$ -木糖苷酶只起辅助作用。

2.3.2 时间对酶水解的影响 用酶解渣产的木聚糖酶对粗木聚糖进行酶解,不同的酶解时间所得到的产物有所不同,结果见图 3。

由图3可知,酶解初期,酶解产物有少量的低聚木糖生成,随着时间的延长,酶解产物中低聚木糖的量越来越少,酶解24 h时,低聚木糖几乎没有。从而进一步说明用酶解渣为碳源所产的木聚糖酶,其中外切 $\beta$ 木糖苷酶活力高,比例大,而内切 $\beta$ 木聚糖酶则相反。

### 3 结论

**3.1** 用酶解渣为碳源产木聚糖酶,当碳源的浓度为7 mg/mL时,木聚糖酶的酶活力最高,达180.46 IU/mL。

**3.2** 用酶解渣为碳源所产的木聚糖酶,其中外切 $\beta$ 木糖苷酶活力高,比例大,而内切 $\beta$ 木聚糖酶则相反。这种酶系的酶解木聚糖得到的产物主要是木糖,而低聚木糖较少。

**3.3** 在木聚糖酶酶解木聚糖的过程中,内切 $\beta$ 木聚糖酶起主导作用,而外切 $\beta$ 木糖苷酶只起辅助作用。

#### 参考文献:

- [1] SADDLER J N. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues[M]. Oxford, CAB International, 1993. 131-182.
- [2] TENKANEN M, et al. Two major xylanases of *Trichoderma reesei* [J]. Enzyme Microb Technol, 1992, (14): 566-574.
- [3] 徐勇,余世袁,江华,等.培养条件对低聚木糖增殖青春双歧杆菌的影响[J].林产化学与工业,2001,21(3):34-38.
- [4] TOLAN J S. Pulp quality impact of contaminating cellulase in commercial xylanase preparations[J]. J Pulp & Paper Science, 1995, 21(4): 132-137.
- [5] MANDELS M, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use condition[J]. Biotechnol Bioeng, 1981, 23: 2009-2026.
- [6] MILLER G I. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [7] 夏黎明.固定化里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut G-30合成纤维素酶的研究[D].南京:南京林业大学,1993.
- [8] POUTANEN K, et al. Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xy-lans[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28(4-5): 425-432.
- [9] DEKKER R F H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose[J]. Biotechnol Bioeng, 1983, 25(4): 1127-1146.
- [10] 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.

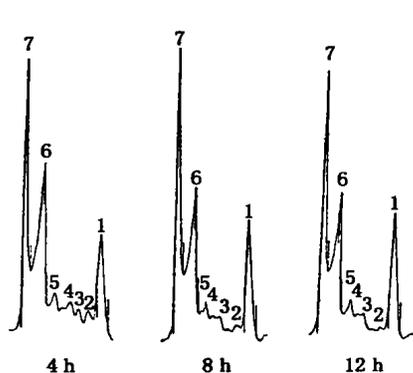


图3 时间对酶水解的影响

Fig. 3 Effect of time on enzymatic hydrolysis  
1. 木糖 xylose; 2. 木二糖 xylobiose; 3. 木三糖 xylo-triose; 4. 木四糖 xylotetraose; 5. 木五糖 xylopentaose; 6. 聚合度为6以上的低聚木糖 xylo-oligosaccharides (Dp > 6); 7. 木质素和酶蛋白等杂质 lignin and enzymoprotein

# STUDIES ON XYLANASES PRODUCTION WITH RESIDUE OF ENZYMATIC HYDROLYSIS AS CARBON SOURCE

MAO Lian-shan, XU Yong, SONG Xiang-yang, Yong qiang, YU Shi-yuan

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

**Abstract:** The residue of enzymatic hydrolysis was used as carbon source to obtain poor cellulase (0.106 IU/mL) xylanases (154.67 IU/mL) by *Trichoderma reesei* Rut G-30, and ratio of xylanase to cellulase activity was 1 459. Compared to coarse xylan, using the residue of enzymatic hydrolysis as carbon source, the obtained xylanase activity could be increased by 67%, while cellulase activity was not increased. When using the xylanases to hydrolyze coarse xylan and the residue of enzymatic hydrolysis at 50 °C, hydrolysis efficiency was highest at pH 5.0. The hydrolysis product was mainly xylose, as shown by HPLC analysis. The main component of the xylanases was  $\alpha$ -D-xylosidase.

**Key words:** *Trichoderma reesei*; residue of enzymatic hydrolysis; xylanases; enzymatic hydrolysis

## 欢迎订阅 2002 年下列刊物

《化学工业与工程技术》系国家科委批准、国内外公开发行的江苏省一级科技双月刊,刊号:ISSN 1006-7906/CN 32-1445/TQ,国际刊名代码CODEN HGGJFD。为国家级火炬计划项目:中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,国家级火炬计划项目、国家重点新产品:《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,以及《中国化学化工文摘》摘录期刊等,从1999年第1期起正式入选美国《化学文摘》(CA)。主要栏目有专论与综述、研究与开发、机械与设备、气体净化、调研报告、检测与分析、仪表与自动化、工厂实践等。可供从事化工与相关行业的工程技术人员、科学研究者及高校师生参阅。大16开,全年订价40元(含邮费),自办发行。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告。地址:210048 南京市大厂区葛关路699号南化集团研究院内;电话:(025)7057410;开户行:工商银行大厂支行;帐号:4301014909001048868;户名:南化集团研究院

《造纸科学与技术》是广东省造纸学会会刊,中国科技核心刊物之一,由广东省造纸学会、广东省造纸研究所、华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室合办。该刊于1996年7月起入编《中国学术期刊(光盘版)》,并荣获《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》全文收录证书;《中国学术期刊综合评价数据库来源期刊证书》。双月刊,逢双月底出版,大16开本,全年订费36元(含邮寄费)。订阅者可通过银行或邮局汇款至《造纸科学与技术》编辑部订阅。汇款时请写清楚单位名称、地址、邮编及收件人姓名。欢迎订阅!欢迎刊登各类广告! 订阅地址:510640 广州市华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室《造纸科学与技术》编辑部;电话:(020)87113940,87112854;传真:(020)87113940;开户银行:工商银行广州五山办事处;帐户:广东省造纸学会;帐号:3602002609000810506;联系人:刘道恒、赖燕明;E-mail:ppedhliu@263.net