

嗜热真菌耐热木聚糖酶的产酶条件和酶谱分析*

李秀婷¹ 李里特¹ 江正强^{1**}

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)¹

摘要:嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* CBS288.54-M18 耐热木聚糖酶的产酶条件和酶谱分析结果表明:玉米芯水不溶木聚糖相对于其它来源木聚糖为最佳碳源,而酵母提取物和蛋白胨作为复合氮源时效果最好。培养基最适初始 pH 值为 7.0,最适培养温度为 50 ℃。在最适条件下发酵所产木聚糖酶活力最高达 1,834 u/mL。另外,SDS-PAGE 和酶谱分析(变性和非变性状态下)结果都表明该菌只产生一种分子量约为 26 kD 的 G/11 族木聚糖酶。

关键词:嗜热真菌,耐热木聚糖酶,发酵条件,酶谱

中图分类号: Q93-939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0049-06

ZYMOGRAPHY AND PRODUCTION OF A THERMOSTABLE XYLANASE FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* *

LI Xiu-Ting¹ LI Li-Te¹ JIANG Zheng-Qiang^{1**}

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)¹

Abstract: Cultivation conditions of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS288.54-M18 for the production of thermostable xylanase were investigated. Corn cob xylan (water-insoluble) was found to be the best inducer and C source. Tryptone + yeast extract was the best nitrogen sources. The optimal temperature and the initial pH of the cultures for xylanase production were 50 ℃ and pH 7.0, respectively. The highest xylanase activity of 1,834 u/mL was achieved under these optimal conditions, whereas the crude xylanase was stable for more than 6 hours at 60 ℃. In addition, SDS-PAGE and zymography analysis of culture supernatant under native and denature conditions revealed the presence of a single 26 kD xylanase of family G/11.

Key words: *Thermomyces lanuginosus*, Thermostable xylanase, Fermentation condition, Zymography

木聚糖是植物半纤维素的主要组分,在自然界中含量仅次于纤维素,主链由木糖残基以 β -1,4 键连接而成。 β -1,4-木聚糖酶 [Xylanase, EC3.2.1.8] 是一类以内切方式水解木聚糖分子中 β -1,4-木糖苷键的酶类,水解产物主要为不同聚合度的木寡糖和少量木糖,是木聚糖降解酶中最关键的酶。

近年来,木聚糖酶在饲料、造纸及食品等行业都有广泛的应用,如制浆造纸工业中的纸浆生物漂白,食品工业的功能性低聚木糖制造及面团改良剂,饲料工业的饲料添加剂等^[1]。国外对木聚糖酶的研究已逐渐趋向成熟和产业化,细菌、真菌和放线菌所产的木聚糖酶都得到了广泛而深入的关注和研究^[2],并且在 1992 年就已经实现了酶制剂的工业化生产^[3]。木聚糖酶作为一种工业酶制剂在我国尚属空白。尽管近几年国内也在进行相关研究,如杨瑞金等^[4]研究真菌所产木聚糖酶,白云玲等^[5]研究细菌所产

* 国家 863 项目部分内容 (No. 2001AA214171)

教育部留学回国启动基金部分内容

** 联系人 E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2003-04-27, 修回日期: 2003-10-08

木聚糖酶,高庆义等^[6]研究放线菌所产木聚糖酶,但所有这些菌株所产木聚糖酶的活力都不高,工业化应用前景不大。

嗜热真菌 *T. lanuginosus* 是迄今已报道的最好的木聚糖酶的生产菌之一,因其木聚糖酶的高产量以及所产耐热木聚糖酶的潜在的工业应用前景而倍受关注。嗜热真菌 *T. lanuginosus* 的许多菌株所产的木聚糖酶不仅耐热而且具有优异的耐碱性能^[7]。嗜热真菌 *T. lanuginosus* DSM 5826^[8] 及 SSBP^[9] 的产酶条件及性质都已有较深入的研究报道,但是未见到 *T. lanuginosus* CBS288.54 发酵产酶等的研究报道。因此,研究嗜热真菌 *T. lanuginosus* CBS288.54-M18 耐热木聚糖酶的产酶条件和酶谱分析,为进一步研究纯酶的酶学性质和挖掘其潜在的工业应用价值提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

原始菌株嗜热真菌 *T. lanuginosus* CBS288.54 购于荷兰菌种保藏中心。菌株经甲基磺酸乙酯(EMS)和亚硝基胍(NTG)作为诱变剂,选用青霉素和链霉素作为菌种诱变后的筛选子,所获得的能在抗生素平板上生长,产酶稳定且活力较高的诱变株 *T. lanuginosus* CBS288.54-M18 作为实验菌株。保藏斜面培养基和种子产生培养基均为 PDA 培养基, pH 6.5, 40℃ 培养 5~6d 备用。

1.2 试剂

玉米芯木聚糖、棉子壳木聚糖、甘蔗渣木聚糖、稻壳木聚糖等制造方法参考文献[10];桦木木聚糖、低粘度羧甲基纤维素为 Sigma 产品;大豆蛋白胨、牛肉蛋白胨等购自北京双旋培养基制造厂;其他试剂为分析纯。

1.3 发酵产酶

1.3.1 发酵产酶培养基:玉米芯木聚糖 20g, 酵母提取物 10g, 蛋白胨 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, FeSO_4 0.3g, CaCl_2 0.3g, 定容至 1L。

1.3.2 培养条件:300 mL 三角瓶装液量 100 mL, 接入 1 cm² 见方的平板培养基上生长 5~6d 的菌丝体, 45℃ 条件下以 200 r/min 的转速培养 7d, 8,000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定木聚糖酶活力。

1.3.3 发酵产酶条件:在发酵产酶培养基的基础上,上述培养条件下,改变碳源种类,浓度为 2%,考察碳源对产酶的影响;最佳碳源确定后,用不同的有机氮源或无机氮源作为唯一氮源,浓度 2%,来考察氮源对产酶的影响;在优化的碳氮源基础上确定了培养基初始 pH 值之后,寻求菌株产酶的最佳温度。

1.4 木聚糖酶活力的测定

木聚糖酶活力的测定参照 DNS 法^[11]:0.1 mL 适当稀释的酶溶液,加入到 0.9 mL 用 0.05 mol/L、pH6.5 柠檬酸钠缓冲液配制的 1% 桦木木聚糖(Sigma)底物溶液中,50℃ 反应 10 min,用 DNS 法测定释放的还原糖量,同时以木糖作标准。木聚糖酶活力单位(u)的定义为:在上述条件下,每分钟水解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需要的酶量。

纤维素酶活力:方法同上,仅将底物和标准物分别换成低粘度羧甲基纤维素(Sigma)和葡萄糖。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)与酶谱分析

SDS-PAGE 按照 Laemmli (Laemmli, Nature, 1970) 的方法进行。分离胶 12.5%, 浓

缩胶 4.5%，考马斯亮兰染色显示蛋白带，低分子量标准蛋白与样品在同一条件下进行电泳。非变性状态下酶谱分析：Native-PAGE 方法同上，在样品与分离胶中不加 SDS 与巯基乙醇。电泳后按 P.Beguin (Beguin P. Anal Biochem, 1983) 方法活性染色定位活性带。木聚糖酶样品经凝胶电泳后，铺在含木聚糖的胶板上，40℃保温一段时间，经 1% 刚果红染色，1 mol/L NaCl 漂洗脱色，在酶作用的相应位置就显现出透明斑。变性状态下的酶谱分析是在分离胶中添加 0.1% 桦木木聚糖 (Sigma)，并采用标准 SDS-PAGE 的方法电泳后，用 25% 的异丙醇溶液使蛋白复性，40℃保温酶反应后染色显现透明带。低分子量标准蛋白 (Amersham)：14.4 ~ 97.0 kD。

1.6 酶的热稳定性

粗酶液在 0.05 mol/L、pH6.5 柠檬酸钠缓冲体系中，60℃和 65℃条件下保温不同时间后立即冰水浴冷却，按常规方法测定木聚糖酶的活力（用未经处理的酶液作对照）。

2 结果与讨论

2.1 产酶条件研究

2.1.1 碳源种类对产酶的影响：从表 1 不同碳源的诱导结果可以看出，木糖能起到一定的诱导作用，只是酶产量较低；自制的玉米芯全木聚糖有利于木聚糖酶合成，且诱导效果相当好。在自然条件下，木聚糖酶属于诱导酶，只有在合适的诱导物存在的条件下，微生物才会将较多的木聚糖酶蛋白分泌到细胞外。诱导微生物细胞产生并分泌木聚糖酶的底物有很多，各种来源的木聚糖均能起到较好的诱导效果^[10]（表 2）。

表 1 不同碳源对菌株最高酶活的影响*

碳源	木聚糖酶活力 (u/mL)	菌丝生长情况
D-Glucose	-	菌丝较短，较少
D-Xylose	40	菌丝较短，稀疏
Sucrose	-	菌丝较短，较少
Glycerol	-	菌丝较短，较少
Lactose	-	菌丝较短，较少
CMC	5	菌丝较短，较少
Corn cob xylan	865	菌丝较长，茂密
Control	-	菌丝较短，较少

* 碳源含量 2.0%，氮源 2.0%，初始 pH 值 7.0，两次实验结果平均值

表 2 不同来源木聚糖对产酶的影响*

木聚糖类型	木聚糖酶活力 (u/mL)	发酵液终 pH 值	菌丝生长情况
桦木木聚糖 (Sigma)	766	8.69	菌丝较长，茂密
桦木木聚糖 (Sigma)	866	8.65	菌丝较长，茂密
燕麦木聚糖 (Sigma)	662	8.50	菌丝较长，茂密
玉米芯全木聚糖	865	8.56	菌丝较长，茂密
玉米芯水不溶木聚糖	1627	8.66	菌丝较长，茂密
玉米芯水溶木聚糖	320	8.36	菌丝较长，茂密
甘蔗渣水不溶木聚糖	534	8.51	菌丝较长，茂密
甘蔗渣水溶木聚糖	283	8.22	菌丝较长，茂密
棉子壳全木聚糖	602	8.47	菌丝较长，茂密
棉子壳水不溶木聚糖	478	8.52	菌丝较长，茂密
棉子壳水溶木聚糖	422	8.50	菌丝较长，茂密
稻壳全木聚糖	385	8.47	菌丝较长，茂密

* 碳源含量 2.0%，氮源 2.0%，初始 pH 值 7.0，两次实验结果平均值

2.1.2 氮源种类对产酶的影响:以不同的有机氮源和无机氮源作为唯一氮源,碳源用同一批次的自制玉米芯水不溶木聚糖,含量为 2.0%,来考察氮源对木聚糖酶合成的影响。实验发现无机氮源对酶合成促进作用不大,几类铵盐所产木聚糖酶活力都很低;有机氮源相对于无机氮源而言,较为理想,其中以 Tryptone 作为氮源菌株所产木聚糖酶为最高,如表 3 所示。试验还表明单一氮源不如复合氮源好,故选用 Tryptone + Yeast extract 作为复合氮源。从发酵液的终 pH 值和所产木聚糖酶的酶活力综合来看,虽然菌株利用有机氮源使发酵液的 pH 值逐渐升高,但是并没有影响木聚糖酶的合成和分泌。

表 3 不同氮源对菌株最高酶活和发酵液终 pH 值的影响*

氮源类型	木聚糖酶活力 (u/mL)	发酵液终 pH 值
Tryptone	1181	8.23
Yeast extract	886	8.53
Soybean peptone	675	8.36
Beef peptone	386	8.45
(NH ₄) ₂ SO ₄	84	6.72
NH ₄ Cl	85	6.75
di-Ammonium hydrogen citrate	122	6.56
NH ₄ NO ₃	98	6.64
Tryptone (1.0%) + Yeast extract (1.0%)	1627	8.66
Control	88	7.10

* 氮源含量 2.0%, 玉米芯木聚糖为碳源 2.0%, 初始 pH 值 7.0, 两次实验结果平均值

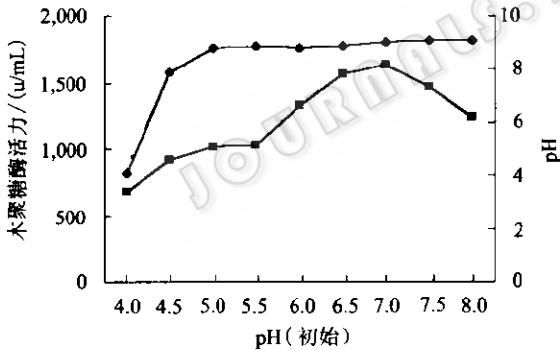


图 1 培养基初始 pH 对产酶的影响
■ 木聚酶活力, ◆ 终 pH 值

2.1.3 初始 pH 值对产酶的影响:在优化碳氮源的基础上,以 0.1mol/L 柠檬酸或氢氧化钠溶液调节培养基的初始 pH 4.0~8.0,培养 7 d 最高酶活力如图 1。培养基初始 pH 不仅影响菌丝的生长繁殖,而且对产酶量有显著的影响。图 1 结果显示,培养基初始 pH 在 6.0~7.5 之间对菌株合成和分泌木聚糖酶有利:从初始 pH 5.5 的酶活力 1,035u/mL 增至 pH6.5 的 1,558 u/mL,并在 pH 7.0 时得到最高酶活力 1,627 u/mL;而在初始 pH 为 4.0 和 8.0 时,

所得到的酶活力分别为 pH7.0 的 42%和 77%。这表明该菌产酶的最适 pH 是中性的。在发酵过程中,通过显微镜观察该菌在不同初始 pH 的培养基中的生长过程,结合菌株培养 7d 的发酵液的最终 pH 值的变化,可知该菌生长对培养基的要求并不苛刻,其在初始 pH 5.0~8.0 的培养基中都能较好地生长,但酶的合成和分泌对培养基初始 pH 的要求相对来说要严格得多:仅在初始 pH 6.5~7.0 左右的培养基中才能得到高产量的木聚糖酶。

2.1.4 温度对产酶的影响:在最佳碳源和最佳氮源培养基基础上,采用不同温度对菌株进行发酵培养。由图 2 可知,本试验条件下,在 50℃时该菌所产木聚糖酶活力最高,

发酵 7d 所得到最终酶活力高达 1,834 u/mL。另外该菌在 45℃ 发酵也能得到较高的酶活力,而在 30℃ 和 55℃ 条件下培养该菌株仅能得到最高酶活力的 38% 和 51%。

2.1.5 产酶曲线与生长过程:图 3 是菌株在摇瓶培养条件下的产酶曲线。菌株在优化的发酵条件下,从第 2d 起培养液中木聚糖酶活力开始升高,在第 7d 达到峰值,然后基本保持稳定。培养液的 pH 值随着发酵时间的增加而显示出逐渐增加的态势。观察菌丝在发酵过程中的变化,发现在培养的前 3d,菌丝已基本完成生长,但酶活较低(466u/mL),从第 4d 起菌丝开始逐渐老化,到第 7d 时发酵液中的菌丝较少且菌丝很短;而木聚糖酶活力的变化却与菌丝的生长变化不同步:木聚糖酶活力从第 4d 的 684u/mL 的迅速升高至第 6d 的 1,790u/mL,在两天时间内完成了其最大酶量的 60% 的合成和分泌,并在第 7d 达到最大值 1,834 u/mL,然后酶活力变化不大。可以认为,此菌株的木聚糖酶的产生是滞后于菌丝生长的。用前述方法测定酶液的纤维素酶活力,发现该酶液中并不含有纤维素酶。

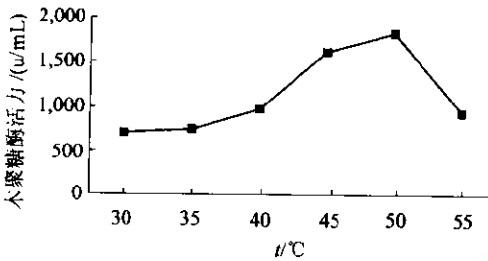


图2 发酵温度对产酶的影响

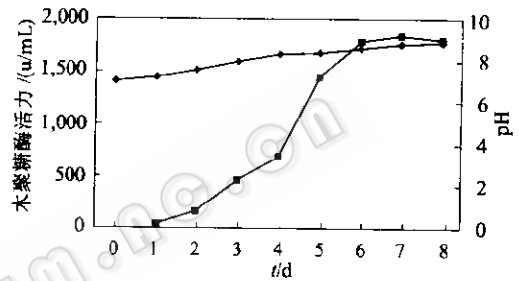


图3 产酶曲线

2.2 粗酶热稳定性

粗酶液的热稳定性见图 4。酶在 60℃ 和 pH 6.5 的条件下相当稳定,保温 6 h 以上酶活力几乎无变化(数据未显示);在 65℃ 和 pH 6.5 的条件下处理,剩余酶活力虽呈现出下降的趋势,但下降速度缓慢:保温 30min 酶活力仅损失了 4%,1 h 后损失 13%,保温 2 h 剩余酶活力仍在 70% 以上。

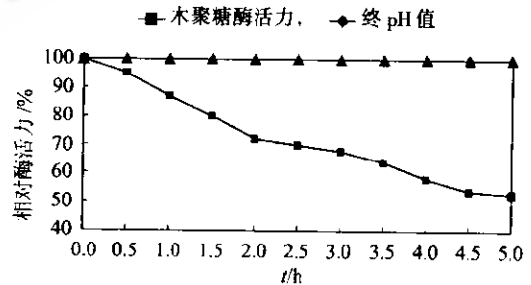


图4 粗酶热稳定性

同时,在酶活力的测定过程中发现,该酶液在较高温度测定时,活力表现出巨大的增幅:50℃ 时酶活力是 1,834 u/mL,而在 65℃ 测定则高达 4,700 u/mL,说明该酶有较好的耐热性。Singh 等^[9]报道嗜热真菌 *T. lanuginosus* 的另一株 SSBP 所产木聚糖酶的最适温度是 70℃,且在较宽的 pH 范围内有优良的热稳定性,因此深入研究该菌株所产木聚糖酶的性质具有实际意义。

2.3 木聚糖酶蛋白的 SDS-PAGE 和酶谱分析

嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54-M18 以玉米芯来源的木聚糖为诱导物所产酶液的 SDS-PAGE 如图 5A 所示。从 SDS-PAGE 上得到酶蛋白的分子量约为 26 kD。该值高于 Anand 等报道的嗜热真菌 *Humicola lanuginosa* (曾用名) 所产的木聚糖酶的分子量,其值为 22.5 kD;也稍高于 Singh 等^[9]所报道的嗜热真菌 *T. lanuginosus* 的另一株

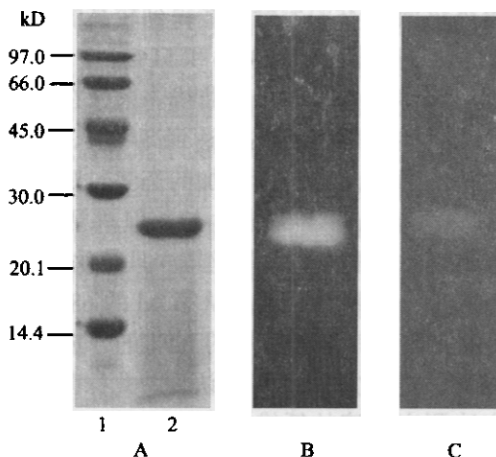


图5 SDS-PAGE (A) 和酶谱分析 (B 和 C)

- 1 低分子量标准蛋白 (14.4 ~ 97.0 kD),
- 2 *T. lanuginosus* CBS 288.54-M18 粗酶液

SSBP 所产酶蛋白的分子量——其在不同诱导底物条件下所产生的木聚糖酶的分子量表现出高度的一致性, 均为 24.7 kD; 与 Purkarthofer 等研究的 *T. lanuginosus* DSM5826 所产木聚糖酶的分子量接近, 其值是 26.0 kD。据此可初步推断 *T. lanuginosus* CBS 288.54-M18 所产的木聚糖酶属于 G/11 族。另外, 酶蛋白带显示出粗酶溶液中木聚糖酶蛋白的量大大高于其它杂蛋白的量。变性状态下的酶谱分析结果显示 (图 5B), 酶液只在约 26 kD 处有一个木聚糖酶活性带。图 5C 是木聚糖酶蛋白的 Native-PAGE 活性染色结果, 可知该木聚糖酶是一单亚基蛋白。国内在真菌产木聚糖酶研究中, 多组分的木聚糖酶较常见, 如杨

瑞金等^[4]在顶青霉, 吴克等^[12]在宛氏拟青霉等的木聚糖酶的研究中发现, 这些真菌产生的木聚糖酶均由 2 种或 2 种以上木聚糖酶构成, 真菌产单一组分耐热木聚糖酶的研究比较少见。

3 结论

摇瓶产酶实验显示, 该菌株产酶培养基最适初始 pH 值为 7.0, 玉米芯水不溶木聚糖是最好的碳源和诱导物, 蛋白胨和酵母提取物作为复合氮源时所产木聚糖酶活力最高。发酵液最高木聚糖酶酶活达到 1,834 u/mL, SDS-PAGE 和酶谱分析表明该菌只产生一种分子量约为 26 kD 的 G/11 族木聚糖酶, 而且该酶耐热且不含纤维素酶活力。因而, 该菌所产的木聚糖酶具有潜在的工业应用前景, 是制备工业酶制剂的优良菌株。该菌株所产的木聚糖酶的纯化和性质有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wong K K Y, Saddler J N. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12: 413 ~ 435.
- [2] Fiserova M, Opalena M, Vyskumny U. Pulp and Paper Research Institute VUPC Bulletin, 1994, 30 (3): 16.
- [3] Senior D J, Hamilton J, Bernier J R L. Progress in Biotechnology, 1992, 7: 555 ~ 558.
- [4] 杨瑞金, 许时婴, 王 璋. 无锡轻工大学学报, 2001, 20 (1): 35 ~ 39.
- [5] 白云玲, 许正宏, 孙 微, 等. 微生物学通报, 2000, 27 (4): 278 ~ 280.
- [6] 高庆义, 王效忠, 毕瑞明, 等. 工业微生物, 2001, 31 (3): 36 ~ 37.
- [7] Gomes J, Purkarthofer H, Hayn M, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 700 ~ 707.
- [8] Cesar T, Mrsa V. Enzyme Microb Technol, 1996, 19: 289 ~ 296.
- [9] Singh S, Pillay B, Dilsook V, et al. J Appl Microbiol, 2000, 88: 975 ~ 982.
- [10] Kusakabe I, Yasui T, Kobayashi T. J Agr Chem Soc Japan, 1976, 50: 199 ~ 208.
- [11] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J Biotechnol, 1992, 23: 257 ~ 270.
- [12] 吴 克, 蔡敬民. 工业微生物, 1998, 28 (2): 31 ~ 34.