

细菌木聚糖酶粗酶的提取及性质的研究*

许正宏, 白云玲, 孙微, 徐霞, 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘 要 :在 20 ℃ 条件下,采用相对饱和度为 50 %的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 一步盐析并经 45~50 ℃ 烘干 10 h 得到木聚糖酶粗酶粉.初步研究了该酶的一些基本性质,结果表明,该酶在 55 ℃ 下,pH 值为 4.6~10.5 之间较稳定.最适作用温度与 pH 值分别为 50 ℃ 和 7.6.该粗酶产品适合造纸工业的纸浆处理.

关键词 :木聚糖酶;提取;酶学性质

中图分类号 :Q556 **文献标识码** : A

Extraction and Characteristics of Bacterial Xylanase

XU Zheng-hong, BAI Yun-ling, SUN Wei, XU Xia, TAO Wen-yi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract :The crude xylanase was obtained by salting out in 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and dried at 45~50 ℃ for 10 h. Some basic characteristics of this crude enzyme were studied. It was stable at less than 55 ℃ and the range of pH 4.6~10.5. The optimal temperature and pH were 50 ℃ and 7.6 respectively. The results showed that this enzyme was suitable for pulp process in paper industry.

Key words :xylanase; extraction; enzymic characteristics

木聚糖酶(xylanase E.C.3.2.1.8)是一类能特异降解木聚糖的酶类.近年来因其在工业上的广泛应用,特别是在生物制浆上的应用而引起的关注^[1].生物制浆用木聚糖酶通常应具有以下特性^[2],即最佳作用 pH 为中性偏碱,作用温度较高,同时在木聚糖酶制剂中无纤维素酶活性以避免其对纸浆纤维的降解.当前,对于无纤维素酶活性的碱性木聚糖酶的研究已成为该领域的热点之一.能够产生木聚糖酶的微生物种类很多,产木聚糖酶的微生物往往同时产生一定量的纤维素酶,我国学者

的研究多集中在酸性霉菌木聚糖酶.作者从工业化应用的角报道了一株高产无纤维素酶活性的碱性木聚糖酶细菌的粗酶制剂提取及其性质的研究,为其在造纸工业中的应用提供必要的参数.

1 材料与方法

1.1 细菌木聚糖酶发酵液

采用本课题组筛选并改良的无纤维素酶活性的木聚糖酶高产菌 *Pseudomonas sp* WLUN 024 发

* 收稿日期:1999-03-01,修订日期:1999-12-21.

基金项目:江苏省科委九五攻关项目(BE96042).

作者简介:许正宏(1971年7月生),男,江苏泰州人,工学硕士,讲师.

万方数据

酵而成.

1.2 (NH₄)₂SO₄ 盐析用量的确定

将上述发酵液于 4 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液.分别取 50 mL 上清液,在 20 ℃ 加入固体 (NH₄)₂SO₄ 至相对饱和度为 20% ,25% ,30% ,35% 40% 45% 50% 60% 70% ,充分混合均匀,4 ℃ 放置 12 h 4 000 r/min 离心 15 min ,分别吸取上清液测定其残留木聚糖酶酶活.以上清液中残存木聚糖酶的相对活力大小确定最佳盐析用量.

1.3 粗酶粉制备

按最佳盐析用量添加 (NH₄)₂SO₄ 于发酵上清液,盐析得到粗酶沉淀,然后将粗酶于 45~50 ℃ 干燥约 10 h ,得到干燥粗酶粉.

1.4 酶学性质研究用粗酶的制备

取上述干燥粗酶粉适量溶于一定量的蒸馏水中,透析 24 h 除盐,将得到的粗酶透析液用于酶学性质研究.

1.5 粗酶性质的研究

1.5.1 热稳定性 将 1.4 所得粗酶液用 0.04 mol/L pH 值为 7.6 的巴比妥钠缓冲液适当稀释后,将酶液分别在不同的温度下保温,每隔 10 min 取样,快速冷却至室温后,按常规方法测定残存酶活,以初始酶活力为 100% .

1.5.2 酸碱稳定性 将酶液分别用 pH 值为 2.68 3.68 4.10 5.86 的 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液 pH 值为 6.80 ,7.15 ,7.60 ,8.13 ,8.56 的 0.04 mol/L 的巴比妥钠缓冲液以及 pH 值为 9.64 ,10.5 的 0.1 mol/L 的碳酸盐缓冲液适当稀释后,4 ℃ 放置 24 h 后,调整 pH 值至 7.6 后测其残存酶活,以残存酶活最高者为 100% 计.

1.5.3 酶促反应最适温度 用 0.04 mol/L pH 值为 7.6 的巴比妥钠缓冲液适当稀释粗酶液,在不同的温度下反应 30 min ,测定其酶活力,以酶活最高者为 100% .

1.5.4 酶促反应的最适 pH 分别用不同体系、不同 pH 的缓冲液稀释粗酶液,按常规方法测定酶活,以酶活最高者为 100% 计.

1.6 木聚糖酶活力测定

根据 Michael J Bailey 等人的方法改良^[3] ,将粗酶用 pH 值为 7.6 的 0.04 mol/L 巴比妥钠缓冲液稀释适当的倍数.取稀释酶液 0.5 mL 加入到已预热的 1 mL 1 % 的木聚糖 (Oat spelt ,Sigma) 溶液中,50 ℃ 保温反应 30 min 后,DNS 法测定还原糖 (以木糖为标准).酶活单位定义为:上述条件下每分钟释放 1 μmol 木糖所需的酶量为 1 酶活单位 (U).

2 结果与讨论

2.1 (NH₄)₂SO₄ 盐析用量的确定

按方法 1.2 测定 (NH₄)₂SO₄ 的最佳盐析用量,由图 1 可见,当 (NH₄)₂SO₄ 的相对饱和度达到 31.3% 后,上清液中几乎没有木聚糖酶酶活存在,由此可以确定 (NH₄)₂SO₄ 盐析该木聚糖酶的较佳的相对饱和度为 31.3% .

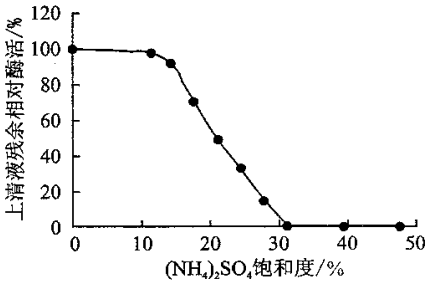


图 1 (NH₄)₂SO₄ 盐析曲线

Fig.1 (NH₄)₂SO₄ salting out curve for xylanase

2.2 酶提取工艺的初步研究

按 1.3 法进行酶提取工艺的研究,结果如下:发酵上清液 1 000 mL (675 U/mL)→相对饱和度为 50 % 的 (NH₄)₂SO₄ 盐析得粗酶 131.3 g (4 995 U/g)→45~50 ℃ ,10 h 烘干得干粉 65.5 g (8 503 U/g).采用上述工艺,盐析的总酶活收率为 97.1% ,烘干后总酶活得率为 85.0% ,该过程总酶活的得率为 82.5% .

2.3 粗酶性质

2.3.1 热稳定性 按方法 1.5.1 ,将酶液分别置于 37 ,50 ,55 ,60 ℃ 下保温,测定经不同时间保温后的残余酶活性,结果见图 2.

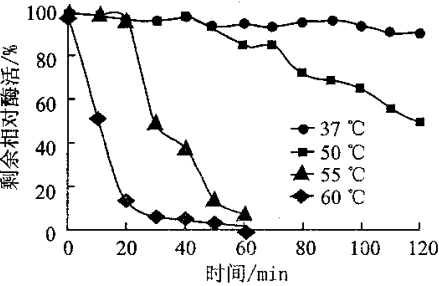


图 2 热稳定性曲线

Fig.2 Thermal stability curve for xylanase

由图 2 可见,该酶在 37 ℃ 时较为稳定,保温 2 h 酶活基本不变.50 ℃ 时半衰期约 2 h,而 55 ℃ ,60 ℃ 时半衰期分别约为 30 min 和 10 min.同时将该粗酶液添加 0.1 % 的苯甲酸钠作为防腐剂以避免其它微生物污染对该木聚糖酶的降解,4 ℃ 存放一个月,

其残存酶活为原酶活力的 92.8% ,可见该酶在低温下稳定.

2.3.2 酸碱稳定性 按文中1.5.2测定该酶的酸碱稳定性,由图 3 可知,该酶在 pH 值为 4.6 以下时,酶活会很快丧失.在 pH 值为 4.6~10.5 之间,该酶较为稳定.

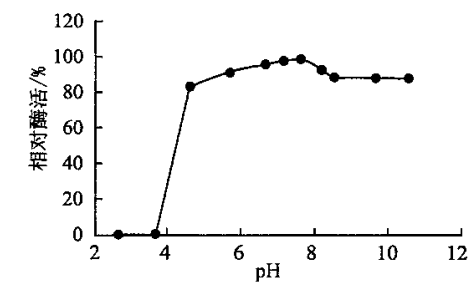


图 3 酸碱稳定性曲线
Fig.3 Activity versus pH for xylanase

2.3.3 酶促反应最适温度 在不同温度下测定木聚糖酶的相对活力大小,确定其反应的最适温度,结果见图 4,该酶在 0.04 mol/L、pH 值为 7.6 的巴比妥钠缓冲液环境下,酶促反应 30 min 的最适温度为 50 ℃.

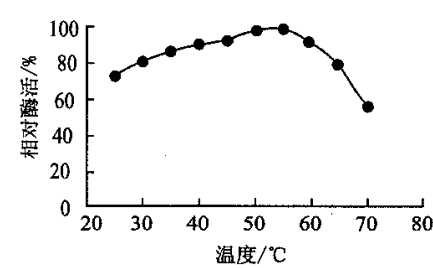


图 4 最适作用温度曲线
Fig.4 Temperature curve for xylanase

2.3.4 酶促反应的最适 pH 值 采用不同的缓冲体系,测定该酶的最适作用 pH 值,结果表明该酶的最适酶促反应的 pH 值为 7.6 (图 5).

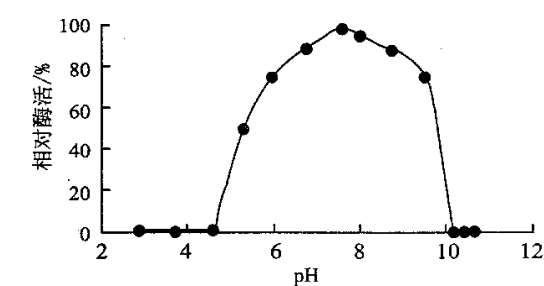


图 5 最适作用 pH 曲线
Fig.5 pH curve for xylanase

2.4 讨论

由粗酶提取的初步实验结果可以看出,该木聚糖酶在(NH₄)₂SO₄ 等物质存在的情况下,其热稳定性较好.在实际生产过程中,如采用低温喷雾干燥或流化床干燥.对粗酶性质研究结果表明,该酶在 37 ℃ 条件下较为稳定,综合考虑其应用特点及提取成本等因素,还可以采用真空浓缩的方法制备粗酶浓缩液,直接向用户提供液体酶制剂.

在造纸厂的制浆过程中,漂白前的纸浆在经碱蒸煮及水洗后,其温度大多在 55 ℃ 以下,pH 值一般在 7.0~8.0 之间.该酶在 55 ℃ 以下,pH 4.6~10.5 之间较为稳定,最适作用温度与 pH 值分别为 50 ℃ 和 pH 7.6.如将该酶用于纸浆处理,无需对纸浆进行温度及 pH 值的调节,使用十分方便.由此可见,该细菌木聚糖酶在造纸工业中具有良好的工业应用前景.

参考文献

[1] 朱静,严自正. 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用[J]. 生物工程学报,1996,18(4) 375~378
[2] 许正宏,孙微,史劲松等. 制浆生物技术的研究与工业应用[J]. 林产化学与工业,1998,18(3) 89~94
[3] BAILEY M, PETER B, KAISA P. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. J Biotech, 1992, 23 : 257~270

(责任编辑 : 朱明)