

低聚木糖生产用木聚糖酶的选择性合成

毛连山 勇 强 余世袁

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut C-30 为产酶菌,研究了碳源、碳氮比对木聚糖酶系组成的影响。低分子量组分较多的木聚糖有利于促进内切- β -木聚糖酶的合成,酶解产物中低聚木糖的含量较高(80.70%)。低碳氮比有利于促进内切- β -木聚糖酶的合成,抑制外切- β -木糖苷酶的合成。以低分子量较多的木聚糖(7 g/L)为碳源,降低培养基的碳氮比为 4.0,调控培养 60 h,用该木聚糖酶酶解粗木聚糖,产物中低聚木糖占总糖的 86.32%。

关键词:里氏木霉;内切- β -木聚糖酶;外切- β -木糖苷酶;选择性合成

中图分类号:Q556;TS245.9

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2004)S1-0132-03

Selective biosynthesis of xylanases for xylo-oligosaccharides production by *Trichoderma reesei* Rut C-30

MAO Lian-shan, YONG Qiang, YU Shi-yuan

(School of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The effects of carbon source and C/N ratio on xylanase synthesis by *Trichoderma reesei* Rut C-30 have been studied. Low molecular weight components of xylan are favorable in inducing endo-1,4- β -D-xylanase, xylan A, which was the solid residue after the enzymatic hydrolysis of corncob xylan and was determined to contain much low molecular weight components, was used as the carbon source for xylanase synthesis, xylo-oligosaccharides were 80.70% of the total sugar in hydrolysate; low ratio of carbon to nitrogen could stimulate the synthesis of endo-1,4- β -D-xylanase and depress the synthesis of exo- β -xylosidase, which enhanced the synthesis of xylosidase-poor xylanase. Purer endo-1,4- β -D-xylanase could be prepared through controlled cultivation of *Trichoderma reesei* Rut C-30 with xylan A as the carbon source. Xylanase could be obtained after 60 h of cultivation with 7.0 g/L of carbon with C/N ratio of 4.0. When thus prepared xylanase was used in enzymatic hydrolysis, the ratio of xylo-oligosaccharides to total sugar could reach 86.32%.

Key words: *Trichoderma reesei*; carbon resource; carbon-to-nitrogen ratio; endo-1,4- β -D-xylanase; exo- β -xylosidase

木聚糖酶是降解半纤维素木聚糖的一组酶的总称,作用于主链的酶有 2 种:内切-1,4- β -木聚糖酶(EC3.2.1.8)和外切- β -木糖苷酶(EC3.2.1.37),一般而言,前者从主链内部作用于木糖苷链,可随机将木聚糖主链降解成短链的低聚木糖;而后者作用于短链的低聚木糖,从非还原性末端释放出木糖^[1]。低聚木糖生产用木聚糖酶,要求不含木糖苷酶或木糖苷酶活很低,这样才能得到高得率、高纯度的低聚木糖产品。对于木糖苷酶基因缺陷的木聚糖酶生产菌很容易实现制备低(无)木糖苷酶活的木聚糖酶,但是在大多数微生物木聚糖酶系统中都具有外切- β -木糖苷酶,并且内切-1,4- β -木聚糖酶和外切- β -木糖苷酶这 2 种酶的基因是相互独立的^[2-4],2 种酶的合成对条件要求也相差较大^[5],微生物具有选择性合成内切- β -木聚糖酶的能力。笔者研究碳

源和碳氮比对木聚糖酶的合成的影响,提出了调控培养里氏木霉直接制备高活力和高纯度的内切- β -木聚糖酶的方法,为选择性合成低聚木糖生产用木聚糖酶提供方法。

1 实验部分

1.1 主要实验材料

产酶菌为里氏木霉 Rut C-30,接种在土豆斜面培养基上,4℃下保存。

木聚糖 B 的制备:一定量的玉米芯粉(风干重)用水抽提,然后按固液比 1:10(g/mL)加入 5%~10%的碱液,于 100℃左右抽提 30~60 min。抽提液经酸中和、离心洗涤、超滤脱盐后可获得湿样粗木聚糖,经纯度测定后作产酶碳源和木聚糖酶降解底物备用。

木聚糖 A 的制备:木聚糖 B 通过木聚糖酶的酶解后,超滤收集透过液(即低聚木糖溶液),没有被木聚糖酶酶解的超滤截留液即为木聚糖 A,经纯度测定后作产酶碳源备用。

木聚糖 C, Sigma 公司生产。

1.2 木聚糖酶的微生物培养

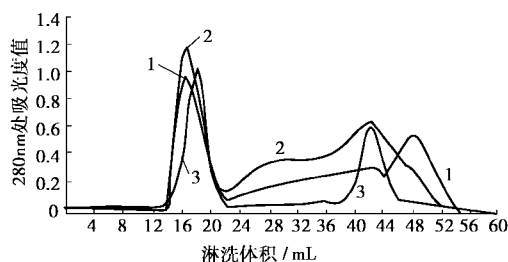
菌丝生长培养基和产酶培养基均按 Mandels^[6] 营养液配制,用 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液调 pH 值为 4.8。一定碳源、氮源组成的合成培养基经灭菌冷却后,接入在生长培养基中培养 2 天的里氏木霉菌丝悬浮液,于 28~30℃、150~170 r/min 下进行摇瓶培养。定期取样,离心(2 000 r/min, 10 min)收集上清液,装试剂瓶后于冰箱中保存。

木聚糖酶水解的酶解产物计算方法见文献[7]。

木聚糖分子质量分布用葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 柱进行测定。首先将葡聚糖凝胶柱进行制备、装柱,然后将样品进行分离,洗脱液为蒸馏水,洗脱液先流经 HD-90-8A 核酸蛋白仪($A_{280\text{nm}}$),显示出峰后进入记录仪记录,就可得到木聚糖分子质量分布图;总还原糖的测定和木聚糖酶活测定方法见文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源的分子质量分布



1—木聚糖 A; 2—木聚糖 B; 3—木聚糖

柱 1.0 cm × 50 cm; 淋洗液为蒸馏水, 流速 0.8 mL/min

图 1 不同的木聚糖分子质量分布图

木聚糖是植物半纤维素的重要组分,一种异质多糖,木聚糖的植物来源不同以及木聚糖的分离提取方案不同,则木聚糖的化学组成也不相同^[8]。为了了解木聚糖 A、木聚糖 B 和木聚糖 C 这 3 种木聚糖的组成差异,采用 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱将它们进行分级,得到它们的分子质量分布见图 1。可知这 3 种木聚糖的分子质量分布趋势相似,都存在分子质量较大的和分子质量较小的组分,但木聚糖 A 中低分子质量的组分较多,这是因为在制备低聚木糖过程中,自制的木聚糖 B 由于受内切- β -木

聚糖酶的随机降解,使得木聚糖的聚合度降低,低分子质量组分增多。自制的木聚糖 B 中低分子质量的组分较酶解渣少,而商品纯木聚糖则更少。

2.2 不同碳源所产木聚糖酶酶解粗木聚糖的结果

分别以木聚糖 A、木聚糖 B 和木聚糖 C 为碳源合成木聚糖酶,然后分别去酶解自制的粗木聚糖,用高效液相色谱(HPLC)分析酶解产物,酶解结果见表 1。

表 1 三种碳源合成的木聚糖酶酶解结果

木聚糖酶	时间/ h	酶解得率 $y/\%$			$y(\text{低聚木糖}):$ $y(\text{总糖})/\%$
		木糖	低聚木糖	总糖	
由木聚糖 A 合成	2	2.21	9.24	11.45	80.70
	4	2.84	10.54	13.38	78.77
	8	4.78	12.32	17.10	72.07
由木聚糖 B 合成	2	3.38	7.37	10.75	68.56
	4	6.28	11.27	17.55	64.22
	8	13.66	9.47	23.13	40.94
由木聚糖 C 合成	2	4.22	8.46	12.68	66.92
	4	6.65	8.15	14.80	55.07
	8	14.59	7.99	22.58	35.39

注:产酶条件为碳源质量浓度 7.0 mg/mL,碳氮比为 6.0,初始 pH 值 4.80,温度 28~30℃,150~170 r/min 下摇瓶培养;酶解条件为 pH 值 4.8,温度 50℃,酶量 80 IU/g(木聚糖),振荡速度 80 r/min。

由酶解结果可知,木聚糖 A 为碳源所产的木聚糖酶酶解自制的粗木聚糖得到的低聚木糖含量较高,而木聚糖 C 为碳源所产的木聚糖酶酶解自制的粗木聚糖得到的低聚木糖含量较低,这说明低分子质量组分较多的木聚糖 A 有利于内切- β -木聚糖酶的生成,而低分子质量组分较少的木聚糖 C 有利于 β -木糖苷酶的生成。这为内切- β -木聚糖酶的定向合成提供了思路。

2.3 碳氮比对木聚糖酶合成影响

以木聚糖 B 为碳源,尿素、硫酸铵和蛋白胨以一定的比例混合作为氮源,配制成不同碳氮比(C/N 摩尔比)的合成培养基,进行摇瓶培养,将合成的木聚糖酶去酶解粗木聚糖,用高效液相色谱(HPLC)分析酶解产物,酶解结果见表 2。

随着碳氮比的增大,木聚糖酶活先上升后下降,木聚糖酶的合成存在一个较合适的碳氮比范围。因为碳氮比过低易出现微生物因碳源过多而生长过旺,造成对碳源的消耗过快,导致酶的合成水平下降;碳氮比过高则造成微生物因氮源不足而生长缓慢,生命力减弱。碳氮比的大小不仅直接影响酶的

活力和产率,而且影响酶系的组成。由表 2 数据可知,碳氮比越低,合成的木聚糖酶解粗木聚糖时酶解得率越高,酶解产物中低聚木糖的含量较高,其中碳氮比为 4.0 时合成的木聚糖酶解产物中低聚木糖的比例最高,这说明低碳氮比有利于内切- β -木聚糖酶的合成,而碳氮比为 4.0 时最有利于内切- β -木聚糖酶的合成。

表 2 不同的碳氮比合成的木聚糖酶解结果

碳氮比	木聚糖酶活/ IU·mL ⁻¹	酶解得率 $y/\%$			y (低聚木糖): y (总糖)/%
		木糖	低聚木糖	总糖	
3.3	97.50	5.20	16.27	21.47	75.78
4.0	101.22	3.38	17.65	21.03	83.92
4.5	117.49	5.88	13.81	19.69	70.14
6.0	120.84	5.96	12.99	18.95	68.56
7.2	126.24	5.86	12.83	18.69	68.65
8.0	111.06	6.36	12.19	18.45	66.07
10.0	94.67	5.06	8.31	13.37	62.15

注:产酶条件为碳源质量浓度为 7.0 g/L,初始 pH 值 4.8,温度 28~30℃,150~170 r/min 下摇瓶培养,时间为 3 d;酶解条件为 pH 值 4.8,温度 50℃,酶量 80 IU/g(木聚糖),振荡速度 80 r/min,酶解时间 2 h。

2.4 以木聚糖 A 为碳源内切木聚糖酶选择性合成的调控

根据上述实验结果发现低分子质量组分较多的木聚糖和低碳氮比均有利于内切- β -木聚糖酶的合成。本实验以低分子质量组分较多的木聚糖 A 为碳源,质量浓度为 7.0 g/L,尿素、硫酸铵和蛋白质按一定的比例混合组成氮源,控制碳氮比为 4.0,初始 pH 值 4.8,温度 28~30℃,150~170 r/min 下摇瓶培养,培养 60 h,将合成的木聚糖酶去酶解粗木聚糖,酶解结果见表 3。

从表 3 可以看出,以低分子质量组分较多的木聚糖为碳源,碳氮比为 4.0 的培养条件下所合成的木聚糖酶,2 h 的酶解产物中低聚木糖的含量为 86.32%,高于碳氮比为 6.0 时低聚木糖的含量

(80.70%)。这说明以低分子质量组分较多的木聚糖为碳源,碳氮比为 4.0 的培养条件有利于选择性合成内切- β -木聚糖酶。

表 3 调控合成的木聚糖酶解结果

酶解时间/ h	酶解得率 $y/\%$			y (低聚木糖): y (总糖)/%
	木糖	低聚木糖	总糖	
2	3.13	19.75	22.88	86.32
4	6.24	20.42	26.66	76.59
8	9.78	20.92	30.70	68.14

注:酶解条件为 pH 值 4.8,温度 50℃,酶量 80 IU/g 木聚糖,振荡速度 80 r/min,酶解时间 2 h。

3 结论

低分子质量组分较多的木聚糖有利于促进内切- β -木聚糖酶的合成,用该酶酶解粗木聚糖,酶解产物中低聚木糖的含量较高。低碳氮比有利于促进内切- β -木聚糖酶的合成,抑制外切- β -木糖苷酶的合成。以低分子质量较多的木聚糖为碳源,通过碳氮比的调控可以选择性合成低外切- β -木糖苷酶活的木聚糖酶,为选择性合成低聚木糖生产用木聚糖酶提供新的思路。

参考文献

- [1] Saddler, J N. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues [M]. Oxford: CAB International, 1993: 131 - 182.
- [2] Schagger H, Jagow G V. [J]. Anal Biochem, 1987, 166: 368 - 379.
- [3] 陈惠忠, 高培基, 王祖农. [J]. 微生物学报, 1991, 31(2): 100 - 107.
- [4] Nobuko Ohno, Kana Nidaire, Hirofumi Shinoyama, et al. [J]. J Appl Glycosei, 1996, 43(2): 195 - 200.
- [5] John M, Schmidt B, Schmidt J. [J]. Can J Biochem, 1979, 57: 125 - 137.
- [6] Mandels M, Mederas J E, Andreotti R E, et al. [J]. Biotechnol Bioeng, 1981, 23: 2009 - 2026.
- [7] 毛连山, 徐勇, 宋向阳, 等. [J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 33 - 38.
- [8] Hartley R D, Ford C W. [J]. Carbohydr Res, 1986, 147: 101 - 112. ■

31.

- [5] GB17514—998 水处理剂聚丙烯酰胺[S].
- [6] 唐康泰, 潘松汉. [J]. 广州化工, 1996, 24(3): 59.
- [7] 胡金生, 曹同玉, 刘庆普. 乳液聚合[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [8] 刘庆普, 哈润华. [J]. 高等学校化学学报, 2000, 24(4): 656. ■

(上接第 131 页)

参考文献

- [1] 崔正刚, 殷福珊. 微乳化技术及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [2] Candau F, Leong Y S. [J]. J Polym Sci Polym Chem Ed, 1985, 23: 193.
- [3] 哈润华, 侯斯建, 王德松. [J]. 高分子学报, 1995, (6): 745.
- [4] 李文兵, 王光华, 李蕾. [J]. 武汉化工学院学报, 2003, 25(3): 28 -