

耐热子囊菌产木聚糖酶及酶学性质的研究

周秀梅 夏黎明

(浙江大学材料与化学工程学院化学工程与生物工程学系, 杭州, 310027)

摘要 对 1 株耐热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*) 固态发酵产木聚糖酶的工艺条件及酶学性质进行了研究。确立了适宜的产酶基质为 麸皮 30%、玉米芯 35%、玉米皮 35%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%、尿素 0.5%、 KH_2PO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%、初始含水量 65~70%。45℃ 培养 5 d, 木聚糖酶活力最高可达 10 321 IU/g(干曲)。该木聚糖酶最适反应温度为 70℃, 最适 pH4.8; 在 pH3.0~7.0, 温度低于 65℃ 时稳定性较好。可被 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 激活, 而被 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 抑制。

关键词 耐热子囊菌, 木聚糖酶, 固态发酵, 酶学性质

木聚糖酶是一类重要的木糖苷键水解酶, 在降解半纤维素方面显示了良好的应用效果。作为一种多功能酶制剂, 将其添加到饲料中既可改善饲料的营养价值, 又减少了环境污染。应用于食品工业, 不但可以提高食品品质、加工效率, 还具有保健功能, 一举多得。应用于造纸工业, 除了能提高纸张质量外, 还可大大减少致癌物质的排放, 降低毒性漂白剂的用量, 从根本上解决漂白废水引起的环境污染问题^[1]。

作者利用廉价的农业纤维废料, 采用固态发酵工艺生产木聚糖酶, 并对其酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

耐热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*), 来自美国普渡大学可再生资源工程实验室。在斜面培养基上培养 5 d 后, 于 4℃ 冰箱中保存。

1.2 培养基

(1) 斜面培养基: 2% 麦芽浸出粉, 0.5% 蛋白胨, 2% 琼脂, 自然 pH。

(2) 液体种子培养基: Mandels 营养盐浓缩液 10%, Mandels 微量元素浓缩液 0.1%, 葡萄糖 1%, 豆饼粉 0.1%, 1 mol/L 柠檬酸缓冲液 5%。

(3) 固态发酵培养基: 麸皮 30%、玉米芯

35%、玉米皮 35%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%、尿素 0.5%、 KH_2PO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, 初始含水量 65%~70%。

1.3 固态发酵

将斜面菌种移入液体种子培养基中, 于 45℃、180 r/min 条件下培养 3 d。固态发酵在 250 mL 三角瓶中进行, 每瓶装入 33 g 固态发酵培养基, 接种量为 10%, 发酵温度 45℃, 定期取样检测酶曲中的酶活力。每组做 3 个平行实验, 结果取其平均值。

1.4 酶活力测定方法

1.4.1 木聚糖酶活力测定^[2]

将 1 g 湿曲制成 1% 悬液, 室温下浸泡 24 h, 上清液为粗酶液。取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液 + 1 mL 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲溶液 (pH4.8) + 1 mL 质量浓度为 1% 木聚糖底物 (Sigma 公司), 于 70℃ 准确反应 30 min, 用 DNS 法测定还原糖 (以木糖为标准)。以每 min 产生 1 μmol 还原糖所需酶量定义为 1 个国际酶活单位。

1.4.2 内切- β -葡聚糖酶活力测定^[3]

取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液 + 1 mL 质量浓度为 1% 羧甲基纤维素钠 (用 pH 4.8 的柠檬酸缓冲液配制), 于 50℃ 准确反应 20 min, 用 DNS 法测定还原糖 (以葡萄糖为标准)。以每小时产生 1 mg 还原糖所需酶量定义为 1 个酶

第一作者 硕士研究生 助理工程师。

收稿时间 2004-06-01, 改回时间 2004-07-12

活单位。

2 结果与讨论

2.1 碳源的选择

在木聚糖酶的生产中,作为碳源及诱导物的木聚糖是必不可少的原料,纯的木聚糖价格昂贵,应用于木聚糖酶工业化生产中显然是不够经济的。文中采用富含木聚糖的农业废弃物代替纯木聚糖进行了复合碳源产酶的研究。结果表明(表1),以30%麸皮、35%玉米皮、35%玉米芯作为碳源时,木聚糖酶活力最高。

表1 碳源对木聚糖酶形成的影响

碳源	木聚糖酶活力 /IU·g ⁻¹
30%麸皮+70%玉米芯	9762
30%麸皮+70%玉米皮	9778
30%麸皮+70%甘蔗渣	1173
30%麸皮+70%废纸浆	938
20%麸皮+40%玉米芯+40%玉米皮	7340
30%麸皮+35%玉米芯+35%玉米皮	10055
40%麸皮+30%玉米芯+30%玉米皮	8245
50%麸皮+25%玉米芯+25%玉米皮	5329

2.2 产酶温度

常见的产木聚糖酶真菌的发酵温度大多为30℃左右,固态发酵过程中的聚热现象容易引起菌体死亡,从而造成“夹心”现象。文中分别在39、42、45、48℃条件下进行了产酶试验。由图1可知,该菌种在45℃下产木聚糖酶的活力最高,这种特性有利于固态发酵的顺利进行。

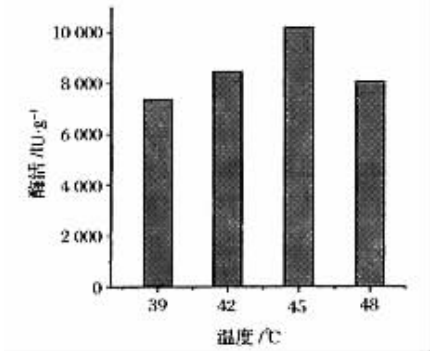


图1 温度对产酶的影响

2.3 培养基质初始含水量对酶合成的影响

培养基质的湿度对木聚糖酶的合成有明显的影响,湿度太大引起固体基质物理性质发生变化,从而影响氧的传输和发酵热的散失。湿度过低,基质内水活度下降,不利于营养物质的溶解与传递。由表2的研究结果得知,发酵基质的适宜初始含水量为65%~70%。

表2 初始含水量对木聚糖酶合成的影响

初始含水量/%	60	65	70	75	80
木聚糖酶活力 /IU·g ⁻¹	8340	10187	9761	8528	8220
产酶周期/d	5.5	5	5	4.5	4.5
产率/IU·d ⁻¹	168.4	226.4	216.9	210.6	203

2.4 *Thermoascus aurantiacus* 的产酶进程

Thermoascus aurantiacus 产木聚糖酶的时间进程如图2所示。

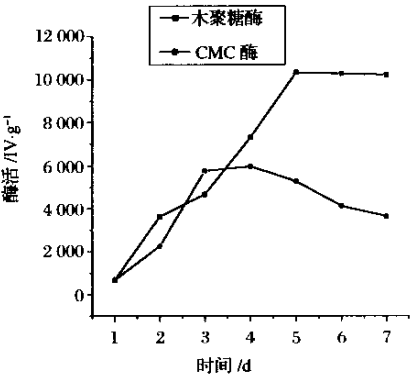


图2 *Thermoascus aurantiacus* 的典型产酶进程

在培养初期,木聚糖酶活力很低,至第3天发酵基质中长满白色菌丝,木聚糖酶活力开始迅速上升。培养至第5天,木聚糖酶活力高达10 321 IU/g(干曲),之后基本稳定。此时镜检发现菌丝粗大,开始扭曲老化。并有子囊孢子产生。

Thermoascus aurantiacus 发酵过程中亦有CMC酶产生,该酶于第4天可达5 970 U/g(干曲)然后开始下降。这表明纤维素酶在45℃时热稳定性相对较差。从酶系组成来看,该酶制剂在提高饲料营养价值、改善面团加工和烘焙质量、制备食品增稠剂糊精、果汁(酒)的澄清及可再生纤维原料的利用中有着潜在的应用价值。

2.5 酶学性质

2.5.1 最适反应温度

取同种等量木聚糖酶样品,分别在 50~80℃ 水浴条件下测定木聚糖酶活力。以 70℃ 时的酶活力为 100%。如图 3 所示,木聚糖酶活力随着温度的升高而迅速增加,在 70℃ 时酶活力达到高峰值,当温度超过 75℃ 时,酶活力开始迅速下降。

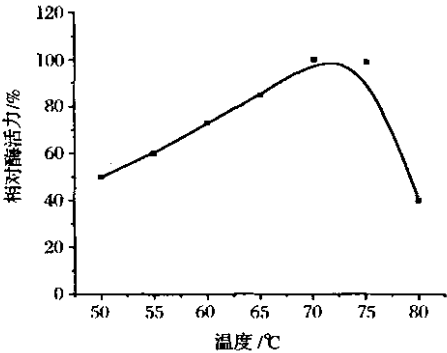


图 3 温度对酶活力的影响

2.5.2 最适反应 pH 值

用 0.2 mmol/L 不同 pH 值的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制 1.0% 的木聚糖底物,然后分别测定木聚糖酶活力^[4,5]。实验结果显示(图 4)酶反应的最适 pH 为 4.8,在 pH 低于 4.0 和高于 7.0 时酶活力下降较快。该酶制剂与纤维素酶具有相同的最适反应 pH,因此在与纤维素酶协同降解纤维废料方面具有广阔的应用前景。

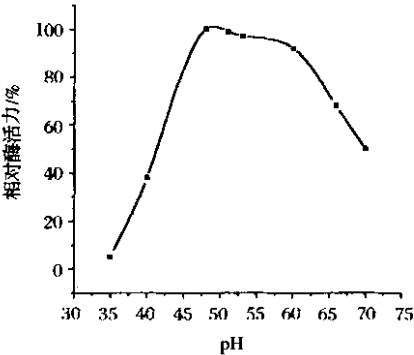


图 4 pH 对酶活力的影响

2.5.3 热稳定性

将湿曲浸泡得到的粗酶液在 50~85℃ 水

浴中保持 60 min,冷却后按常规方法测定剩余酶活力。以 50℃ 下处理后酶液的活力为 100%,结果表明(图 5),该酶在温度低于 65℃ 时热稳定性良好,木聚糖酶活力基本不变。65℃ 时处理酶液 60 min 后发现,木聚糖酶活力仍可保持 95%,而在相同处理条件下的纤维素酶活力则完全丧失,采用这种方法可以比较方便地去除酶制剂中的纤维素酶,从而获得适用于纸浆漂白工业的木聚糖酶制剂^[6,7]。

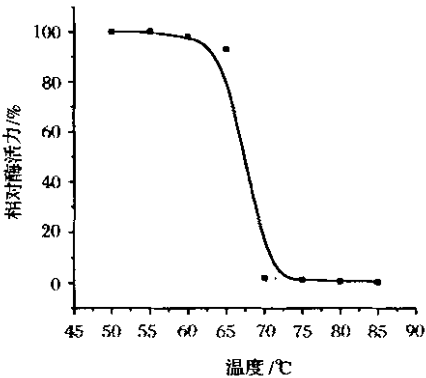


图 5 温度对酶稳定性的影响

2.5.4 pH 稳定性

将酶液置于不同 pH 值的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中,于 50℃ 下保温 60 min,经适当稀释后按常规方法测定木聚糖酶活力,以 pH 4.8 时的酶活力作为 100%。由图 6 可知,该酶在 pH 3.0~7.0 之间基本稳定,放置 60 min 后,剩余酶活力均在 80% 以上。

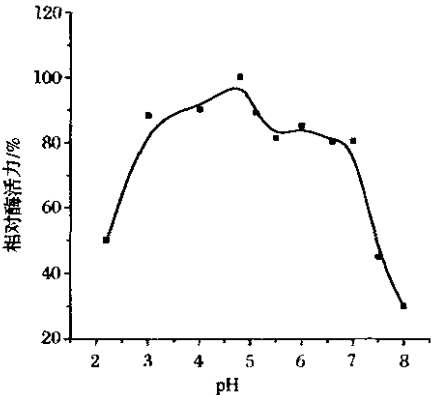


图 6 pH 对木聚糖酶稳定性的影响

2.5.5 金属离子对木聚糖酶活力的影响

金属离子在一定的浓度下,对木聚糖酶的

活性有激活和抑制作用。在酶反应体系中加入不同的金属离子,按常规方法测定酶活力。以未加离子的反应体系作为对照。由表 3 可知, Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 在较低浓度时,对木聚糖酶活性有激活作用,而在较高浓度下,开始出现抑制,其中 Cu^{2+} 的抑制作用最为突出; Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 在 1 mmol/L 及 5 mmol/L 时均表现为不同程度的激活作用; Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对木聚糖酶有抑制作用,其中 Fe^{3+} 抑制作用最强,酶活力损失 68%~75%。

表 3 不同金属离子对木聚糖酶活性的影响

金属离子	相对活力/%		金属离子	相对活力/%	
	1 mmol/L 终浓度	5 mmol/L 终浓度		1 mmol/L 终浓度	5 mmol/L 终浓度
Na^+	121	96	K^+	103	87
Ca^{2+}	113	96	Fe^{3+}	32	25
Fe^{2+}	134	251	Cu^{2+}	132	38
Zn^{2+}	101	161	Co^{2+}	84	72
Mg^{2+}	105	133	Mn^{2+}	39	62

3 结 论

- (1) 耐热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*) 利用富含木聚糖的农业废弃物作为碳源可生产高活力的木聚糖酶和较高活性的纤维素酶。该酶制剂具有潜在的应用价值。
- (2) 该酶最适反应温度为 70℃,最适 pH4.8,具有良好的热稳定性,65℃ 保温 60 min 后,活力仍可保持 95%,而酶曲中的纤维素酶

活力则完全丧失,采用这种方法可以获得适用于纸浆漂白工业的木聚糖酶制剂。

(3) 金属离子对木聚糖酶活力有一定的促进或抑制作用, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 起激活作用; Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 则起抑制作用。该酶制剂在饲料、食品、制浆造纸、纺织、以及半纤维素生物转化方面有着广泛的应用前景。

参 考 文 献

1 Christov L P, Szakacs G, Balakrishnan C H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching[J]. Process Biochemistry, 1999, 34: 511~517

2 Anthony T, Chandra Raj. K, Rajendran A et al. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* ARI[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(6): 647~654

3 沈雪亮. 细菌纤维素酶的研究(D). 2001, 25~26

4 崔 莉, 张陈虎, 钱国祗等. 果胶酶酶解产物 DNS 比色法测定条件的研究[J]. 印染, 2002, 28(12): 32~34

5 王 琳, 刘国生, 王林嵩等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报, 1998, 26(3): 66~69

6 Roncero M B, Torres A L, Colom J F et al. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of *Eucalyptus* pulp [J]. Process Biochemistry, 2000, 36(1~2): 45~50

7 Subramaniyan S, Prema P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 183(1): 1~7

Study on Production and Property of Xylanase by *Thermoascus aurantiacus* Using Solid State Fermentation

Zhuo Xiumei Xia Liming

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou, 310027)

ABSTRAC Xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* was studied under solid state fermentation process. The culture substrate was optimized as follows :wheat bran 30%, corncob 35%, corn husk 35%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, carbamide 0.5%. The initial moisture content 65%~70%. Xylanase activity reached 10 321 IU/g koji after 5days at 45℃. Study on the enzyme properties showed that the optimal pH value and temperature were 4.8 and 70℃, respectively. The enzyme was stable under 65℃ pH 3.0~7.0. Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} take various stimulus roles to xylanase activity, whereas Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} inhibit xylanase activity. The enzyme has been widely applied in feeding, food, paper pulp, textile industries and the bioconversion of hemicelluloses.

Key words *Thermoascus aurantiacus*, xylanase, solid state fermentation, enzymatic properties