

文章编号:1009-038X(2004)02-0094-04

以玉米芯木聚糖为碳源的草菇木聚糖酶的发酵条件

胡沂淮^{1,4}, 罗楚平², 李 迅¹, 刘 俊³, 陶 飞¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214036; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097; 3. 苏州大学 医学院, 江苏 苏州 215007; 4. 淮阴工学院 生物工程与化学工程系, 江苏 淮阴 223001)

摘 要: 在玉米芯木聚糖的碱法提取中, 玉米芯木聚糖在 80 ℃ 抽提 120 min 的抽提率较高, 还原糖质量分数较低, 同时, 抽提液的颜色较浅, 明显优于 121 ℃ 抽提 30 min. 以 80 ℃ 抽提的木聚糖为诱导, 草菇产生的木聚糖酶的酶活比 121 ℃ 抽提的木聚糖的酶活高. 以 80 ℃ 抽提的木聚糖为碳源, 通过正交试验, 设计出适合草菇生长和产生木聚糖酶的发酵条件. 培养基组成为: 木聚糖 15 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.5 g/L, Tween-80 3 g/L, 酵母膏 1 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L, 微量元素 0.000 5 g/L. pH 7.0, 40 ℃ 下 150 r/min 培养 4 d, 此时酶活达 32.4 IU/mL.

关键词: 碱法; 玉米芯; 木聚糖; 草菇; 木聚糖酶; 发酵; 正交试验

中图分类号: TQ 925

文献标识码: A

Fermentation Conditions of Xylanase Produced by *Volvariella volvacea* with Xylan Extracted from Corncob

HU Yi-huai^{1,4}, LUO Chu-ping², LI Xun¹, LIU Jun³, TAO Fei¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. School of Medicine, Suzhou University, Suzhou 215007, China; 4. Department of Bioengineering and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaiyin 223001, China)

Abstract: By comparing two alkali extracting methods, the method of soaking corncob at 80 ℃ for 120 min could obtain a higher xylan yield, lower reducing sugar, and lighter extracting fluid color. This method was better than that of soaking at 121 ℃ for 30 min. With the xylan extracted at 80 ℃ as the inducer, the enzyme activity was higher than that of xylan extracted at 121 ℃. When the xylan extracted at 80 ℃ was used as carbon source, an orthogonal experiment was carried out for optimization of *Volvariella volvacea* fermentation to produce extracellular xylanase. The medium (g/L) contained xylan 15, (NH₄)₂SO₄ 2.5, Tween-80 3, yeast extract 1, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ · 7H₂O 0.6, and trace elements 0.000 5. pH of the medium was 7.0. The flasks were incubated at 40 ℃ with gyratory shaking at 150 r/min for 4 d. The xylanase activity of the culture filtrate was 32.4 IU/mL.

Key words: alkali method; corncob; xylan; *Volvariella volvacea*; xylanase; fermentation; orthogonal experiment

收稿日期: 2003-05-12; 修回日期: 2003-07-07.

作者简介: 胡沂淮(1970-), 男, 江苏淮安人, 工学硕士.
万方数据

木聚糖是细胞中最具代表性的半纤维素,是陆生植物中除纤维素以外含量最丰富的碳水化合物.它可以作为再生资源被微生物转化为酶、单细胞蛋白、酒精等有用物质,还可以诱导木聚糖酶的产生^[2].玉米是我国重要的农作物,每年都有大量的玉米芯产生,玉米芯是半纤维素含量最高的植物,玉米芯中木聚糖的含量达35%~40%^[1].

木聚糖的碱法提取率较高^[3],反应条件温和,操作简单,是提取玉米芯木聚糖较好的方法.目前,有不同的木聚糖碱提取方法,其中,有两种方法比较常见,即121℃抽提30 min^[4](方法一)和80℃抽提120 min^[3](方法二).作者主要研究了这两种碱法提取的玉米芯木聚糖及对酶活的诱导.同时以木聚糖为碳源,对草菇发酵培养基配方进行正交优化设计,摸索适宜的产酶条件,为以后工业化木聚糖酶制剂的研制提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米芯:自备;菌种:草菇(*Volvariella volvaria*)由南京师范大学何强泰先生惠赠;主要仪器:分光光度计,粉碎机,高压灭菌锅,烘箱,离心机,电热式恒温水浴锅等;主要化学试剂:3,5-二硝基水杨酸,亚硫酸钠,酒石酸钾钠,浓硫酸(体积分数98%),氢氧化钠,碳酸钙,结晶酚,乙醇,木糖,对羟基苯甲酸酞肼(PAHBAH),盐酸,燕麦木聚糖等.

1.2 实验方法

1.2.1 玉米芯的粉碎 选择新鲜的、无虫蛀、无霉变的玉米芯,先用锤子敲碎成小块,然后置于粉碎机中粉碎.粉碎后的玉米芯粉过40目筛备用.

1.2.2 测定方法

1) 还原糖(RS)的测定:DNS法^[5].

2) 总糖(TS)的测定:取50 mL的木聚糖粗提液,加入1.5 mL体积分数98%的硫酸,100℃水解2 h,用碳酸钙中和后过滤,定容至100 mL,测滤液中还原糖质量.

3) 木聚糖酶酶活测定方法:木聚糖酶的酶活测定是以质量浓度0.5%的燕麦木聚糖为底物,使用对羟基苯甲酸酞肼为反应终止剂和显色指示剂,检测木聚糖水解后产生的还原糖量^[6](用木糖作为标准).以0.1 mL的0.5%燕麦木聚糖为底物,并加粗酶液20 μL,在80 μL 0.1 mol/L pH 6.20的邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液中于60℃先保温30 min,然后加入0.6 mL的对羟基苯甲酸酞肼试剂[$V(0.5 \text{ mol/L PAHBAH}) : V(\text{溶于} 0.5 \text{ mol/L HCl}$

的5% PAHBAH) = 4 : 1],摇匀,沸水浴煮10 min,然后冰水浴中冷却,最后用分光光度计测定410 nm下的吸光度值.一个国际单位(IU)定义为以质量分数0.5%的燕麦木聚糖为底物,每分钟产生1 μmol还原木糖所需要的酶量.

1.2.3 木聚糖的制备

1) 木聚糖粗提液的制备:

方法一:将质量浓度10 g/dL的氢氧化钠溶液加入到粉碎后的玉米芯粉中,使固液比为1 : 10,在高压灭菌锅中于121℃抽提30 min,冷却后于5 000 r/min离心15 min,得木聚糖粗抽提液A.

方法二:将质量浓度10 g/dL的氢氧化钠溶液加入到粉碎后的玉米芯粉中,使固液比为1 : 15,在烘箱于80℃抽提120 min,冷却后于5 000 r/min离心15 min,得木聚糖粗抽提液B.

2) 木聚糖粗提液的处理:木聚糖的粗抽提液用体积分数98%的硫酸中和,此时有水不溶性的木聚糖沉淀出来.然后加入3倍体积的体积分数为95%乙醇,可使水溶液中醇不溶性木聚糖也沉淀析出.5 000 r/min离心15 min得沉淀,沉淀用体积分数为75%的乙醇洗涤2次后,再用蒸馏水洗两次,风干后得总的玉米芯木聚糖.

1.2.4 培养基

1) 种子培养基(组分 g/L):蔗糖 10,蛋白胨 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6,微量元素 0.000 5, pH 7.0.

2) 发酵培养基(组分 g/L):自制木聚糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6,微量元素 0.000 5, pH 7.0.

其它培养基配方根据实验需要安排.

1.2.5 草菇的培养方法 制备草菇种子液,接种1 mL的草菇菌丝于已灭菌的盛有50 mL培养基的150 mL三角瓶中,40℃下于150 r/min下摇床培养4 d. 5 000 r/min离心发酵液15 min,得上清液,即为粗酶液.

2 结果与讨论

2.1 两种碱法提取的玉米芯木聚糖及对酶活诱导影响的比较

2.1.1 两种碱法提取玉米芯中木聚糖的比较 粉碎的玉米芯在10%的氢氧化钠溶液中分别于121℃抽提30 min(方法一)和80℃抽提120 min(方法二),方法一中木聚糖的抽提液颜色较深,透光率降低,同时粘度也降低.原因是在碱性条件下,高温有利于玉米芯粉中的色素物质的溶出,但这不利于木

聚糖的后处理,使木聚糖中混有其他杂质,实验中也发现最后提取出的木聚糖的颜色 121 ℃下比 80 ℃下深.高温下抽提液的粘度下降,是因为高温能促进木聚糖的水解,使木聚糖的聚合度下降,导致木聚糖的产率下降.最终,抽提液中沉淀获得木聚糖的结果见表 1.

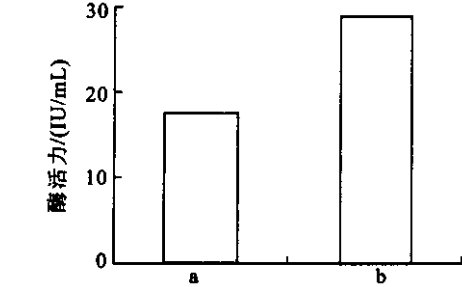
表 1 两种方法的抽提结果

Tab. 1 The result of two extraction methods			
方法	还原糖	总糖	$m(\text{还原糖}):$
	质量分数/%	质量分数/%	$m(\text{总糖})/\%$
方法一	9.31	25.73	36.2
方法二	8.06	30.45	26.5

从表 1 可看出,虽然 121 ℃的抽提时间小于 80 ℃的抽提时间,121 ℃抽提时抽提液中还原糖的含量大于 80 ℃的,这说明在碱水解时随着温度的升高,木聚糖的水解速率加速,使抽提液中还原糖的含量增加.反之,121 ℃抽提时抽提液中总糖的含量小于 80 ℃,这说明并不是温度越高就越有利于木聚糖的抽提,因此提高温度不能增加木聚糖的抽提率.除温度外,时间也可能影响木聚糖的抽提率,在低温(80 ℃)条件下,延长抽提的时间,有助于木聚糖从玉米芯粉中溶解出来.根据溶出的总糖量和 $m(\text{还原糖}):m(\text{总糖})$ 值,方法二优于方法一.

总之,木聚糖的抽提过程不仅要 将玉米芯粉中的木聚糖充分提取出,而且要防止溶出的木聚糖被降解为还原糖.比较上述两种方法,80 ℃抽提 2 h 为最佳.

2.1.2 不同碱法提取的玉米芯木聚糖对酶活诱导的影响 分别以 121 ℃和 80 ℃抽提的木聚糖(10 g/L)为碳源,比较不同的木聚糖对酶活诱导的影响,结果见图 1.由图 1 可知,以 80 ℃抽提的木聚糖为碳源,对草菇的木聚糖酶酶活的诱导比 121 ℃抽提的木聚糖高 1.7 倍,因此对草菇发酵培养基配方进行优化设计时,使用 80℃抽提的木聚糖为碳源.



a. 以 121 ℃抽提的木聚糖为碳源;b. 以 80 ℃抽提的木聚糖为碳源

图 1 不同碱法提取的玉米芯木聚糖对酶活诱导的影响

Fig. 1 Effect of corn cob xylan extracted by two alkali methods on enzyme activity

2.2 草菇木聚糖酶的发酵条件

2.2.1 制定因素水平表 根据以前的实验数据和本次实验的筛选结果,分别对 80℃抽提的木聚糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、Tween 80 和酵母膏进行优化,各因素和水平的对应关系见表 2.

表 2 因素、水平表

Tab. 2 The table of factor and level in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	A	B	C	D
	木聚糖 质量浓度/ (g/L)	C/N 质量比	Tween 80 体积 分数/%	酵母膏 质量浓度/ (g/L)
1	5	4 : 1	0	1
2	15	6 : 1	0.15	3
3	25	8 : 1	0.30	5

2.2.2 正交试验结果与分析

1) 正交试验结果:根据正交表 $L_9(3^4)$ 作正交试验,结果见表 3,趋势图见图 2.

表 3 正交试验结果

Tab. 3 Orthogonal experiments for composition of culture media

试验号	因素				酶活力/ (IU/mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	27.05
2	1	2	2	2	29.20
3	1	3	3	3	28.15
4	2	1	2	3	30.15
5	2	2	3	1	32.40
6	2	3	1	2	29.45
7	3	1	3	2	23.40
8	3	2	1	3	21.15
9	3	3	2	1	22.45
k_1	28.13	26.87	25.88	27.30	
k_2	30.67	27.58	27.27	27.35	
k_3	22.33	26.68	27.98	26.48	
R	8.33	0.90	2.10	0.87	

2) 影响产酶能力的因素分析:由极差 R 值可以看出,影响草菇产生木聚糖酶的因素依次为: $A>C>B>D$.对草菇而言,影响产酶的最主要的因素是木聚糖的质量浓度,当木聚糖的质量浓度为 15 g/L 时,酶活最高,但木聚糖质量浓度大于 15 g/L 时,反而不利于酶的产生.其原因可能是高质量浓度的木聚糖能抑制木聚糖酶的产生,或高质量浓度

的木聚糖使培养基过于粘稠,溶氧量减少,不利于菌体呼吸所致. Tween 80 的影响也较显著,在本试验中,Tween 80 体积分数为 3%时最高,一般认为,

该化合物作为一种表面活性剂,可提高膜的通透性,进而影响某些蛋白质的分泌. 因素 C/N 在 6 : 1 时最高. 酵母膏对木聚糖酶的产生影响最小.

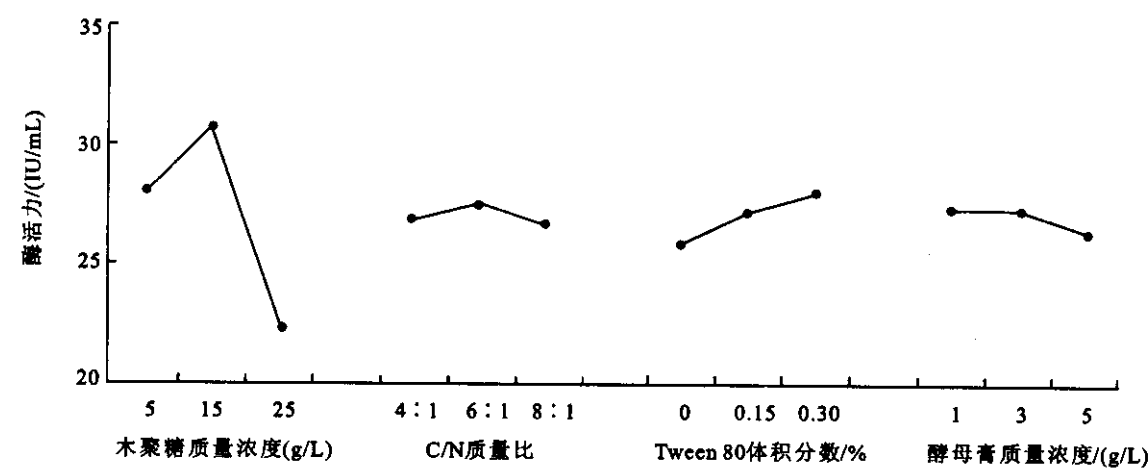


图 2 趋势图

Fig. 2 The tendency figure

3) 培养条件的优化处理:分析趋势图,适于草菇生产木聚糖酶的优势组合为 $A_2B_2C_3D_2$. 该组合与表 3 中产生酶活最高的试验 5 的培养基 $A_2B_2C_3D_1$ 基本吻合,验证了优势组合的优势效应. 由于 A, B, C 已取得最佳值, D 基本达到最高值,经过综合考虑,优化后的产酶培养基和产酶条件为: $A_2B_2C_3$

D_1 , 即培养基组成为(组分 g/L): 木聚糖 15, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5, Tween-80 3, 酵母膏 1, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6, 微量元素 0.000 5. pH 7.0. 40 ℃ 150 r/min 摇床培养 4 d. 此时,酶活达 32.4 IU/mL.

参考文献：

[1] 余东霞,石勇,糜志远. 玉米芯中木聚糖的提取研究[J]. 适用技术市场,2001,9:43—44.
[2] Hrmova M, Petrakova E, Beily P. Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose[J]. J Gen Microbiol , 1991,137: 541—547.
[3] 邵佩兰,徐明,朱晓红. 影响玉米芯木聚糖提取的因素探讨[J]. 宁夏农学院学报,2002,23(2):56—57.
[4] 洪枫,余世袁. 木聚糖成分对木聚糖酶合成的影响[J]. 纤维素科学与技术,1999,7(2):42—47.
[5] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.
[6] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. Anal Biochem, 1972,47:273.

(责任编辑:李春丽)