

木聚糖酶菌株的筛选及酶切位点的分析

孙宇哲¹, 王彦超¹, 郝再彬^{1,2*}, 张厚瑞³

(1. 东北农业大学 农学院, 哈尔滨 150030; 2. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004; 3. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘要: 以甘蔗残渣木聚糖为原料,通过唯一碳源选择性培养基筛选水解木聚糖的菌株,并对该菌株酶解木聚糖的条件进行了优化和酶切位点的推测。结果表明,温度 60 °C、时间 30 min、pH 6.0 时为最佳酶促反应条件,在该条件下菌株不能完全降解木聚糖,说明该菌株含有对木聚糖酶解的单酶,其酶活达到 6.494 U/mL;根据对直链淀粉的酶切分析,酶切位点是以 16~18 个葡萄糖为最小单位进行的,这种低聚糖的产生可能为今后的木聚糖或淀粉的应用开拓新领域。

关键词: 菌株筛选; 木聚糖酶; 酶解; 位点

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)04-0563-05

Xylanase strain screening and restriction sites analysis

SUN Yu-Zhe¹, WANG Yan-Chao¹, HAO Zai-Bin^{1,2*}, ZHANG Hou-Rui³

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China; 3. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: Taking the xylan of sugar cane residue as raw material, the authors screened hydrolysis of xylan bacterial strain through the only carbonous and selective medium, then optimized the conditions and estimated restriction enzyme cutting site on what had been selected. The results suggested that the optimum reaction conditions were under 60 °C, pH=6.0 and reaction time 30 min but xylan couldn't be degraded completely by strains under this condition, it approved that the strains contained single enzyme of xylanase. Xylanase activity could reach 6.494 U/mL; on the basis of restriction analysis of amylase, the restriction sites opened at the 16—18 glucoses as the smallest unit. The discovered oligosaccharides might open a new field for application of xylan and starch in the future.

Key words: strain screening; xylanase; zymohydrolysis site

木聚糖是一种多聚五碳糖,主要成分是 D-木糖,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第二丰富的再生生物质资源(连惠芩等,2006)。木聚糖酶(Xylanase E. C3. 2. 1. 8)是一种主要的木聚糖降解酶类,通过内切方式降解木聚糖中 β -1,4 木糖

苷键,水解产物以低聚木糖为主,并伴有少量的木糖和阿拉伯糖(吴克等,2001)。不同来源的微生物可以降解半纤维素,由于不同来源的木聚糖在主链聚合度,支链残基的种类、数量、长度及其在主链上结合位点方面的不同,要彻底降解木聚糖需要多种酶的共同参与(Wong 等,1998)。木聚糖酶具有广泛

收稿日期: 2009-08-31 修回日期: 2010-02-19

基金项目: 桂林理工大学科研启动费; 厦门唐传生物有限公司合作费; 广西科学基金(桂科回 0731021)[Supported by Initial Scientific Research Foundation of Guilin University of Technology; Xiamen Tangchuan Biological Co. Ltd Cooperation Costs; Science Foundation of Guangxi(0731021)]

作者简介: 孙宇哲(1981-),男,黑龙江佳木斯市人,硕士研究生,从事植物化学研究,(E-mail)sunyuzhe8301580@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: haozaibin610@126.com)

的应用前景,主要应用于造纸工业(徐志兵等,2002)、食品行业(禹慧明等,2002)、发酵产业(禹慧明等,2002)和饲料行业(程伟等,1998)等方面。木聚糖酶切位点及木聚糖结构特性的研究还少见报道。本研究是从自然界中筛选到了一株木聚糖菌,通过该菌株发酵后产生的菌液酶解特性可知,此酶能够使淀粉中的直链按照16~18个葡萄糖的短直链形式降解,表现出酶的相对专一性,因此可以为木聚糖或淀粉的生物改性提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

蔗渣木聚糖(80%,广西植物研究所张厚瑞研究员提供);直链淀粉和支链淀粉(96%和66%,本实验室制备)(王彦超等,2009);D-木糖、L-阿拉伯糖等为HPLC纯,购自Sigma公司;异麦芽糖、棉籽糖、水苏糖和纤维二糖(日本和光制药有限公司);3,5-二硝基水杨酸、无水葡萄糖、麦芽糖和蔗糖等生化试剂均为国产分析纯。

EL-303 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HH-S 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);SIGMA 3K30 离心机(德国希格玛离心机有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 木聚糖酶菌株的筛选 培养基的配制(代义等,2008):培养基均以100 mL为单位体积进行计算:①富集培养基(g):蔗渣木聚糖1.0,蛋白胨0.5,NaCl 0.5,pH7.5。②筛选培养基(g)A:蔗渣木聚糖3.0,KNO₃ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.05,NaCl 0.5,K₂HPO₄ 0.05,琼脂2,pH7.5~8.0。③筛选培养基(g)B:蔗渣木聚糖2.0,KNO₃ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.05,NaCl 0.5,K₂HPO₄ 0.05,琼脂2,pH7.5~8.0。④种子培养基(g):牛肉膏0.5,蛋白胨1,NaCl 0.5,pH7.0。⑤产酶培养基(g):木聚糖0.5,酵母膏0.5,蛋白胨1,NaCl 0.5,MgSO₄·7H₂O 0.05,自然pH。

菌种的初筛和复筛(代义等,2008):取两份土壤样品各1 g和1种剑麻厂废水1 mL分别放入装有玻璃珠及100 mL无菌水的三角瓶中150 r/min,30℃下振荡30 min,吸取1 mL该溶液于①富集培养基中,同样条件下振荡培养48 h。将富集培养液梯度稀释至10⁻⁸,吸0.1 mL于②筛选培养基A上涂

平板,于30℃培养箱中倒置培养48 h,观察菌落生长情况。将在②筛选培养基A上出现透明圈的菌株挑至③筛选培养基B上,仍能出现透明圈的菌株进行发酵产酶实验。

1.2.2 菌液的制备和酶解条件的优化 菌液的制备:用接菌环从③筛选培养基B上取单环菌落转移至④种子培养液(100 mL)中,经30℃摇床培养10 h后,按0.5%接种到⑤产酶培养基上,再经30℃摇床培养60~80 h后,发酵液以6 000 r/min离心15 min,制得菌液保存于4℃冰箱中备用。木糖标准曲线的制备:DNS试剂制备及操作步骤参见郝再彬等(2004)的方法。

木聚糖酶活的测定(李彩霞等,2001):取稀释一定倍数的菌液1 mL,加入pH6.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液配制的1 mg/mL的木聚糖溶液1 mL,60℃恒温水浴5 min后,立即加入2 mL DNS试剂沸水浴5 min后终止酶反应,以相应的灭活酶为空白,测定木糖含量。酶活单位定义为1 min内1 mL酶液水解木聚糖生成1 μmol还原糖(以木糖计)相当的酶量(U/mL)。

菌液对木聚糖酶解的单因素优化:(1)温度和时间:酶解处理1 mg/mL木聚糖溶液1 mL,其中控制发酵液的稀释浓度,在不同的水浴温度下恒温30 min或在60℃恒温水浴中反应不同的时间,之后转移到沸水浴中5 min,终止反应,其它按照制作木糖标准曲线的方法进行(每个温度下或每个时间下都有相对应的空白)。(2)pH:选用0.2 mol/L磷酸氢二钠和0.1 mol/L柠檬酸配制不同pH值的缓冲溶液,分别取2 mL加入到酶解反应液中,在60℃恒温水浴中反应30 min后,转移到沸水浴中5 min,终止反应后调pH至中性,其它按照制作木糖标准曲线的方法进行(每个pH下都有相对应的空白)。

酶解木聚糖最佳菌液量的确定:取18支25 mL的标准具塞试管,向每两管中依次加入稀释一定倍数的菌液(mL)0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0,其中一组编号1~9为待测样;另一组编号11~19为对应的空白样。将空白组于沸水浴中灭活5 min,于室温下冷却,各组管分别加入1 mg/mL的木聚糖溶液1 mL,再补水到3 mL,于60℃水浴中恒温30 min,冷却后操作同木糖标准曲线,在498 nm波长下测定吸光度。

1.2.3 木聚糖酶米氏常数测定(K_m) 用pH6.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液溶解木聚糖,制备1

mg/mL 的溶液,分别加入各种浓度的木聚糖菌液 1 mL,均补水 1 mL,60 °C 恒温水浴 10 min 后,立即加入 2 mL DNS 试剂沸水浴 5 min 终止酶反应,以相应的灭活酶为空白,测定木糖含量。由速度与底物浓度的双倒数曲线求出米氏常数。

1.2.4 酶切位点的分析 蔗糖、异麦芽糖、纤维二糖、棉籽糖和水苏糖溶液的浓度均为 1 mg/mL。以灭活菌液作为空白。

2 结果与分析

2.1 酶解木聚糖菌株的筛选

两份土壤样品没有筛选效果。从剑麻厂废水溶液中筛选到的酶解木聚糖菌种,在初筛和复筛的平板上都可以看到清晰的透明圈(图 1)。将带透明圈的复筛菌落进行划线培养、并保存。

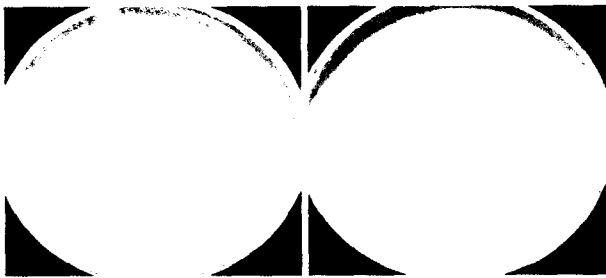


图 1 菌种的初筛和复筛

Fig.1 Primary and secondary screening of strain

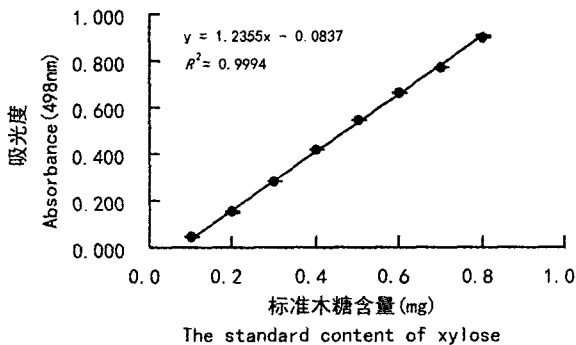


图 2 木糖标准曲线

Fig.2 Standard curve of xylose

2.2 木糖标准曲线

用 DNS 试剂法制作木糖标准曲线(图 2)。

2.3 发酵液对木聚糖酶解的单因素优化

发酵液经离心处理可除去其中的菌体细胞,使释放到细胞外的蛋白酶达到稳定的状态,减少对该

实验带来的影响。当其它反应条件固定时,该酶水解木聚糖随着温度的升高,吸光度逐渐增大,最佳温度为 60 °C,其后随着温度升高时吸光度反而下降(图 3);pH 在 6.0 时有极大值(图 4);反应时间在 30 min 时有最大值,以后将保持反应平衡(图 5);在此最佳条件下测得木聚糖酶活为 6.494 U/mL。

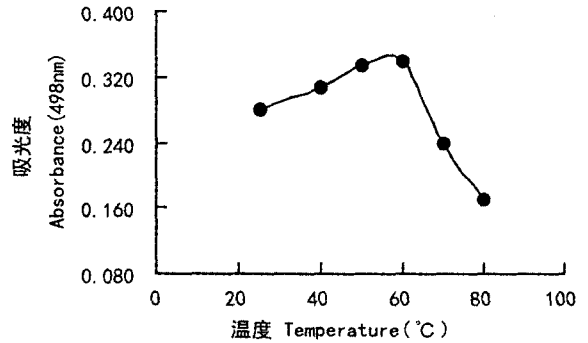


图 3 温度对木聚糖酶水解的影响

Fig.3 Effect of temperature on enzymatic hydrolysis of xylan

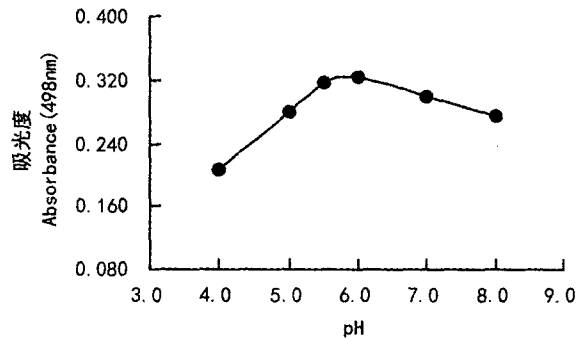


图 4 pH 对木聚糖酶水解的影响

Fig.4 Effect of pH value on enzymatic hydrolysis of xylan

2.4 酶解木聚糖最佳菌液量的确定

由图 6 表明,在酶解的最佳条件下,固定底物木聚糖的量,通过控制菌液稀释后的用量使吸光度达到最大平衡值,而通过这个数值的计算不能实现对木聚糖样品的纯度进行鉴定,因此要想完全降解木聚糖需要多种酶的共同参与。

2.5 米氏常数的测定(Km)

由图 7 可以计算出横轴截距 $-1/Km = -0.641$,即 $Km = 1.561$ mg/mL。

2.6 酶切位点的推测

由表 1 和图 8 看出,菌液中含有的酶对非还原糖(蔗糖、棉籽糖和水苏糖)中的糖苷键没有酶解作

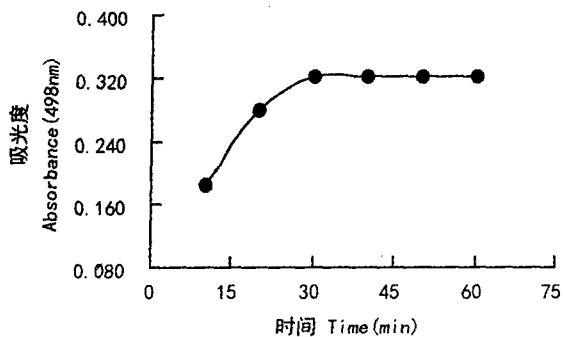


图5 时间对木聚糖酶水解的影响
Fig.5 Effect of time on enzymatic hydrolysis of xylan

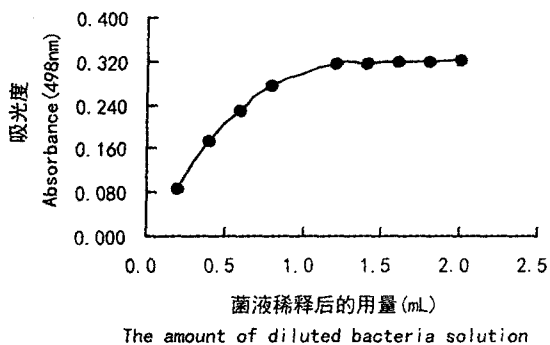


图6 菌液用量对酶解木聚糖的影响
Fig.6 Effect of amount of strain on enzymatic hydrolysis of xylan

用;如果对麦芽糖、异麦芽糖和纤维二糖有酶解作用,那么在酶的存在下,有活酶存在下数据应当为灭活酶时的2倍,从表中没有该现象,所以该菌也不能断裂麦芽糖的 α -1,4、异麦芽糖的 α -1,6和纤维二糖 β -1,4糖苷键;但是对直链和支链淀粉都有酶解作用,并且对直链淀粉的作用效果大于支链淀粉,说明该酶只能酶解多聚葡萄糖(淀粉)中的 α -1,4糖苷键。通过该酶对直链淀粉(96%纯度)的水解率计算可知,酶解位点是以16~18个葡萄糖为最小单位进行酶切的,产物为比糊精更小的葡聚糖。对该酶酶切位点的初探,将会为木聚糖和淀粉的生物改性成小分子葡聚糖(大小在20个葡萄糖)的低聚糖工业

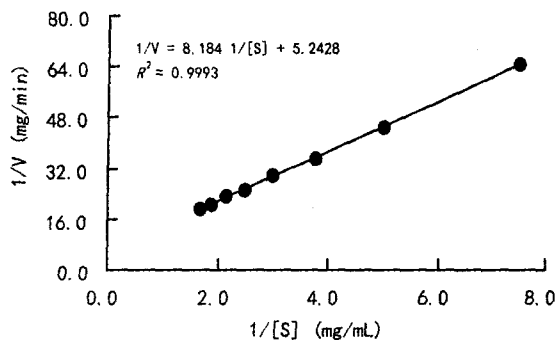


图7 酶反应速度与木聚糖底物浓度双倒数作图
Fig.7 Double reciprocal plot illustrated the relation between the speed of enzyme and consistency of xylanase substrate

表1 酶解木聚糖的酶其酶切位点的推测
Table 1 Speculation of zymolytic xylanase enzyme restriction sites

糖 Sugar	菌液/灭活 Bacteria solution /Inactivated	I	II	III	平均 Average	偏差 Deviation
蔗糖 Sucrose(二糖)	有活性	0	0	0	0	0
	无活性	0	0	0	0	0
棉籽糖 Raffinose(三糖)	有活性	0	0	0	0	0
	无活性	0	0	0	0	0
水苏糖 Stachyose(四糖)	有活性	0.016	0.017	0.016	0.016	0.001
	无活性	0	0	0	0	0
支链淀粉 Amylopectin(多糖)	有活性	0.134	0.134	0.133	0.134	0.001
	无活性	0	0	0	0	0
直链淀粉 Amylose(多糖)	有活性	0.171	0.171	0.172	0.171	0.001
	无活性	0	0	0	0	0
麦芽糖 Maltose(二糖)	有活性	0.673	0.673	0.673	0.673	0.000
	无活性	0.660	0.662	0.662	0.661	0.001
异麦芽糖 Isomaltose(二糖)	有活性	0.558	0.558	0.558	0.558	0.000
	无活性	0.548	0.550	0.550	0.549	0.001
纤维二糖 Cellobiose(二糖)	有活性	0.727	0.727	0.727	0.727	0.000
	无活性	0.716	0.717	0.717	0.717	0.001

注: 吸光波长为498 nm. Note: Absorbance wavelength 498 nm.

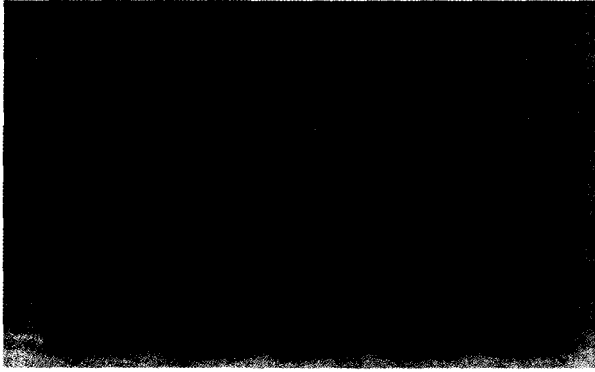


图 8 菌液对直和支链淀粉的作用效果
Fig. 8 Interaction of strain with amylose and amylopectin

a,空白;b,c:直链淀粉与酶和灭活酶;d,e:支链淀粉与酶和灭活酶
a;blank;b,c:amylose with enzyme and amylose with inactivated enzyme;d,e:amylopectin with enzyme and amylopectin with inactivated enzyme

化生产奠定基础。

3 结论

从剑麻厂废水溶液中筛选到 1 株含有木聚糖酶的菌种,经微生物培养基培养、分离,制备成粗菌液。最佳酶促反应条件:温度 60 °C、pH6.0 和时间 30 min。在此最佳条件下菌液酶解木聚糖证实,它不能完全降解蔗渣木聚糖,还需要其它多个酶共同参与;根据菌液对直链淀粉作用的酶切分析,酶切位点是以 16~18 个葡萄糖为最小单位进行的,这种低聚糖的产生可能为今后木聚糖或淀粉的应用开拓新领域。

参考文献:

- 郝再彬,苍晶,徐仲. 2004. 植物生理实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,65—67
- 程伟,刘太宇,王彩玲. 1998. 小麦型日粮添加木聚糖酶对生长育肥猪生产性能的影响[J]. 河南农业科学,(11):40—41
- Dai Y(代义),Lv SX(吕淑霞),Lin Y(林英),et al. 2008. Study on screening and identification of a highly xylanase-producing strain and the enzyme production conditions(高产木聚糖酶菌株筛选、鉴定及产酶条件的研究)[J]. *Biotechnology(生物技术)*,18(2):70—73
- Lian HX(连惠芾),Wang SH(汪世华). 2006. Application and study of microorganism xylanases(木聚糖酶的研究与应用)[J]. *J Wuhan Polytechn Univ(武汉工业学院学报)*,25(1):42—46
- Li CX(李彩霞),Fang GG(房桂干),Liu SC(刘书钊). 2001. Methods for xylanase activity determination(木聚糖酶酶活的具体测定方法)[J]. *J Chem Industry Fore Products(林产化工通讯)*,35(1):20—23
- Wang YC(王彦超),Hao ZB(郝再彬),Li ZY(李子院),et al. 2009. Separation and determination of amylose and amylopectin from cassava starch(直、支链木薯淀粉的分离纯化及检测)[J]. *J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报)*,40(3):47—51
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. 1998. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications[J]. *Microbiology*,52:305—317
- Wu K(吴克),Liu B(刘斌),Zhang J(张洁),et al. 2001. *Trichoderma viride* xylanase purification and properties(绿色木霉木聚糖酶的纯化和性质)[J]. *J Biol(生物学杂志)*,18(6):15—16
- Xu ZB(徐志兵),Zhang Q(张群),Xia WY(夏万燕). 2002. Applications of the enzymes to the pulp bleaching(酶在纸浆漂白中的应用)[J]. *Industrial Microbiol(工业微生物)*,32(1):54—56
- Yu HM(禹慧明),Lin Y(林勇),Xu YL(徐有良),et al. 2002. Breeding of the strain of *A. niger* with high-yielding xylanase(木聚糖酶高产菌株选育)[J]. *Industrial Microbiol(工业微生物)*,32(1):43—44
- 研究[J]. *Chin Trad Herb Drug(中草药)*,39(5):661—664
- Li ZL(李占林),Li DY(李丹毅),Wu Y(吴瑛),et al. 2008. Antibacterial constituents from the flowers of *Trollius chinensis*(金莲花抗菌有效成分)[J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*,25(8):627—629
- Li Q(李钦),Sheng YM(沈月毛),Li P(李萍). 2008. Study on flavonoids in the leaves of *Premna szemaensis*(思茅豆腐柴中的黄酮类化学成分研究)[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*,43(6):417—419
- Ye G(叶冠),Fan MS(范明松),Huang CG(黄成钢). 2005. Phenolic constituents from the whole plants of *Limonium aureum*(黄花矶松中的酚性化学成分)[J]. *Res Development Natural Products(天然产物研究与开发)*,17(5):583—584
- Yuan JQ(袁经权),Yang JS(杨峻山),Miao JH(缪剑华). 2007. Studies on flavonoids of *Eupatorium odoratum*(飞机草黄酮类成分的研究)[J]. *Trad Chin Med Mat(中药材)*,30(6):657—660
- Zhou Q(周欣),Yang XS(杨小生),Zhao C(赵超). 2001. Chemical components of volatile oil from *Blumeae balsamiferae* Folium et Cacumen originated from Guizhou(艾纳香挥发油化学成分的气相色谱—质谱分析)[J]. *J Instrumental Analysis(分析测试学报)*,20(5):76—78
- Zhu TC(朱廷春),Wen YX(文永新),Wang HS(王恒山),et al. 2008. Chemical constituents in *Blumea balsamifera* (I) 艾纳香的化学成分研究(I)[J]. *Guihaia(广西植物)*,28(1):76—78

(上接第 562 页 Continue from page 562)