

毛栓菌木聚糖酶理化性质及动力学研究

王 旭, 柏玉洁, 朱启忠, 任延刚
(山东大学威海分校海洋学院, 威海 264209)

摘要: 从威海市玛珈山上获得毛栓菌(*Trametes trogii*), 在对其产酶条件研究的基础上, 主要研究 pH、温度、无机离子对毛栓菌木聚糖酶活性和稳定性的影响, 以及该酶底物浓度效应和 K_m 值测定。结果表明: 在 pH 6.81 左右酶活性最高, pH 在 5.60~9.18 范围内体现较强的稳定性, 最适酶解温度为 40℃, 酶液在 50℃以下有较好的热稳定性, Na^+ 、 Mn^{2+} 对木聚糖酶有激活作用, 而 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 则抑制木聚糖酶活性, 表观 K_m 值为 $1.25 \times 10^{-2} g \cdot L^{-1}$ 。
关键词: 木聚糖酶; pH; 温度; 无机离子; K_m
中图分类号: TQ91 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)06-0007-03

Study on Characteristics of Xylanase from *Trametes trogii*

WANG Xu, BAI Yu-jie, ZHU Qi-zhong, REN Yan-gang
(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai 264209)

Abstract: *Trametes trogii* was screened from Majia Hill in Weihai. The effect of pH, temperature and inorganic ion on *Trametes trogii* xylanase activity and stability was studied. Meanwhile, the substrate concentration effect of this xylanase was also studied and K_m was measured. The results showed: The optimum pH of the xylanase was 6.81, and the xylanase was stable when pH from 5.6 to 9.18. The optimum of xylanase was 40℃, and the xylanase could work continuously under 50℃. Na^+ , Mn^{2+} had activation but Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} had inhibition on activity of xylanase. The K_m of the xylanase measured $1.25 \times 10^{-2} g \cdot L^{-1}$.
Key words: xylanase; pH; temperature; inorganic ion; K_m

木聚糖是植物半纤维素的重要组成部分, 它占植物碳水化合物总量的 1/3, 在自然界中是继纤维素之后的含量第二丰富的再生生物资源。木聚糖酶是半纤维素酶的一种, 是一种能降解木聚糖的复合酶。木聚糖酶由于其能解除小麦、黑麦、燕麦等谷物饲料中的抗营养因子, 改善动物生产性能, 提高养分消化率而被广泛应用于畜禽饲料中^[1-4]; 在造纸和纸浆工业中, 木聚糖酶的重要性在于其取代了有毒的化学物质, 同时通过酶法预处理可以回收该行业中有用的副产物; 木聚糖的水解产物(木糖和低聚木糖)可应用在食品行业, 比如作为增稠剂、脂肪替代物或抗冷冻食品添加剂; 此外木聚糖酶在制药工业、焙烤工业、酿酒行业中也有重要应用^[5]。我国对霉类如黑曲霉、木霉特性的研究已有报道, 但国内未见

有研究毛栓菌木聚糖酶特性的报道。为此, 我们对毛栓菌产生木聚糖酶特性进行了研究, 对进一步开发木聚糖酶资源具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 材料

毛栓菌(*Trametes trogii*)采自威海市玛珈山上并经分离纯化而得, 经组织培养鉴定为毛栓菌, 测定发现具有较高的木聚糖酶活性。

1.2 试剂

木聚糖, 柠檬酸, 柠檬酸钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 甘氨酸, 氢氧化钠, 酒石酸钾钠, 3, 5-二硝基水杨酸, 苯酚, 亚硫酸钠, 试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.4 方法

1.4.1 培养方法 综合马铃薯固体培养基($g \cdot L^{-1}$): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 3, $MgSO_4$ 1.5, VB₁ 0.01, 琼脂 20 培养毛栓菌。液体培养基采用前期论文中产酶最适培养基($g \cdot L^{-1}$): 马铃薯 200, 麸皮 20, KH_2PO_4 3, $MgSO_4$ 1.5, VB₁ 0.01,

收稿日期: 2008-03-23
基金项目: 山东大学威海分校科研项目(A07047)
第一作者简介: 王旭(1987-), 女, 山东省淄博市人, 本科在读, 从事酶工程学研究。E-mail: 2005xiaoweiwei@163.com。
通讯作者: 朱启忠, 硕士研究生导师, 男, 山东单县人, 教授, 系主任, 从事生物化学的教学和科研工作。Tel: 0631-5688660; E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

(NH₄)₂SO₄ 5。转速为 130 r·min⁻¹, 在 28℃下接种 4 片菌片, 装液量 1/5 恒温震荡培养。

1.4.2 粗酶液制备 在培养的第 5 天取样, 发酵液经四层纱布过滤, 4 000 r·min⁻¹ 离心, 上清液即为粗酶液, 冰箱保存备用。

1.4.3 酶活测定 取底物 1 mL 于管中, 据酶活大小加适量的粗酶液 (要求最终测酶活时 OD 值在 0.2~0.8), 补加柠檬酸钠缓冲液至 2 mL, 50℃水浴反应 30 min, 加 3 mL DNS 混匀, 沸水浴 7 min, 取出冷却后加水至 25 mL, 在 540 nm 处测 OD 值^[9]。以每分钟 1 mL 粗酶液与木聚糖反应产生木糖的浓度 (μmol·mL⁻¹) 作为一个酶活单位。

1.4.4 酶的动力学测定 在不同的 pH、温度、金属离子等存在下, 测定对反应速度的影响。

1.4.5 蛋白质的测定 以牛血清蛋白为标准, 采用考马斯亮蓝法。

2 结果与分析

2.1 毛栓菌产木聚糖酶曲线

在毛栓菌的最适培养基中进行培养, 木聚糖酶从第 2 天酶活迅速提升, 第 8 天达产酶高峰, 随后产酶能力下降 (见图 1)。

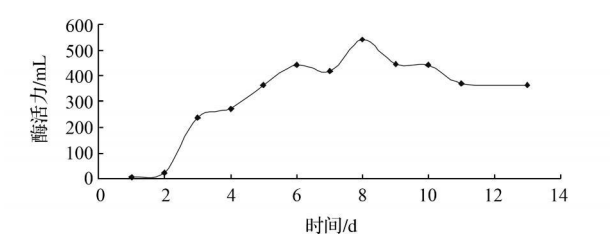


图 1 毛栓菌产木聚糖酶曲线

2.2 木聚糖酶反应的最适 pH 的测定

木聚糖酶酶液在 pH 3.40~6.00 的柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液和 pH 6.24~9.18 的磷酸氢二钠—磷酸二氢钾缓冲液条件下酶活测定结果 (见图 2)。

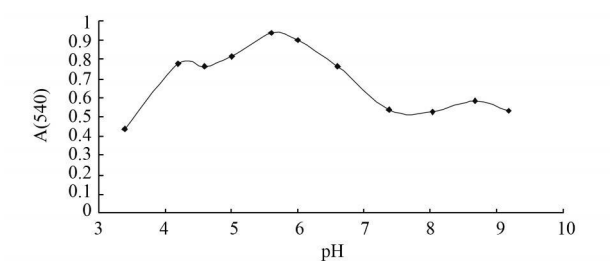


图 2 木聚糖酶最适 pH

在 pH 3.40~6.81 时, 酶活随 pH 的升高而升高, pH 在 6.81 左右酶活达到最高, 接着呈下降趋势, 但 pH 为 8.67 时, 略有升高, 很可能与改变缓冲溶液有关。说明毛栓菌产木聚糖酶是碱性水解酶, 但在弱酸条件下也有较高酶活。

2.3 木聚糖酶的 pH 稳定性

将酶液在不同 pH 条件下, 保持 3.5 h 后, 再测

定剩余酶活力。以最初酶活力为对照 (100%)。

剩余酶活 (%) = (各 pH 条件下的剩余酶活力 / 最初酶活力) × 100% (见表 1)。

表 1 木聚糖酶的 pH 稳定性

pH	剩余酶活/%	pH	剩余酶活/%
3.40	85.67	6.60	97.51
4.20	89.74	7.38	96.64
4.60	84.99	8.03	95.78
5.00	88.35	8.67	96.52
5.60	92.25	9.18	94.33
6.00	94.76	10.60	89.81

由表 1 可得毛栓菌分泌木聚糖酶具有很高的耐碱性, pH 在 5.6~9.2 范围内, 剩余酶活保持在 90% 以上。故使用时可用碱性缓冲溶液来稀释木聚糖酶。

2.4 木聚糖酶的最适温度

由图 3 可见, 毛栓菌木聚糖酶的活性受温度影响很大, 在实验条件下 (pH 5.6 反应 10 min) 温度 20~100℃下, 最适酶解温度为 40℃。

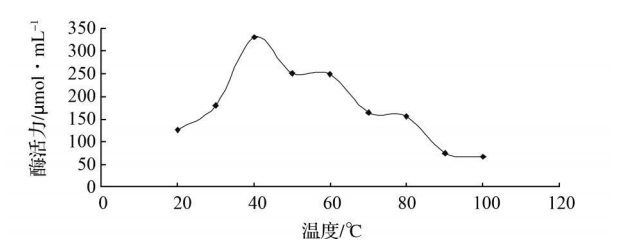


图 3 温度对木聚糖酶活力的影响

2.5 酶液保存温度对木聚糖酶活性影响

酶液分别自 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100℃水浴中保温 10 min, 然后测定木聚糖酶活性 (见表 2)。

表 2 酶液保存温度与木聚糖酶活性的关系

温度/℃	酶活/A	温度/℃	酶活/A
20	0.455	70	0.067
30	0.498	80	0.072
40	0.503	90	0.062
50	0.356	100	0.038
60	0.140		

由表 2 可以看出, 酶液在 50℃以下保温对酶活影响较小, 当高于 60℃, 则酶活受到严重影响, 当达到 100℃时, 酶活近似为 0。

2.6 无机离子对木聚糖酶活性影响

当反应液内无机离子盐浓度为 1 mg·mL⁻¹ 时, Na⁺、Mn²⁺ 对木聚糖酶有激活作用, 而 Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺ 则抑制木聚糖酶活性, 其它离子影响相对较小 (见表 3)。

2.7 底物浓度对酶活的影响及酶的表现 K_m 值

设置底物浓度的倒数分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 时, 测定酶活, 用双倒数法求得米氏常数, 可求得粗酶的表现 K_m 值为 1.25 × 10⁻² g·L⁻¹ (见图 4)。

表 3 无机离子对毛栓菌木聚糖酶活力的影响			
试剂/ 1.0 mg · mL ⁻¹	相对酶活/ %	试剂/ 1.0 mg · mL ⁻¹	相对酶活/ %
H ₂ O	100	ZnCl ₂	103.45
NaCl	113.69	乙酸铅	95.86
CuSO ₄ · 5H ₂ O	21.33	KCl	103.11
Fe ₂ (SO ₄) ₃	60.89	MgSO ₄ · 7H ₂ O	103.91
CaSO ₄ · 2H ₂ O	84.59	MnCl ₂ · 4H ₂ O	153.03

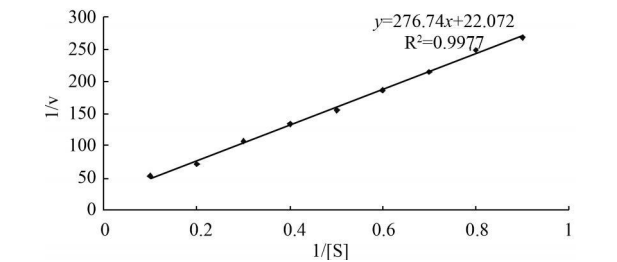


图 4 毛栓菌木聚糖酶的表现 Km 值

3 讨论

对毛栓菌木聚糖酶特性的研究结果表明,在 pH 为 6.81 左右酶活性最高, pH 在 5.60~9.18 范围内有较好的耐碱性. 剩余酶活均保持在 90% 以上,这与朱启忠^[7]报道的链霉菌的木聚糖酶较为一致,但不同于王在贵^[8]木霉的木聚糖酶最适 pH 为 5.5; 最适酶解温度为 40℃, 酶液在 50℃ 以下有较好

的热稳定性, 相比耐热性较好; Na⁺、Mn²⁺ 对木聚糖酶有激活作用, 而 Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺ 则抑制木聚糖酶活性, 所以对于毛栓菌木聚糖酶应注意金属离子的影响; 表观 Km 值为 1.25 × 10⁻² g · L⁻¹, 与底物的亲和力较高, 因而可以在较广的温度和酸碱范围内有较高的活性, 有着巨大的潜力.

参考文献:

[1] Bedford M R I C mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes[J]. Animal Feed Sci. Tech., 1995, 53: 145-155.

[2] Jeroch H, Danicic S, Bnfau J. The influence of enzyme preparations on the nutritional value of cereals for poultry[J]. J. Animal Feed Sci., 1995, 4: 263-285.

[3] Mqrquardt R R, Boros P, Guenter W, et al. The nutritive value of barley, rye, wheat and corn for young chicks as affected by use of a Trichoderma reese enzyme preparation[J]. Animal Feed Sci. Tech., 1994, 45: 363-378.

[4] 汪傲, Tapio Juokslahti. 木聚糖酶制剂对生长肥育猪次粉日粮饲养效果的影响[J]. 中国饲料, 1997(3): 17-19.

[5] 怀文辉, 何秀萍. 微生物木聚糖酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学报, 2007, 27(2): 137.

[6] 董国强, 张猛白, 林开江. 半纤维素酶的 DNS 液显色法测定[J]. 浙农业科学, 1989(2): 88-89.

[7] 朱启忠, 张法忠, 韩晓弟, 等. 链霉菌 Str S-2 产木聚糖酶的条件及部分性质研究[J]. 生物技术, 2004, 14(3): 51-52.

[8] 王在贵, 万赛罗, 李绚丽, 等. 木霉木聚糖酶的酶学性质研究[J]. 中国林副特产, 2007, 86.

(上接第 6 页)

水稻进行苗期、全生育期抗旱性的观察。

3.2 NCED 基因对水稻抗旱性

9-顺式环氧化类胡萝卜素过氧化物酶(9-cis-epoxy carotenoid dioxygenase, NCED)催化的氧化裂解是 ABA 合成途径中的关键调控步骤^[9]。植物中的 NCED 是个多基因家族, 并且它的表达具有组织特异性. 水分亏缺能诱导 NCED 的表达, 调控 ABA 的合成^[10]。在水分胁迫下, NCED 基因的表达、NCED 蛋白水平与脱水的根和叶中的 ABA 含量水平相关, 说明在水分胁迫下 NCED 对 ABA 的合成具有调控作用^[11]。由以上可以看出 NCED 基因调控 ABA 的合成来适应干旱胁迫, NCED 在植物抗旱性方面具有重要的作用。

本试验结果表明, 转 NCED 基因水稻与对照 Kitaake 相比较, 具有更强的抗旱性. 因此, 可以对 NCED 基因做更深入的研究, 使抗旱性与现有品种的优良性状结合起来, 培育出适应不同地区的抗旱性强、产量高、米质优、熟期多样化的新品种。

参考文献:

[1] 康绍忠. 新的农业科技革命与 21 世纪我国节水农业的发展[J]. 干旱地区农业研究, 1998, 16(1): 11-17.

[2] 张正斌, 山仑. 作物抗旱生理性状的遗传研究进展[J]. 科学通报, 1998, 43(17): 1812-1817.

[3] 李自超, 刘文欣, 赵笃乐. PEG 胁迫下水、陆稻幼苗生长势比较研究[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 16-20.

[4] Blum A. An evaluation of seed and seedling drought tolerance screening tests in wheat[J]. Euphytica 1980, 29: 727-736

[5] 薛慧勤, 甘信民, 顾淑媛, 等. 花生种子萌发特性和抗旱性关系的高渗溶液法[J]. 中国油料作物学报, 1997, 19 (3): 30-331.

[6] 惠红霞, 李树华, 许兴. 高渗溶液鉴定小麦抗旱性的方法[J]. 宁夏农学院学报, 2000, 21(3): 28-321.

[7] 王玉萍, 刘庆昌, 李爱贤. 甘薯耐旱突变体的离体筛选与鉴定[J]. 中国农业科学, 2003, 36(9): 1000-1051.

[8] 王贺正, 马均, 李旭毅, 等. 水稻种质芽期抗旱性和抗旱性鉴定指标的筛选研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(5): 594-599.

[9] Zeevaart JAD, Creelman RA. Metabolism and physiology of abscisic acid[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1988, 39: 439-473.

[10] Seo M, Koshiba T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants[J]. Trends Plant Sci., 2002, 7: 41-48.

[11] Qin X, Zeevaart JAD. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water stressed bean[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 15354-15361.