

影响出芽短梗霉 XYE-7 木聚糖酶生物合成的条件

张建珍, 庞宗文, 梁静娟, 黄日波, 肖健

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 类酵母真菌出芽短梗霉 XYE-7 是从果园土壤中分离到一株产木聚糖酶活力较高的菌株, 对其合成木聚糖酶的条件进行了研究, 结果表明该菌合成木聚糖酶的最佳培养基为: 硫酸铵 0.5%、酵母膏 0.2%、磷酸二氢钾 0.1%、硫酸镁 0.05%、木聚糖 0.5%, 初始发酵 pH 值为 2.0, 发酵温度 35 °C, 发酵时间为 80 h。在该条件下 XYE-7 合成木聚糖酶的能力最强。

关键词: 出芽短梗霉; 木聚糖酶; 生物合成

中图分类号: Q556+.2, TS202.3; **文标标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)01-0005-03

The Biosynthesis of Xylanase by *Aureobasidium pulluans* XYE-7

ZHANG Jian-zhen, PANG Zong-wen, LIANG Jing-juan, HUANG Ri-bo, XIAO Jian

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Yeast-like strain XYE-7 for xylanase production was isolated from soil. The best carbon sources and nitrogen sources for the fermentation were as follows: 0.5% xylan, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.2% barmene and 0.1% KH₂PO₄. The optimal initial pH value, culture temperature and fermentation time were 2.0, 35 °C and 80 h, respectively.

Key words: *Aureobasidium pulluans*; Xylanase; Biosynthesis

木聚糖是地球上数量仅次于纤维素的多糖类资源。 β -1,4-内切木聚糖酶 (endo-1,4-beta-xylanase) 能将木聚糖水解为木二糖和木三糖, 它们进入细胞而被木二糖酶 (xylobiase) 降解^[1]。木聚糖酶具广泛的应用前景, 如可加入饲料中改善其营养价值, 用于纸浆生物漂白而减少环境污染, 还可生产具有高附加值的功能性食品甜味剂——低聚木糖。木聚糖酶在当前最被看好的应用前景是在生产燃料酒精方面。用纤维素酶和木聚糖酶协同作用可以将植物纤维彻底水解为单糖, 再运用基因工程和发酵工程生产酒精, 是当前燃料酒精研究开发的热点和最为推崇的一种生产工艺。

国内外已有大量关于木聚糖酶的研究报道, 但绝大多数是关于霉菌、放线菌和细菌所产木聚糖酶的研究, 国内外只有少量关于产木聚糖酶酵母的报道。20世纪 80 年代, Biely 等人^[1-4]对 *Cryptococcus albidus* 产生的木聚糖酶的分离纯化、生物合成、水解机理进行了较深入的研究, Morosoli 等人^[5-7]报道了对该酵母的木聚糖酶基因的全序列测定和基因克隆。马桂荣等人^[8-9]对丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 木聚糖酶的生物合成进行了研究。近年来 Petresu 等人^[10-12]对嗜冷酵母 (*Cryptococcus adeliae*) 产生的木聚糖酶的性质和结构等进行了研究。笔者筛选到 1 株能产木聚糖酶

收稿日期: 2006-7-4

作者简介: 张建珍, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程

的类酵母菌 XYE-7, 本文报道该菌的木聚糖酶的生物合成条件的初步研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

出芽短梗霉 XYE-7 由本课题组分离自于广西大学农场果园富含腐殖质的土壤。

1.1.2 培养基

种子培养基: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, 水 1000 mL, pH 自然。

产酶培养基: (NH₄)₂SO₄ 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, 酵母浸膏 2 g, 木聚糖 5 g, 水 1000 mL, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 木聚糖的制备

参考文献^[13]稍加改进。甘蔗渣粉碎后加水煮沸 1h, 连续处理两次, 凉干。于蔗渣中加入 0.5% 的草酸铵溶液 (以浸没蔗渣为准), 85 °C 水浴加热 90 min, 过滤, 弃去清液, 连续处理 3 次。用 pH 4.0 的 2% 次氯酸钠溶液于 75 °C 水浴加热处理蔗渣 2 h, 弃去清液。用 4% 的 NaOH 溶液在 40 °C 下浸提 16 h 后, 过滤, 取滤液, 用乙酸调 pH 到 5.5, 然后加入 3 倍体积的乙醇,

4 ℃静置 2.5 h, 6000 r/min 离心 30 min, 取沉淀, 用 75%乙醇洗涤沉淀物两次, 烘干后得到深棕色固体, 即为木聚糖粗提物。

1.2.2 木聚糖酶酶活的测定

参照文献^[14]稍加改进, 取 0.5 mL 适当稀释的酶液, 加入 1.5 mL 用 0.2 mol/L、pH 4.8 醋酸缓冲液配制的 1%木聚糖溶液中, 50 ℃酶解 30 min, 加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中加热 5 min, 用冰水迅速冷却, 定容到 25 mL, 于 520 nm 波长测定 OD 值。同时以 100 ℃灭活的粗酶液作对照。

酶活单位定义为上述条件下每分钟水解木聚糖产生 1 μmol 木糖的酶量为一个酶活力单位(IU)。

2 结果与分析

2.1 碳源对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

在产酶培养基中分别加入 1%的不同碳源代替木聚糖, 按 10%接种量接入 XYE-7 种子液, 30 ℃下摇瓶发酵 80 h, 发酵液离心取上清液测定木聚糖酶酶活。结果 XYE-7 在葡萄糖、木糖和蔗糖中生长良好, 在木薯淀粉中生长较好, 在木聚糖、蔗渣粉和麸皮中生长很差。以葡萄糖、蔗糖、木薯淀粉、麸皮和蔗渣粉为碳源时均没有检测到木聚糖酶活力, 碳源为木糖时最有利于 XYE-7 合成木聚糖酶, 木聚糖酶酶活为 7.0 IU/mL 发酵液, 木聚糖次之, 木聚糖酶酶活为 2.3 IU/mL 发酵液, 可见 XYE-7 的木聚糖酶为诱导酶。以蔗渣粉为碳源时没有检测到木聚糖酶活力, 可能是由于蔗渣粉中的木聚糖溶解性差, 酵母对其较难利用, 所以菌体生长很差, 因此无法产酶。

2.2 氮源对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

在产酶培养基中加入 0.5%木聚糖为碳源, 加入 0.5%不同氮源代替(NH₄)₂SO₄ 和酵母膏, 按 10%接入 XYE-7 种子液, 30 ℃下摇瓶发酵 80 h, 离心取上清测定木聚糖酶酶活, 结果见表 1。

表 1 不同氮源对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响 单位: (IU/mL)

Table 1 Effect of carbon sources on xylanase production by XYE-7			
氮源 Nitrogen sources	蛋白胨 Peptone	牛肉浸膏 Beef extract	酵母浸膏 Yeast extract
酶活 Enzyme activity	1.88	1.71	1.90
氮源 Nitrogen sources	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃	KNO ₃
酶活 Enzyme activity	3.70	3.40	1.15

从表 1 可看出, 铵盐为氮源时合成酶能力最强, 而有机氮源不利于 XYE-7 合成木聚糖酶。

2.3 发酵时间对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

以 10%的接种量将 XYE-7 种子液接入产酶培养

基中, 30 ℃下摇瓶发酵, 发酵时间分别为 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h 和 96 h。将发酵液离心取上清液测定木聚糖酶酶活, 结果见图 1。

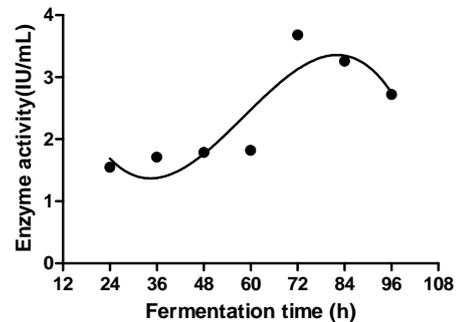


图 1 发酵时间对酵母 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

Fig 1. Effect of fermentation time on the xylanase production of yeast XYE-7

从图 1 可看出, XYE-7 在培养 60 h 后才开始大量合成木聚糖酶, 80 h 左右合成木聚糖酶的量最多, 以后慢慢下降。XYE-7 需要较长时间才开始合成木聚糖酶, 这可能是由于该菌不能直接吸收利用木聚糖, 因此以木聚糖为碳源时, 在发酵前期, 酵母菌的生长速率较低, 随着酵母菌不断分泌木聚糖酶而水解木聚糖释放出木糖, 酵母菌的生物量逐渐增加, 产酶量也随之增加, 至 80 h 左右达到最高峰。

2.4 接种量对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

以不同的接种量将 XYE-7 种子液接入产酶培养基中, 30 ℃下摇瓶发酵 80 h, 将发酵液离心取上清液测定酶活, 结果见图 2。

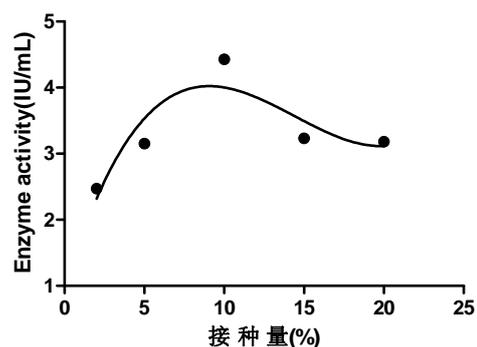


图 2 接种量对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

Fig 2 Effect of nitrogen sources on the xylanase production of XYE-7

从图 2 可看出, 10%接种量最有利 XYE-7 合成木聚糖酶, 接种量过大或过小均不利木聚糖酶的合成。

2.5 初始 pH 值对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

将产酶培养基的 pH 值分别调节为 1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0 和 6.0, 以 10% 的接种量接入 XYE-7 种子液, 30 °C 下摇瓶发酵 80 h, 将发酵液离心取上清液测定酶活, 结果见图 3。从图 3 可看出, XYE-7 在 pH 2.0 时合成木聚糖酶能力最强, 在 pH 1.0 时仍有较高的合成能力。

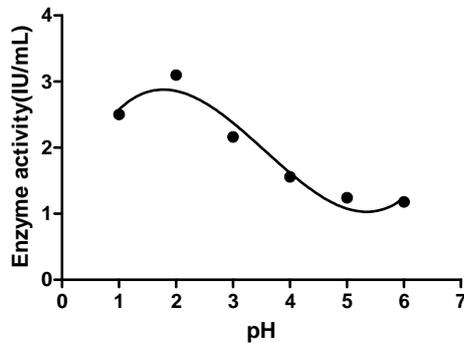


图 3 初始 pH 值对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

Fig 3 Effect of initial pH on the xylanase production of XYE-7

2.6 发酵温度对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

以 10% 的接种量将 XYE-7 种子液接入产酶培养基中, 在不同的温度下摇瓶发酵 80 h, 将发酵液离心取上清液测定酶活, 结果见图 4。从图 4 可看出, 酵母 XYE-7 在 35 °C 发酵时合成木聚糖酶的量最大。其原因可能是温度较高时, 底物的利用率较高, 所以菌株生长较健壮, 合成木聚糖酶的能力较高。

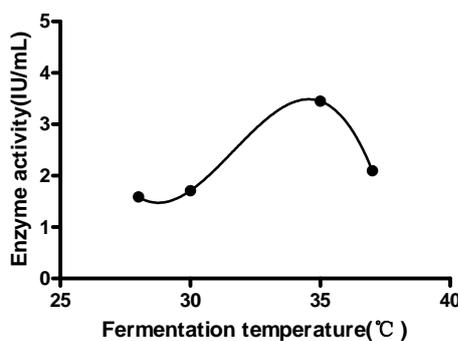


图 4 发酵温度对 XYE-7 合成木聚糖酶的影响

Fig 4 Effect of nitrogen sources on the xylanase production of XYE-7

3 结论

XYE-7 合成木聚糖酶的最佳条件为: 培养基由 0.5% 木聚糖、0.5% 硫酸铵、0.2% 酵母膏、0.1% 磷酸二氢钾、0.05% 硫酸镁组成, pH 值 2.0; 发酵温度为 35 °C, 培养时间为 80 h。

参考文献

- [1] Biely P, Vrsanska M, et al. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*[J]. Identification and cellular localization. *Eur J Biochem*, 1980, 108(1), 313-321.
- [2] Biely P, Kratky Z, Vrsanska M, et al. Induction and inducers of endo-1,4-beta-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus* [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 108(1), 323-329.
- [3] Biely P, et al. Mechanisms of substrate digestion by endo-1,4-beta-xylanase of *Cryptococcus albidus*. Lysozyme-type pattern of action[J]. *Eur J Biochem*, 1981, 119(3), 565-571.
- [4] Biely P and Vrsanska M. Synthesis and hydrolysis of 1,3-beta-xylosidic linkages by endo-1,4- beta-xylanase of *Cryptococcus albidus*[J]. *Eur J Biochem*, 1983, 129, 645- 651
- [5] Morosoli R, Roy C, Yaguchi M. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 870:473-478.
- [6] Moreau A, Durand S, Morosoli R. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1992, 116(1): 109-13.
- [7] Boucher F, Morosoli R, Durand D. Complete nucleotide sequence of the xylanase gene from the yeast *Cryptococcus albidus*[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20): 9874.
- [8] Wen Liu, Yanling Lu, Guirong Ma. Induction and glucose repression of endo-β-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409[J]. *Process Biochem*, 1999, 34: 67-72.
- [9] 张玉臻, 马桂荣, 等. 碳源对丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* ST851)生长和 β-木聚糖酶诱导形成的影响[J]. *山东大学学报(自然科学版)*, 1997, 32(1): 108-112.
- [10] Joseph Gomes, Isidore Gomes, Walter Steiner. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties[J]. *Extremophiles*, 2000, (4): 227-235.
- [11] Petrescu I, Lamotte-Brasseur J, Chessa J P, Ntarima P. Claeysens M, Devreese B, Marino G, Gerday C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*[J]. *Extremophiles*, 2000, (4): 137-144.
- [12] Amoresano A, Andolfo A, Corsaro M M, et al. Structural characterization of a xylanase from psychrophilic yeast by mass spectrometry. *Glycobiol*, 2000, 10(5): 451-458.
- [13] 吴凌伟, 王水兴, 严有明. 利用甘蔗渣固态发酵木聚糖酶[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(8): 100-102.
- [14] 周世宁, 陆勇军, 杜扬. 木聚糖降解菌的筛选和木聚糖酶性质的研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1996, 35(1): 91-96