

文章编号: 1003-8701(2008)01-0056-04

木质层孔菌产木聚糖酶和 α -葡聚糖酶的研究

崔艳红¹, 王士长², 韩庆功¹, 黄怡²

(1.河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2.广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

摘要: 研究了木质层孔菌不同发酵条件对木聚糖酶、 α -葡聚糖酶性能的影响, 并对其酶作用特性进行了研究结果表明: 木质层孔菌产木聚糖酶最适碳源为麸皮, 氮源为蛋白胨, 最适发酵温度为 25℃; 而产 α -葡聚糖酶最适碳源为木糖, 氮源为酵母膏, 最适发酵温度为 28℃。就产酶时间而言, 在发酵前 60 h 菌株均不产生 α -葡聚糖酶和木聚糖酶, 在 72 h 才有微量的酶产生, 到 192~240 h 两种酶均达到产酶高峰, 并以 216 h 产酶最高; 两种酶的最佳缓冲液均为柠檬酸缓冲液, 木聚糖酶的最适作用 pH 值 5.0, 最适反应温度为 50℃, 而 α -葡聚糖酶最适作用 pH 值 4.6, 最适反应温度为 60℃。

关键词: 木聚糖酶; α -葡聚糖酶; 产酶条件; 酶作用特性

中图分类号: Q814.4

文献标识码: A

Studies on Producing xylanase and α -glucanase by *Fomes lignosus* (Brek) Cooke

CUI Yan-hong¹, WANG Shi-chang², HAN Qing-gong¹, HUANG Yi²

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, 453003;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Different fermentation conditions which affected the performance of xylanase and α -glucanase of *Fomes lignosus* (Brek) Cooke and characteristic of its enzyme were studied. The results showed that the optimal carbon source for *Fomes lignosus* (Brek) Cooke to produce xylanase was wheat bran, the optimal nitrogen source was yeast extract, the optimal ferment temperature was 25℃. The optimal carbon source for *Fomes lignosus* (Brek) Cooke to produce α -glucanase was xylose, the optimal nitrogen source was yeast extract, the optimal ferment temperature was 28℃. For producing enzyme time, the *Fomes lignosus* (Brek) Cooke didn't produce xylanase and α -glucanase until it fermented for 60h. Minim enzyme was produced when strain 5.132 fermented for 72h and enzyme producing fastigium is 192h-240h. Maximal enzyme was produced at 216h. The optimal buffer for xylanase and α -glucanase was citric acid buffer, the optimal pH for xylanase was 5.0, the optimal reaction temperature was 50℃, the optimal pH for α -glucanase was 4.6, the optimal reaction temperature was 60℃.

Key words: Xylanase; α -glucanase; Enzyme-producing; Action character of enzyme

随着我国养殖规模的不断扩大和饲料工业的迅速发展, 作为常规能量饲料的玉米供应紧缺状况日益突出。据预测, 到 2020 年我国能量饲料缺口将达到 0.83 亿吨^[1], 因此, 开发非常规饲料原料资源显得尤为迫切。我国有着丰富的麦类谷物及

糠麸类资源, 但因其含有非淀粉多糖(NSP)抗营养因子(主要是 α -葡聚糖和阿拉伯木聚糖), 使其在配合饲料中的用量受到限制^[2], 原因在于摄入含有这类抗营养因子的饲料会增加消化道内容物的黏度, 阻碍畜禽的消化吸收, 降低饲料养分消化率, 同时会促使有害微生物的大量繁殖, 给卫生和疾病控制带来困难。许多研究表明, 添加木聚糖酶、 α -葡聚糖酶是消除饲料中非淀粉多糖的抗营养作用最行之有效的方法^[3]。

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 广西自然科学基金(桂科攻 0428005-18)

作者简介: 崔艳红(1975-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术在饲料中的应用研究。

在国内对木聚糖酶、 β -葡聚糖酶的研究已有不少报道,但主要集中在黑曲霉、青霉、木霉等,另一方面对白腐真菌的研究主要集中在木质素降解酶的研究,对其非淀粉多糖酶的研究较少,因此,本文探讨了不同培养条件和培养方法对木质层孔菌产木聚糖酶、 β -葡聚糖酶的影响,并对其部分酶性质进行了研究,为酶制剂的生产提供必要的技术参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

木质层孔菌购自中国科学院微生物所。

1.2 培养基

综合 PDA 培养基: 马铃薯提取液 1 000 mL、葡萄糖 20.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、维生素 B_1 微量(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、琼脂 15.0 g, pH 6.0。

基础液体产酶培养基: 在 Mandel's 营养盐中加入 2%的麸皮、0.2%的蛋白胨, pH 约 5.5。

1.3 试剂药品

Mandel's 无机盐营养液: 常量元素液: KH_2PO_4 2.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、 CaCl_2 0.3 g, 加 600 mL 蒸馏水使之溶解。

微量元素液 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg/L、 CoCl_2 2.0 mg/L, 加蒸馏水 200 mL 使之溶解。

将常量元素液与微量元素液混合后, 用 HCl 调 pH 至 5.5, 再以蒸馏水定容至 1 000 mL 即为 Mandel's 无机盐营养液。

主要药品: β -葡聚糖和燕麦木聚糖购自 Sigma 公司, 其它药品试剂均为国产分析纯、化学纯。

1.4 酶活力测定方法

木聚糖酶活力测定: DNS 法^[4-7], β -葡聚糖酶活力测定: DNS 法^[4,6,8]。

1.5 发酵条件的研究

不同碳源对产酶的影响: 将活化后的菌株按相同的接种量接种于不同碳源的基础液体产酶培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 振荡培养 5 d 后测定酶活。

不同氮源对产酶的影响: 将活化后的菌株按相同的接种量接种于不同氮源的基础液体产酶培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 振荡培养 5 d 后测定酶活。

培养温度对产酶的影响: 将活化后的菌株按相同的接种量接种于基础液体发酵产酶培养基, 分别在不同的温度条件下, 培养 5 d 后测定酶活。

培养时间对产酶的影响: 在基础液体产酶培

养基上于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 并从培养 12 h 开始, 对其定时(每间隔 12 h)取样测定酶活一次, 观察培养时间对酶活力的影响。

1.6 酶作用特性研究

酶作用最适温度: 在不同温度下进行酶解反应, 测定相应条件下酶活性。

酶作用最适缓冲溶液: 在酶最适作用温度下, 使用 pH5.0 的不同缓冲液进行酶解反应, 测定相应条件下酶活。

酶作用最适 pH 值: 使用酶最适缓冲溶液, 并在不同 pH 值下进行酶解反应, 测定相应条件下酶活性。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对产酶的影响

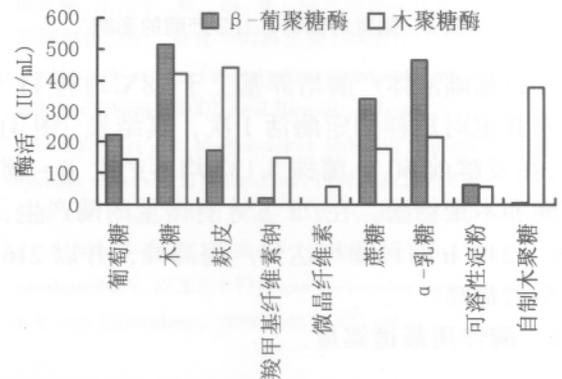


图 1 不同碳源对菌株 5.132 产酶的影响

由图 1 可知, 对于木聚糖酶而言, 最佳碳源是麸皮, 其次是自制木聚糖和木糖。对于 β -葡聚糖酶而言, 以木糖为碳源时酶活最高, 其次是 α -乳糖, 由此也表明, 不同碳源对产木聚糖酶和 β -葡聚糖酶的效果各异, 同一碳源对产木聚糖酶和 β -葡聚糖酶的作用效果也不同。

2.2 不同氮源对产酶的影响

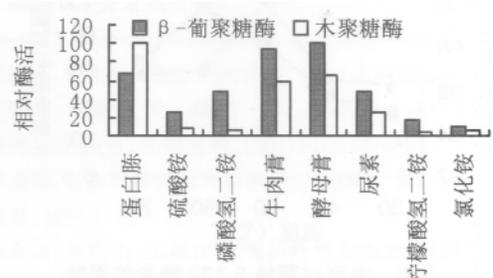


图 2 不同氮源对菌株 5.132 产酶的影响

由图 2 可见, 菌株 5.132 产木聚糖酶以蛋白胨为氮源时酶活最高, 其次是酵母膏、牛肉膏; 在

以酵母膏为惟一氮源时, β -葡聚糖酶合成最好, 其次是牛肉膏、蛋白胨; 并且有机氮源培养基都明显优于无机氮源培养基。

2.3 培养温度对产酶的影响

在不同的温度条件下, 在基础液体发酵产酶培养基上培养结果见图 3, 图 3 表明, 菌株 5.132 所产 β -葡聚糖酶以 28 时酶活最高, 而木聚糖酶酶活则以 25 时最高。

2.4 培养时间对产酶的影响

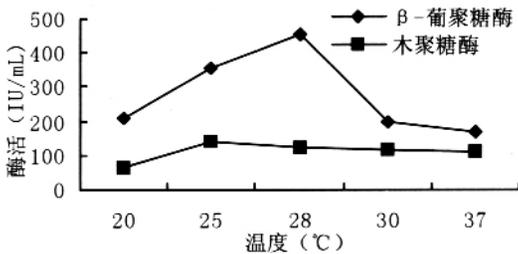


图 3 温度对菌株 5.132 产酶的影响

在基础液体产酶培养基上于 28 培养 11 d, 并对其定时取样测定酶活 1 次, 其结果 (图 4) 表明, 在发酵前 60 h 菌株 5.132 均不产生 β -葡聚糖酶和木聚糖酶, 在 72 h 才有微量的酶产生, 到 192~240 h 两种酶均达到产酶高峰, 并以 216 h 酶活力最高。

2.5 酶作用最适温度

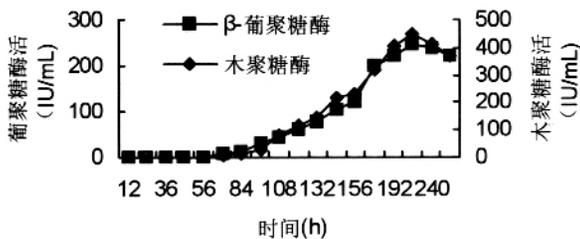


图 4 菌株 5.132 的产酶曲线

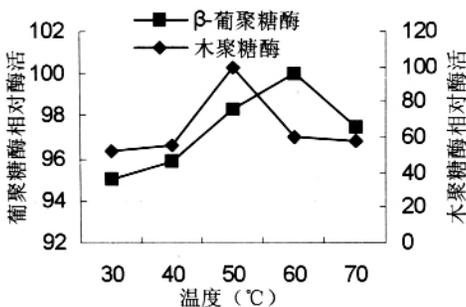


图 5 温度对菌株 5.132 酶活的影响

由图 5 可以看出, 菌株 5.132 β -葡聚糖酶最适反应温度为 60, 并且酶活力在 30~70 之间相当稳定, 酶活力保持在 95.00% 以上。木聚糖酶

最适反应温度为 50, 60 下降明显为 60%, 但在 60~70 酶活下降缓慢。

2.6 酶作用最适缓冲溶液

由表 1 可见, 在 pH5.0 的不同缓冲液下进行酶解反应时, 菌株 5.132 β -葡聚糖酶和木聚糖酶最适缓冲液均为柠檬酸缓冲液。

表 1 不同缓冲液对菌株 5.132 酶活的影响

酶	β -葡聚糖酶		木聚糖酶	
缓冲液	E-E ₀	相对酶活	E-E ₀	相对酶活
柠檬酸缓冲液	0.571	100	0.434	100
醋酸缓冲液	0.556	97.29	0.303	69.88
磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液	0.397	69.40	0.324	74.72

2.7 酶作用最适 pH 值

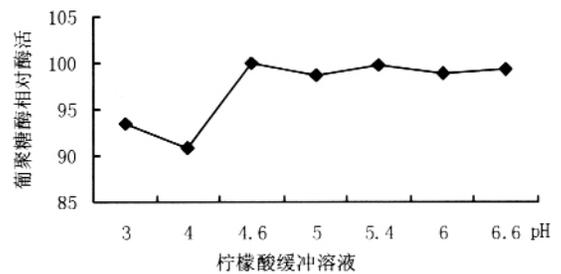


图 6 柠檬酸缓冲液 pH 值对菌株 5.132 酶活的影响

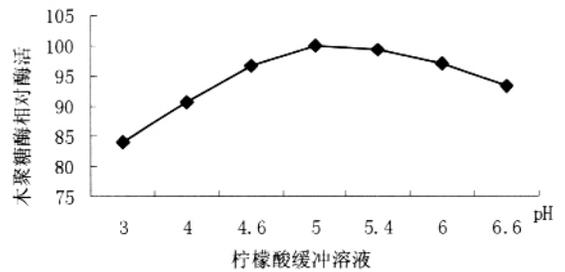


图 7 柠檬酸缓冲液 pH 值对菌株 5.132 木聚糖酶活力的影响

在最适缓冲溶液的不同 pH 值下进行酶解反应时, β -葡聚糖酶酶活性变化 (见图 6), 表明菌株 5.132 β -葡聚糖酶的最适 pH 为 4.6, 在 pH5.4 时, 相对酶活力为 99.72%。在 pH3.0~6.6 的范围内, 相对酶活力在 90.85% 以上。

菌株 5.132 所产木聚糖酶的最适反应 pH 为 5.0, 在 pH4.6~6.0 范围相对酶活较高, 具有较高的稳定性 (图 7)。

3 讨论

优良的非淀粉多糖酶生产菌株是在制备高活力非淀粉多糖酶的前提条件, 但菌株产酶发酵条件因菌种和菌株不同而异。因此应建立其优化培养条件和培养方法, 尤其是碳源; 在非淀粉多糖酶

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。碳源的类型和性质直接影响酶的活力和产率。同时, 碳源成本也是影响酶生产成本的一个重要因素, 因此, 选择适宜的碳源是决定非淀粉多糖酶生产成败的关键; 今后应从酶的诱导合成和阻遏机制方面加深对碳源的研究。本实验木质层孔菌产木聚糖酶选择的合适碳源为麸皮, 而产 - 葡聚糖酶则选择木糖作为碳源。

木质层孔菌在培养 72 h 时才有微量的酶产生, 到 192 ~ 240 h 两种酶达到产酶高峰, 而黑曲霉、木霉在发酵 24 ~ 36 h 就有微量的酶产生, 在 72 ~ 84 h 就达到产酶高峰, 因此在生产 - 葡聚糖酶、木聚糖酶时, 要综合考虑产酶活力、培养时间及设备利用率等因素, 选择理想的生产菌种。

木质层孔菌所产非淀粉多糖酶最适 pH 都在酸性范围, 并且在 50 ~ 60 范围内具有较高酶活力。加工饲料都需要一个制粒工艺, 在制粒过程中有一个短暂的高温过程, 一般为 75 ~ 93 , 在此温度下, 酶活性大幅度丧失。因此, 要在饲料中真正推广利用非淀粉多糖酶必须具有良好的热稳定性。另一方面酶的最终作用场所是在动物正常体温(37 ~ 39)的胃肠道中, 非淀粉多糖酶必须在常温下具有较高活性。因此如何解决在制粒高温

和动物正常体温下同时具有较高酶活性是饲用酶制剂应用的关键性技术环节。因此, 酶制剂在生产和处理过程中稳定化技术研究是今后的一个重要研究方向。

参考文献:

[1] 王修启, 张兆敏, 李春群. 加酶小麦日粮对猪生产性能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2002(2): 12- 14 .
 [2] 韩正康, Marquardt R R. 畜禽营养中的酶制剂[A]. 饲料酶制剂国际学术研讨会论文集 [C]. 南京: 南京农业大学出版社, 1996 .
 [3] GruppenK, KormelinkPJM, AGJVoragen. Differences in efficiency of Xylanases in the breakdown of wheat flour arabinoxylans due to their mode of action. Enzymes in Animal Nutrition. Proc 1st Symposium. Karlsruhe, Germany. 1993, 276- 280
 [4] 刘永举, 王清吉, 王江青, 等. DNS法测定饲用 - 葡聚糖酶活力[J]. 中国饲料, 1999(18): 6 .
 [5] 徐抗震, 宋纪蓉, 黄 洁, 等. 激光选育混合菌发酵苹果渣生产饲料蛋白[J]. 粮食与饲料工业, 2002(12): 17- 19 .
 [6] Joachim, k et al . Determination of xylanase, - glucanase, and cellulose activity[J]2002 Anal Bioanal., Chem 374: 80- 87 .
 [7] BAILEY MJ, et al . Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase of activity [J]. Biotechnol, 1992, 23: 257- 270 .
 [8] Erfle I D, Teather R M, Wood R M. Purification and properties of a 1, 3- 1, 4- -D- glucanase (lichenase, 1, 3- 1, 4- -D- glucanohydrolase, EC3.2.1.73) from bacteroides saccharovorans cloned in E. coli [J]Biochem, 1998.255(3): 833- 841 .



(上接第 55 页)

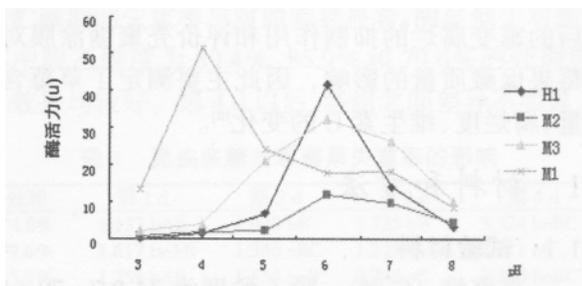


图 3 不同 pH 对酶活力影响

由图 3 可知, 来自盲肠菌株 M3 产生的酶在 pH 值为 4 时酶活力最高, 最高酶活力达到了 51.4U, 随着 pH 值升高或降低酶活力呈下降趋势, 另外 3 株菌产生的酶在 pH 为 6 时酶活力较高, 其中来自回肠菌株 H1 最高酶活力达到了 41.4U, 随着 pH 值升高或降低酶活力呈下降趋势。

3 结 论

鹅肠道纤维分解菌在发酵培养时产生了胞外

纤维素酶, 从而可以利用饲料中的粗纤维类物质, 提高粗饲料的利用率。

鹅肠道细菌纤维素酶活力受温度和 pH 影响, 温度为 60 时, 该组酶的活力最高。

参考文献:

[1] Heorissat B et al. BioTech [M]. 1985(3):722- 726.
 [2] Wood T M, et al. Biochemistry and genetics of activities of cellulose Degradation. FE Ms symp, 43. London [J]. Academic. 1988:21.
 [3] Moloney A P, et al. Biochem [J]. 1985, 225(3):365- 373.
 [4] Reese E T. Biotechnol Bioeng Symposium [J]. 1981(523):147- 161.
 [5] 周德庆. 位生物学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986 .
 [6] 王晓芳, 徐旭士, 吴 敏, 王 冠, 刘清梅. 一株纤维分解菌的分离与筛选[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 27- 30 .
 [7] 张龙翔. 生化实验方法和技术第二版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.1- 3.
 [8] 曲音波, 搞配给, 王祖农. 青霉的纤维素酶降解物阻遏突变株的选育[J]. 真菌学报, 1984, 3(4): 238- 243 .
 [9] 刘东波, 张 影, 陈 珊, 等. 生孢纤维细菌对滤纸纤维素降解过程的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(6)776- 780 .