

文章编号 :1009 - 038X( 2003 )01 - 0061 - 04

# 草菇半纤维素酶系统的诱导、分布及初步定性

裴建军, 胡沂淮, 邵蔚蓝

( 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036 )

**摘要:**以蔗糖、果胶、羧甲基纤维素或木聚糖为碳源培养草菇(*Volvariella volvacea*),对所产生的半纤维素酶进行初步研究发现,半纤维素酶系主要是由木聚糖诱导.半纤维素酶中的木聚糖酶分布在胞外,木糖糖苷酶分布在胞内,阿拉伯糖苷酶胞内胞外都有分布.木聚糖酶的最适反应温度为 60℃,最适反应 pH 为 5.8,在 pH 5.4~7.0 时比较稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度是 55℃.木糖糖苷酶的最适反应温度为 55℃,最适反应 pH 为 6.6,在 pH 6.6~7.4 时比较稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度是 52℃.阿拉伯糖苷酶的最适反应温度为 60℃,最适反应 pH 为 5.0,在 pH 4.6~6.2 时比较稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度为 60℃.

**关键词:**半纤维素酶;诱导;分布

中图分类号: S 646.1+3

文献标识码: A

## Inducement, Distribution and Properties of Hemicellulases from *Volvariella volvacea*

PEI Jian-jun, HU Yi-huai, SHAO Wei-lan

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** *Volvariella volvacea* was cultivated in the media with sucrose, pectin, carboxymethyl cellulose (CMC) or xylan as carbon source and hemicellulases were mainly induced by xylan. Xylanase was in the culture filtrate, xylosidase was in the hyphal filaments, arabinofuransidase was in both the culture filtrate and the hyphal filaments. The optimal conditions for xylanase were pH 5.8 at 60℃, it was stable over a pH range of 5.4~7.0, and had 1 h half-life at 55℃. The optimal conditions for xylosidase were pH 6.6 at 55℃, it was stable over a pH range of 6.6~7.4, and had 1 h half-life at 52℃. The optimal conditions for arabinofuransidase were pH 5.0 at 60℃, it was stable over a pH range of 4.6~6.2, and had 1 h half-life at 60℃.

**Key words:** hemicellulase; inducement; distribution

随着人口的不断增长和资源的进一步消耗,可再生资源的开发利用已经成为人们共同关注的问题.在植物的光合作用产物中,半纤维素仅次于淀

粉和纤维素的一大类碳水化合物,如秸秆中半纤维素的含量占其干重的 25%~50%<sup>[1]</sup>.除了其数量之大,半纤维素成为可再生资源的另一个因素是它比

收稿日期 2002-08-07; 修回日期 2002-11-13.

作者简介:裴建军(1977-)男,江苏宜兴人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

植物中的其它组分更易于提取和水解<sup>[2~3]</sup>。寻找有效的半纤维素酶是半纤维素资源开发利用的关键问题。同时,一些半纤维素酶在食品加工、低聚糖制备、饲料加工、溶解纸浆以及纸浆漂白等方面,有着广泛的应用前景<sup>[4~8]</sup>。草菇,又名麻菇、杆菇等,盛产于我国南方,具极高的营养价值,是世界上第五大重要的经济栽培品种<sup>[9]</sup>。草菇主要在草质纤维上生长,能产生有效降解纤维素和半纤维素的酶系,因此,研究这些酶系对于草质纤维的开发利用具有重要意义。为此,仅对半纤维素酶系的诱导、分布,及其酶系进行了初步定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与设备

主要试剂购于美国 SIGMA 公司,包括:木聚糖(xylan, from birchwood),果胶, p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -xyloside, p-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF);其它试剂:羧甲基纤维素(CMC)购自中国医药集团上海化学试剂公司;3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)购于上海申能博彩有限公司。

UV-2000 分光光度计(UNICO),IEC multiry 高速冷冻离心机(Thermo IEC)。

### 1.2 菌种及培养基

草菇(*Volvariella volvacea*)菌种:由南京师范大学何强泰先生惠赠。

种子培养基:蔗糖 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{VB}_1$  0.5 mg/L 琼脂 20 g/L。

摇瓶培养基:各种不同的碳源 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{VB}_1$  0.5 mg/L。

### 1.3 草菇的培养及粗酶的制备

1.3.1 草菇的培养 种子在 37 °C 静止培养 4~5 d,摇瓶于 37 °C, 200 r/min 培养 4~5 d。

1.3.2 胞外酶的制备 将草菇的摇瓶培养液用尼龙布过滤,取滤液;在 4 °C 以 9 600 r/min 离心 10 min 取上清液;用 80% 饱和度的硫酸铵在 4 °C 沉淀并平衡 2 h,在 4 °C 以 9 600 r/min 离心 10 min,取沉淀;用适量的 pH 6.5 的 MOPS 溶解,所得的溶液即胞外酶液。

1.3.3 胞内酶的制备 将草菇的摇瓶培养液用尼龙布过滤,取菌丝体;用 25 mmol/L pH 6.5 的 MOPS 洗 3 遍后,将菌丝体在 4 °C 用匀浆器匀浆 10 min 加入适量的 pH 6.5 的 MOPS 得到匀浆液;在 4 °C 以 9 600 r/min 离心 10 min,取上清液,即得到

胞内酶液。

### 1.4 酶活的测定方法

1.4.1 木聚糖酶的测定 100  $\mu\text{L}$  质量分数 0.5% 的木聚糖 酶液 20  $\mu\text{L}$  25 mmol/L pH 6.5 的 MOPS 反应 5 min,结束后,加 600  $\mu\text{L}$  终止剂/显色剂 PAHBAH[配方为:V(0.5 mol/L NaOH):V(溶于 0.5 mol/L HCl 的质量分数为 5% PAHBAH<sup>[10]</sup>)=4:1],煮沸 10 min,冷却后测  $A_{410}$  值。

1.4.2 木糖糖苷酶的测定<sup>[11]</sup> 取 30  $\mu\text{L}$  的酶液,加 10  $\mu\text{L}$  20 mmol/L 的 p-nitrophenyl- $\beta$ -xyloside,加 160  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L pH 6.5 的 MOPS,45 °C 反应 30 min,再加入 700  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应,测  $A_{405}$  值。

1.4.3 阿拉伯糖苷酶的测定<sup>[11]</sup> 取 30  $\mu\text{L}$  的酶液,加 10  $\mu\text{L}$  25 mmol/L 的 p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside,加 160  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L pH 6.5 的 MOPS,45 °C 反应 30 min,再加入 700  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应,测  $A_{405}$  值。

1.4.4 酶单位(U)的定义 在该反应条件下,1 min 内催化产生 1  $\mu\text{mol}$  产物所需的酶量。

### 1.5 酶性质的测定

1.5.1 最适反应温度的测定 在 20~80 °C 范围内,每隔 5 °C,分别测定酶活,以酶活最高为 100%,计算相对酶活。

1.5.2 最适反应 pH 在不同的 pH 条件下分别测定酶活,以酶活最高为 100%,计算相对活性。在 pH 3.8~5.8 范围内,缓冲液是 50 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾缓冲液,在 pH 5.8~8.0 范围内,缓冲液是 50 mmol/L 磷酸缓冲液。

1.5.3 温度稳定性 在相对稳定的 pH 条件下,使酶在某个温度下保温不同的时间,再测定相对酶活,以未保温(4 °C 保存)的酶样活性为 100%,确定酶的半衰期为 1 h 的温度值。

1.5.4 pH 稳定性 酶在不同的 pH 条件下保温相同的时间,分别测定残留酶活性与不保温的酶活比,计算百分比。缓冲液的选择参考 1.5.2 方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶的诱导和分布

半纤维素酶系中的木聚糖酶主要是胞外酶,木糖糖苷酶是胞内酶,阿拉伯糖苷酶胞内、胞外都有(见表 1)。这样的分布与酶的催化作用有一定的相关性,木聚糖酶是内切酶,主要作用于木聚糖主链,因为木聚糖主链很难进入细胞膜,所以木聚糖酶主要分布在胞外。木糖糖苷酶主要分解低聚木糖,产

生菌体能直接利用的糖,因此木糖糖苷酶主要分布在胞内.而阿拉伯糖苷酶主要是分解侧枝,与木聚糖酶和木糖糖苷酶有协同作用,因此胞内、胞外都有.研究中木聚糖酶的主要诱导因子是木聚糖,木糖糖苷酶的主要诱导因子也是木聚糖,阿拉伯糖苷酶是木聚糖、CMC、果胶混合诱导.

表 1 酶的诱导和分布

Tab.1 Inducement and distribution of enzyme

碳源	木聚糖酶 酶活/ (U/mL)		木糖糖苷酶 酶活/ (U/mL)		阿拉伯糖苷酶 酶活/ (U/mL)	
	胞内	胞外	胞内	胞外	胞内	胞外
木聚糖	0	160	0.57	0.04	0.43	0.08
CMC	0	74	0.12	0.01	0.05	0.01
木聚糖 + CMC	6.6	180	0.60	0.01	0.26	0.36
木聚糖 + CMC + 果胶	1.7	150	0.67	0	0.61	1.18
果胶	0	0	0	0	0	0
蔗糖	0	0	0	0	0	0

### 2.2 最适反应条件

2.2.1 最适反应温度 由图 1 可以看出,半纤维素酶系中的木聚糖酶和阿拉伯糖苷酶的最适反应温度是 60 °C,木糖糖苷酶的最适反应温度是 55 °C.

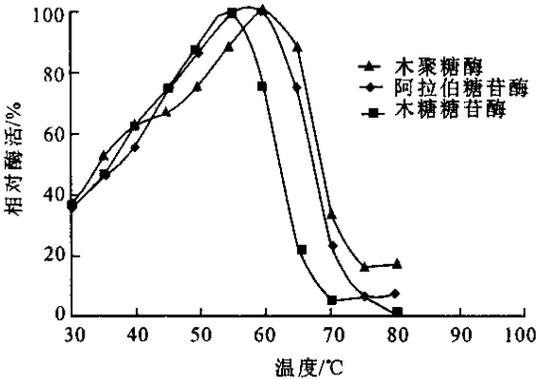


图 1 温度对酶活的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzyme activity

2.2.2 最适反应 pH 由图 2 可知,阿拉伯糖苷酶的最适反应 pH 是 5.0,木聚糖酶的最适反应 pH 是 5.8,木糖糖苷酶的最适反应 pH 是 6.6.

### 2.3 酶的稳定性

2.3.1 酶的 pH 稳定性 由图 3 可以看出,阿拉伯糖苷酶在 pH 4.6 ~ 6.6 时都比较稳定,在 pH 5.8 时最稳定;木聚糖酶在 pH 5.0 ~ 7.4 比较稳定,在 pH 5.8 时最稳定;木糖糖苷酶在 pH 5.8 ~ 7.4 比较稳定,在 pH 7.0 时最稳定.

2.3.2 酶的温度稳定性 由图 4 可知,半纤维素酶

系中的阿拉伯糖苷酶保温 1 h,酶活的半衰温度为 60 °C,木聚糖酶的半衰温度为 52 °C,木糖糖苷酶的半衰温度为 55 °C.

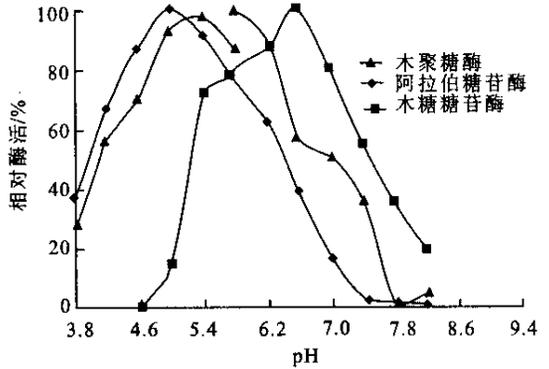


图 2 pH 对酶活的影响

Fig.2 Effect of pH on enzyme activity

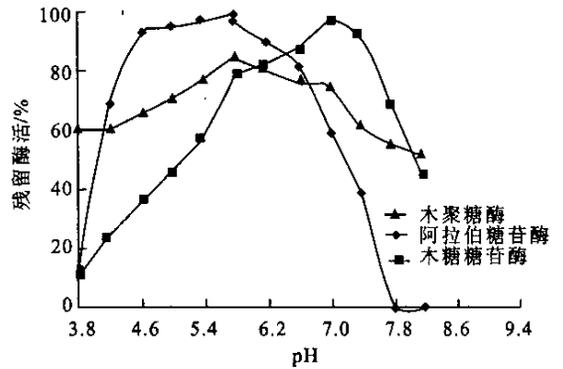
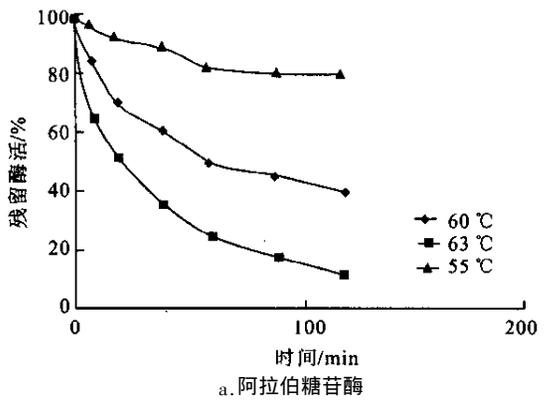
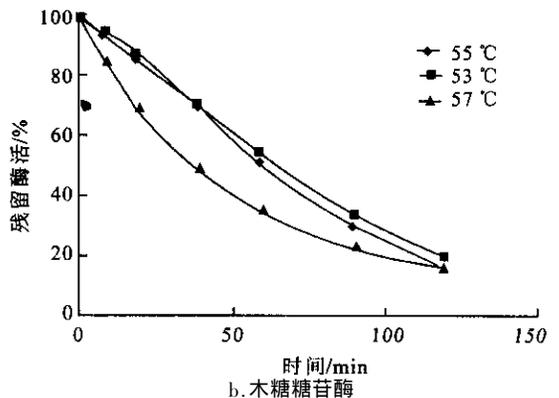


图 3 pH 对酶的稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on enzyme stability



a. 阿拉伯糖苷酶



b. 木糖糖苷酶

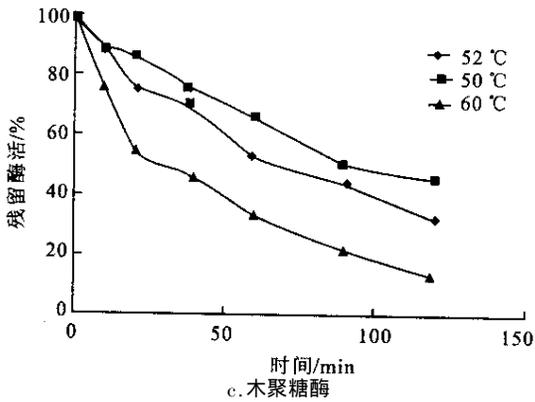


图4 温度对酶的稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzyme stability

### 3 结论

草质纤维是一个复合结构,其中木质素由芳香烃衍生物以 C—C 键和—O—键纵横交联在一起,

其侧枝又与半纤维素结合形成一个十分致密的网络结构,将纤维素紧紧包裹在里面,所以要降解纤维素,必须先降解木质素和半纤维素.目前,国内对半纤维素酶的研究集中在对木聚糖酶的研究,而对阿拉伯糖苷酶和木糖苷酶研究还较少,对于这两种酶酶学特性的研究,将有利于我们对草质纤维的有效降解及对半纤维素酶的有效应用.草菇有降解半纤维素的一整套酶系统.使用不同的碳源,发现以木聚糖对半纤维素酶诱导作用最大,与 CMC 联合使用也可得到较完善的、酶活较高的半纤维素酶体系.木聚糖酶主要分布在胞外,将长链的木聚糖切成短链,而其他外切酶主要分布在胞内,进一步将寡聚糖分解,同时有些外切酶也存在于胞外,与内切酶协同作用.对这些特性的了解为我们对草菇半纤维素酶的进一步研究打下了一个良好的基础.

### 参考文献:

- [1] Glazer A N, Nikaido H. Microbial Biotechnology[M]. New York: Freeman Company, 1995.
- [2] Blazej A, Biely P. In Wood and Cellulosics[M]. Chichester: Wills Horwood Limited, 1987.
- [3] Thompson N S. In Wood and Agricultural Residues[M]. New York: Academic Press, 1983. 101-147.
- [4] 怀文辉,何秀萍,郭文洁. 微生物木聚糖降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2000, 27(2):137-139.
- [5] 刘同军,张玉. 半纤维素酶的应用进展[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(6):58-61.
- [6] 刘稳,高培基. 半纤维素酶的分子生物学[J]. 纤维素科学与技术, 1998, 1(1):9-15.
- [7] 曲音波,高培基,陈嘉川. 制浆造纸用木聚糖酶的研究进展[J]. 生物工程进展, 1998, 18(1):9-15.
- [8] 周正红,高孔荣. 纤维素酶在食品发酵工业中的应用及其前景[J]. 广州化学, 1996(4):8-13.
- [9] Chang S T. Mushroom research and development-equality and mutual benefit[A]. Royse D J. Mushroom biology and mushroom product[C]. Pennsylvania State University. 1996. 1-10.
- [10] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. Anal Biochem, 1972, 47:273.
- [11] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. J Bacteriol, 1992, 174:5848-5853.

(责任编辑 杨勇)