

高产木聚糖酶菌株的筛选

马庆一, 刘鑫, 陈春涛, 周丽梅

(郑州轻工业学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 本课题成功地从自然界分离筛选出了 X_{y-1} 、 X_{y-5} 两株高产木聚糖酶菌株, 并利用玉米芯为原料制备了木聚糖, 对木聚糖的制备及酶解条件进行了探讨。结果表明: 木聚糖最佳的酶解条件为 pH 5.0、温度 50 °C、酶解时间 18 h; 用 10% NaOH 85 °C 下恒温浸提 4 h, 木聚糖的提取率最高。

关键词: 筛选; 木聚糖酶; 玉米芯

中图分类号: TS 201.2⁺5; TS 261.9; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)03-0004-04

Breeding of High Xylanase-Producing Strains

MA Qing-yi, LIU Xin, CHEN Chun-tao, ZHOU Li-mei

(Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this project X_{y-1} and X_{y-5} were successfully selected from the nature with high xylanase-producing activity. The xylan was prepared using corncob as raw material and the conditions of enzymatic hydrolysis and extraction of xylan were also discussed. The results showed that the best reaction temperature, pH value, and reaction time for the enzymatic hydrolysis of xylan were 50 °C, 5.0 and 48 h, respectively. For its extraction, the most suitable NaOH content, temperature and extraction time were 10%, 85 °C and 4h, respectively.

Key words: selection; xylanases; corncob

纤维素类物质是自然界中最丰富的一类可再生资源。玉米是我国三大经济作物之一, 玉米芯产量约 0.4 亿吨/年, 数量极其可观, 而绝大部分被作为农家燃料被烧掉, 利用率极低。如将玉米芯为原料制备木聚糖, 进一步获得木糖、木二糖等低聚木糖^[1], 既可提高其经济价值, 又可减少环境污染。木聚糖类物质转化成低聚木糖类物质有酸解法、蒸煮法和酶解法等, 酶解法由于能耗低, 反应条件温和以及不使用有毒和腐蚀性的化学物质而倍受青睐^[2]。因此, 筛选高产木聚糖酶的野生菌株, 对于纤维类资源的利用具有重要的现实意义。

本课题从自然界分离到两株高酶活力的菌株, 并对其产酶条件和最佳酶解条件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与设备

原料: 玉米芯, 麸皮

仪器与设备: PYX-DHS-50 x65 型微生物多用培养箱; YXQ-SG41-280A 型电热手提式高压蒸汽灭菌锅; HZQ-F160 全温振荡培养箱; JY92 型超声波细胞

收稿日期: 2006-11-23

作者简介: 马庆一(1944-), 男, 教授, 研究生导师, 博士后, 研究方向: 天然抑菌剂, 天然抗氧化剂, 可食性涂膜保鲜, 食品功能基料及保健食品等

粉碎机; GL21 高速冷冻离心机; LD5-10 型离心机; ZFQ85a 型旋转蒸发器; HHB11.360 电热恒温培养箱; 405 型电热真空干燥箱; 721 分光光度计; 透析袋;

1.2 培养基

No.1 查氏培养基: NaNO_3 0.3%; KCl 0.05%; K_2HPO_4 0.1%; FeSO_4 0.001%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; 蔗糖 3%; 琼脂 2%; pH 6.7±0.1。

No.2 选择培养基: 麸皮 1.5%; 玉米芯 1.5%; 其余同上。

No.3 选择培养基: 麸皮 2.0%; 玉米芯 2.0%; 其余同上。

No.4 选择培养基: 麸皮 1.5%; 木聚糖 1.5%; 其余同上。

No.5 选择培养基: 麸皮 2.0%; 木聚糖 1.0%; 其余同上。

No.6 选择培养基: 麸皮 1.5%; 其余同上。

No.7 选择培养基: 玉米芯 1.5%; 其余同上。

1.3 方法

1.3.1 菌种筛选

将土样置于无菌生理盐水中振荡、离心, 上清液倍比稀释, 平板涂布, 28 °C 培养 2 d, 挑取 9 个半纤维素水解圈较大的菌落, 分别接种到 No.1 培养基中, 平板划线法获得纯菌落, 将菌种分别编号为: X_{y-1} ,

X_{y-2}, X_{y-3}.....X_{y-9}, 斜面保藏备用。

1.3.2 酶液的制备与纯化

将筛选得到的菌株分别接种到 No.2 和 No.3 液体培养基中, 振荡培养 (28 °C, 140 r/min) 4 d 后, 培养液 3500 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。粗酶液倒入截留量为 8000~10000 的透析袋中, 自来水冲洗 4 h 后, 再用蒸馏水浸泡过夜, 透析后的酶液 -20 °C 保存。

1.3.3 木糖标准曲线的制作^[3]

准确称取干燥至恒重的木糖 1.0000 g, 加少量水溶解后定容至 1000 mL, 配成 1000 μg/mL 的木糖标准溶液。按表 1 加入试剂。所得的木糖标准曲线如图 1。

表 1 标准液的制备

试剂/mL	1	2	3	4	5	6
木糖标液/(1000 μg/mL)	1	2	4	6	8	0
蒸馏水/mL	9	8	6	4	2	8
木糖最终浓度/(μg/mL)	100	200	400	600	800	0
取样/mL	1	1	1	1	1	1
DNS/mL	1	1	1	1	1	1

注: 以蒸馏水 + DNS 液作空白, 540 nm 处测吸光值。

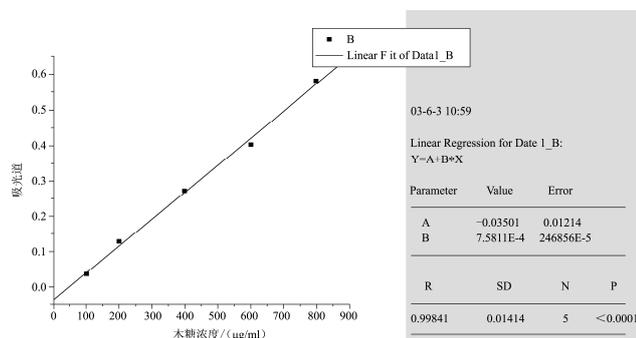


图 1 木糖标准曲线图

1.3.4 酶活的测定^[4]

准确量取 0.1 mL 酶液于试管中, 加入 1 mL 2% 的木聚糖醋酸缓冲溶液, 50 °C 恒温 15 min, 加入 1 mL 2,4-二硝基水杨酸 (DNS) 试液, 沸水煮沸 5 min 显色, 冷却, 定容至 10 mL, 于 540 nm 处读取吸光度值 (以木糖计)。以蒸馏水加 DNS 液作空白。

酶活单位定义为 1 min 生成 1 μmol 木糖的酶量为一个木聚糖酶活力单位。计算公式如下:

$$H = \frac{D \times V_1 \times C_1}{T \times V_2}$$

式中: H—木聚糖酶酶活, U/mL; D—酶液稀释倍数; V₁—比色管定容体积, mL; C₁—木糖浓度, μmol/mL; T—反应时间, min; V₂—酶液体积, mL。

1.3.5 玉米芯中木聚糖的提取^[5]

称取 50 g 40 目玉米芯粉浸泡于 500 mL 10% NaOH 溶液中, 85 °C 下恒温浸提 4 h, 调 pH 至 7, 真空抽滤, 滤液离心 (3500 r/min, 10 min), 沉淀用蒸馏水洗涤直至呈乳白色为止, 所得沉淀即为木聚糖粗品, 在 37 °C 下烘干备用。

木聚糖得率 (ρ) 以下式计算:

$$\rho = m/M \times 100\%$$

式中: m—干木聚糖质量, g; M—玉米芯质量, g。

2 结果与分析

2.1 木聚糖的最佳提取温度

表 2 不同温度下木聚糖的提取率

温度/°C	65	80	85	90	100
100 g 湿物重/g	11.571	29.494	209.363	114.257	10.030
玉米芯 干物重/g	0.760	2.724	14.142	8.569	0.523
得率/%	0.760	2.724	14.142	8.569	0.523

由表 2 可知, 随着温度的升高, 木聚糖的提取率逐渐增大, 当温度 85 °C 时达到最大值, 再继续升温, 提取率反而下降。

2.2 高产木聚糖酶菌株的筛选

2.2.1 初筛

分别用 No.2 和 No.3 培养基培养 X_{y-1}~X_{y-9} 各菌, 用粗酶液酶解木聚糖醋酸缓冲液(A)和木聚糖提取液(B), DNS 法测酶活, 结果如表 3。

表 3 酶活测定结果 单位: U/mL

菌种		X _{y-1}	X _{y-2}	X _{y-3}	X _{y-4}	X _{y-5}
No.2	A	426.6	66.7	83.3	82.6	1280.0
	B	520.1	88.3	103.3	138.6	1352.0
No.3	A	116.6	105.6	205.3	71.3	100.1
	B	272.0	368.6	346.8	220.0	246.7

菌种		X _{y-6}	X _{y-7}	X _{y-8}	X _{y-9}
No.2	A	324.7	25.3	1466.7	64.0
	B	350.7	55.4	1560.4	89.0
No.3	A	130.5	56.0	256.7	150.3
	B	230.5	96.7	420.1	156.3

由表 3 可知, X_{y-4}、X_{y-7} 和 X_{y-9} 菌株所产酶液, 在木聚糖的醋酸钠-醋酸缓冲液中和木聚糖提取液中酶活均较低, 故可淘汰。其余 6 株菌株再用 No.4 培养基培养后, 粗酶液酶解木聚糖的醋酸钠-醋酸缓冲液, DNS 法测其酶活, 结果如表 4。

由表 4 可知, X_{y-2}、X_{y-3} 两株菌所产酶液测酶活较低, 与表 3 的结果相比较, 在同种酶解底物、酶液用

量相同的情况下，其酶活均较低，故这两株菌也可以淘汰。

表 4 酶活测定结果 单位: U/mL

菌种	X _{y-1}	X _{y-2}	X _{y-3}	X _{y-5}	X _{y-6}	X _{y-8}
OD 值	0.301	0.075	0.054	1.301	0.575	1.350
酶活	292.0	86.7	72.0	1327.3	703.5	1402.2

2.2.2 复筛

DNS 法测酶活的原理是测定还原糖量，所以为消除发酵液中还原糖对酶活测定的影响^[6]，对菌株进行复筛。X_{y-1}、X_{y-5}、X_{y-6}和 X_{y-8}四种菌株所产的粗酶液用截流量为 8000~10000 的透析袋透析，除去小分子的还原糖后，其酶活测定结果见表 5。

表 5 透析前后酶活比较 单位: U/mL

		透析前				透析后			
菌株		X _{y-1}	X _{y-5}	X _{y-6}	X _{y-8}	X _{y-1}	X _{y-5}	X _{y-6}	X _{y-8}
OD 值		0.565	1.344	0.348	1.470	0.100	0.067	0.044	0.055
酶活		520	1352.0	324.7	1466.7	108.7	82.7	62.0	70.0

由表 5 可知，透析前后酶液的酶活有显著的差别，说明粗酶液中还原糖的存在干扰了酶活的测定结果。透析后 X_{y-6}和 X_{y-8}菌株所产木聚糖酶酶活较低，故可淘汰。综上所述：从 9 株菌株中可筛选出 X_{y-1}、X_{y-5}两株高产木聚糖酶菌株。

2.3 产酶最适培养基的选择

不同的菌种所需的碳源不同，用不同含量的麸皮、玉米芯、木聚糖作为碳源，配比出 No.1~No.7 选择性培养基，其产酶酶活结果见表 6。

表 6 不同配比的复合碳源下菌株产酶酶活情况表 单位: U/mL

培养基类别	玉米芯:麸皮:木聚糖	X _{y-1}	X _{y-5}
No.1	0:0:0	38.0	58.7
No.2	1.5:1.5:0	284.1	113.3
No.3	2.0:2.0:0	406.7	203.3
No.4	0:1.5:1.5	398.7	598.7
No.5	0:2.0:1.0	455.3	244.2
No.6	0:1.5:0	135.5	106.7
No.7	1.5:0:0	116.7	143.5

由表 6 可知，当用复合碳源培养时，酶活力显著高于单一碳源。而麸皮、木聚糖为复合碳源时，酶活力明显高于其它复合碳源。综合考虑，其最适培养基为 No.4 选择培养基。

2.4 最佳酶解条件的确定

不同种类的酶都有其最佳酶解条件，如温度、pH 值、酶解时间等，李丹^[7]报道木聚糖酶的最佳酶解温度为 50 °C。因此，本课题主要研究了木聚糖酶的最佳酶解时间和 pH 值。

2.4.1 酶解时间对酶活力的影响

准确量取 10 mL 酶液，加入 10 mL 20% 的木聚糖醋酸缓冲液 (pH 5.0)，50 °C 下保温 24 h，10 h 后每 2 h 取样测酶活，酶解产物薄层层析。

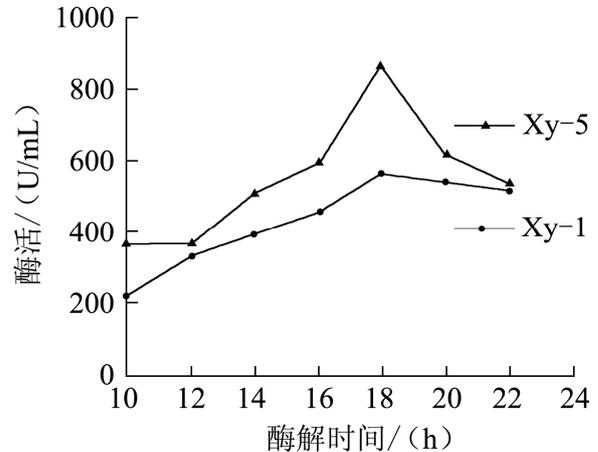


图 2 酶活随时间变化曲线图

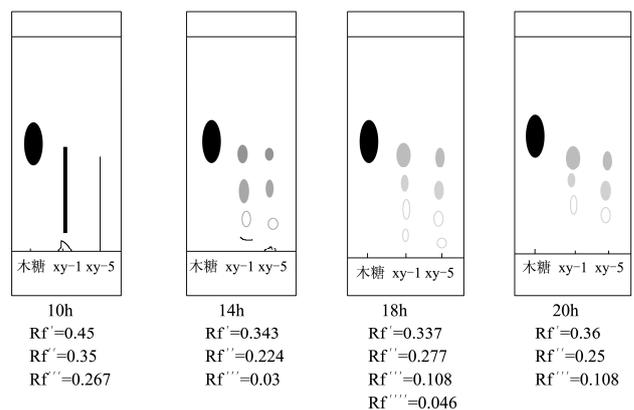


图 3 薄层层析结果图

由图 2 和图 3 可知，酶解 18 h 时，酶的活性最高，且木聚糖酶解产物分离效果较好，层析点最清晰，故选择酶解时间为 18 h。

2.4.2 最佳 pH 值的选择

取酶液 1 mL，加入到不同 pH 值的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中，50 °C 下进行酶解反应，实验结果见图 4。

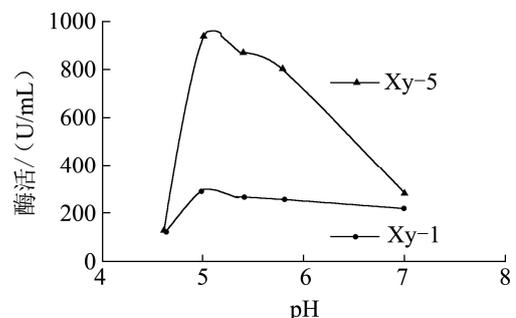


图 4 酶活与 pH 关系曲线图

由图 4 可知，pH 5.0 时，木聚糖酶酶活最高，超

(下转第 10 页)