

几种酚酸对木聚糖酶活力的影响

田野, 欧仕益*

(暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘要: 采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定酶解后还原糖释放量,研究 4 种不同酚酸(阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸、单宁酸)对木聚糖酶活力的影响。结果表明:阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸能提高木聚糖酶活力,当这 3 种酚酸质量浓度为 0.75 mg/mL 时,酶活力分别提高 65.59%、46.21%和 12.83%。单宁酸抑制木聚糖酶活性,添加量为 0.50 mg/mL 时,抑制率达 37.18%。动力学研究表明:上述 4 种酚酸均能提高酶与底物的亲和力,对-香豆酸能提高酶反应速度,但单宁酸会使反应速度显著降低。

关键词: 酚酸;木聚糖酶;酶活力

中图分类号: Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)01-096-05

Influence of Phenolic Acids on Activity of Xylanase

TIAN Ye, OU Shi-yi*

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In this manuscript, effect of four phenolic acids, including ferulic, coumaric, salicylic and tannic acid, on the activity of xylanase was investigated through determination of reducing sugars releasing from xylans. The results showed that 0.75 mg/mL ferulic, coumaric and salicylic acid could increased the activity of xylanase by 65.59%, 46.21% and 12.83%, respectively. However, tannic acid was found as inhibitor of xylanase, and the activity decreased 37.18% when 0.50 mg/mL was presented. The results of enzyme kinetics showed that these phenolic acids increased the affinity of xylanase for the substrate. The reaction speed increased with coumaric acid added, and significantly reduced by tannic acid.

Key words: phenolic acid, xylanase, activity

纤维质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成,它是地球上最大的可再生资源^[1]。利用纤维质降解发酵生产燃料乙醇是目前的热热门课题^[2,3]。目前制约纤维质生物酒精生产的主要障碍是酶解成本过高,约占总生产成本的 40%~55%^[4-6]。因此,提高酶解效率对于解决生物能源问题具有重要意义。

植物秸秆中含有质量分数 0.4%~3.6% 的酚酸,主要是阿魏酸和对-香豆酸,它们通常是通过酯键与低聚糖侧链上的糖残基相连^[7-11]。Anderson 和 Akin 研究发现:一些富含酯化阿魏酸、香豆酸但不含木质素的细胞很难酶解,如 C4 植物维管束鞘薄壁细胞^[12];而 Mussatto 等人先用碱预处理啤酒大麦渣再用纤维素酶降解,发现葡萄糖和纤维二糖

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 广东高校科技成果产业化重大项目(cgzhzd0709)。

* 通信作者: 欧仕益(1963-),男,湖南长沙人,教授,主要从事食品化学及功能性食品研究。Email: tosy@jnu.edu.cn

释放率增加 4 倍^[13]。

这些研究表明,酚酸对纤维质降解的两种主要酶纤维素酶和木聚糖酶似乎影响较大,但直接研究酚酸对这两种酶的影响国内外尚未见报到。作者将 4 种不同质量分数的酚酸添加到木聚糖酶反应体系中,研究酚酸对木聚糖酶的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

木聚糖:广州市齐云生物技术有限公司产品;木聚糖酶(2500FXU):诺维信(中国)生物技术有限公司产品;阿魏酸(纯度:98%):上海试剂一厂产品;对-香豆酸(SIGMA):广州市齐云生物技术有限公司产品;单宁酸:天津市福晨化学试剂厂产品;水杨酸:天津市大茂化学试剂厂产品;其它所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

SHA-B 水浴恒温振荡器,江苏金坛市医疗仪器厂产品;HH-4 恒温水浴锅,江苏金坛市宏华仪器厂产品;KDC-1044 低速离心机,科大创新股份有限公司中佳分公司产品;UV-9600 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司产品。

1.3 酚酸对酶活力的影响

1.3.1 酚酸对木聚糖酶活力的影响 用 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=5.5)配制质量分数分别为 0.50% 的木聚糖液和 0.20% 的木聚糖酶液,分别配制 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30% 的下列酚酸溶液:阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸、单宁酸。取 100 mL 三角瓶,各加入 20 mL 木聚糖液、10 mL 木聚糖酶液和 10 mL 酚酸溶液,在 55℃、转速 100 r/min 下,振荡培养 3h 后,放入沸水浴中灭活 15 min 终止反应。离心,取 1 mL 上清液用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定还原糖,各处理重复 3 次。

1.3.2 酚酸影响木聚糖酶活性的动力学研究

1) 阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸影响木聚糖酶活性的动力学研究 用 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=5.5)配制质量分数为 0.20%、0.40%、0.60%、0.80% 和 1.00% 的木聚糖溶液及 0.004% 的木聚糖酶液。分别配制 0.25% 的下列酚酸溶液:阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸。取 5 支 10 mL 试管分别加入 2 mL 木聚糖酶液,在 55℃ 水浴中孵育 10

min 后,再分别加入 4 mL 不同浓度的木聚糖液和 2mL 酚酸溶液,继续孵育 5 min。立即置于沸水浴中灭活。离心,取 2 mL 上清液用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定还原糖,各处理重复 3 次。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法制得酶动力学曲线并计算 K_m 和 V_{max} 值。

2) 单宁酸影响木聚糖酶活性的动力学研究 分别配制质量分数为 0.25% 的单宁酸和 0.4% 的木聚糖酶液(0.1 mol/L、pH=5.5 醋酸-醋酸钠缓冲液配制),按上述方法进行试验。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法制得酶动力学曲线并计算 K_m 和 V_{max} 值。

1.4 统计分析

各组还原糖含量数据为 3 次平行测定值(平均值±标准误差)。用 SPSS 13.0 统计软件,单因素方差分析(ANOVA)中采用 Duncan 检验, $P \leq 0.05$ 时为显著差异。

2 结果与分析

由表 1 可知,阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸均能提高木聚糖酶的活力。随着酚酸质量分数的增加,催化体系中的还原糖质量浓度也随之升高。当阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸的质量浓度达到 0.75 mg/mL 时,促进率分别为 65.59%、46.21% 和 12.83%。

单宁酸会抑制木聚糖酶的活性,这种抑制作用在单宁酸质量浓度为 0.50 mg/mL 时达到最大,此时的抑制率为 37.18%。当体系中单宁酸质量浓度超过 0.50 mg/mL 时,还原糖质量浓度会有所回升。

由表 2 和表 3 所示,与未加酚酸样相比,阿魏酸和水杨酸均表现为最大反应速度基本不变,而 K_m 值明显减小;这表明阿魏酸和水杨酸能够增加木聚糖酶对底物的亲和力。而对-香豆酸的动力学结果表现为最大反应速度增大, K_m 值减小,其变化较小,表明对-香豆酸不仅能提高酶与底物的亲和力,还能作用于酶-底物复合物,使其分解速度增加并促进木糖的生成从而提高木聚糖酶活力。与上述 3 种酚酸相反,单宁酸对木聚糖酶的抑制作用,表现为最大反应速度和 K_m 值均显著减小,这说明单宁酸既能作用于游离的木聚糖酶,提高其亲和力,又能与酶-底物复合物结合,降低酶反应速度,从而表

现对木聚糖酶的抑制作用。

表 1 不同酚酸对木聚糖酶释放还原糖的影响 (n=3)

Tab.1 Effect of phenolic acids concentrations on the released o reduce sugars from xylanase (n=3)

酚酸 质量分数/%	还原糖质量浓度/(mg/mL)			
	阿魏酸	对 香豆酸	水杨酸	单宁酸
0.00	1.86±0.22 ^a	2.23±0.12 ^a	2.18±0.07 ^a	1.83±0.04 ^a
0.13	2.32±0.24 ^b	2.40±0.03 ^a	2.20±0.03 ^{ab}	1.51±0.07 ^b
0.25	2.63±0.17 ^{bc}	2.69±0.11 ^b	2.27±0.03 ^{bc}	1.24±0.10 ^{cd}
0.38	2.84±0.18 ^{cd}	2.75±0.16 ^b	2.32±0.07 ^{cd}	1.23±0.08 ^{cd}
0.50	2.95±0.27 ^{cd}	2.88±0.19 ^{bc}	2.38±0.00 ^{de}	1.15±0.06 ^d
0.63	3.03±0.24 ^{cd}	2.99±0.16 ^c	2.43±0.07 ^e	1.20±0.05 ^{cd}
0.75	3.08±0.16 ^d	3.26±0.07 ^d	2.45±0.06 ^e	1.26±0.03 ^c

表 2 阿魏酸、对香豆酸和水杨酸对木聚糖酶(10 μg/mL)活性影响的动力学测定结果 (n=3)

Tab.2 Effect of ferulic, coumaric and salicylic acid concentration on the kinetics activity of xylanase (n=3)

	木聚糖质量 浓度 S/(g/L)	反应速度 V/ (g/L · min ⁻¹)	动力学方程	K _m / (g/L)	V _{max} (g/L · min ⁻¹)
未加酚酸	1.00	0.025 5±0.000 4	1/V= 36.512×1/S+2.921 9 R ² =0.999 5	12.496 0	0.342 2
	2.00	0.046 4±0.000 4			
	3.00	0.065 5±0.003 3			
	4.00	0.084 3±0.001 7			
	5.00	0.099 7±0.003 4			
阿魏酸	1.00	0.056 1±0.001 6	1/V=14.592×1/S+3.277 R ² =0.998 6	4.452 9	0.305 2
	2.00	0.094 8±0.002 2			
	3.00	0.118 5±0.001 2			
	4.00	0.146 4±0.001 2			
	5.00	0.165 4±0.001 9			
对-香豆酸	1.00	0.044 5±0.004 9	1/V=20.28×1/S+2.206 8 R ² =0.999 6	9.190 2	0.453 1
	2.00	0.081 0±0.012 1			
	3.00	0.110 8±0.001 6			
	4.00	0.141 3±0.004 7			
	5.00	0.156 4±0.002 2			
水杨酸	1.00	0.042 9±0.002 4	1/V=20.659×1/S+3.087 9 R ² =0.988 3	6.690 3	0.323 8
	2.00	0.068 1±0.002 9			
	3.00	0.110 8±0.005 1			
	4.00	0.127 3±0.003 0			
	5.00	0.146 2±0.001 1			

表 3 单宁酸对木聚糖酶(1 mg/mL)活性影响的动力学测定结果($n=3$)
Tab. 3 Effect of tannic acid on the kinetic activity of xylanase ($n=3$)

	木聚糖质量 浓度 $S/(\text{g/L})$	反应速度 $V/$ $(\text{g/L} \cdot \text{min}^{-1})$	动力学方程	$K_m/$ (g/L)	V_{max} $(\text{g/L} \cdot \text{min}^{-1})$
未加酚酸	1.00	$0.078\ 3 \pm 0.001\ 6$	$1/V = 11.986 \times 1/S + 0.767\ 1$ $R^2 = 0.999\ 6$	15.625 1	1.303 6
	2.00	$0.150\ 2 \pm 0.001\ 2$			
	3.00	$0.205\ 4 \pm 0.001\ 6$			
	4.00	$0.267\ 2 \pm 0.005\ 5$			
	5.00	$0.316\ 4 \pm 0.011\ 3$			
单宁酸	1.00	$0.088\ 9 \pm 0.004\ 2$	$1/V = 9.19 \times 1/S + 2.271\ 1$ $R^2 = 0.986\ 9$	4.046 5	0.440 3
	2.00	$0.135\ 2 \pm 0.002\ 7$			
	3.00	$0.183\ 8 \pm 0.003\ 1$			
	4.00	$0.222\ 3 \pm 0.002\ 4$			
	5.00	$0.266\ 5 \pm 0.007\ 8$			

目前,酚酸对木聚糖酶的影响国内外还未见报道。研究结果表明:添加阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸能提高木聚糖酶活性,说明碱预处理提高解纤维质的降解率主要是打断酚酸对纤维质的交联,但同时也可能因为释放出阿魏酸等酚酸而增加酶解效率,但3种酚酸影响木聚糖酶的作用机理还有待进一步研究。

单宁酸对酶促反应的抑制作用可能是多方面因素共同作用的结果:1)酶的化学本质是蛋白质,与一般的蛋白质一样,酶与单宁结合生成不溶性的结合物,该结合物较酶的构型有所改变,从而造成酶活力的降低或丧失;2)对于以生物大分子为底物的酶促反应,单宁酸也可同底物结合,剥夺酶的催化底物或生成能降低酶活性的化合物;3)金属离子,例如 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对某些酶起到了激活作

用,有的还可作为酶的辅基,而单宁对金属离子具有络合作用,进而抑制酶活力^[14]。

3 结 语

阿魏酸、对-香豆酸、水杨酸能提高木聚糖酶的活力。这3种酚酸对木聚糖酶促进效果最大时的质量浓度均为 0.75 mg/mL,此时的促进率分别为 65.59%、46.21%和 12.83%;其动力学研究表明:添加上述酚酸均可以提高酶与底物的亲和力,而且对-香豆酸还会增大酶反应速度。

单宁酸对木聚糖酶具有抑制作用,表现为既提高酶与底物的亲和力且显著降低酶反应速度。单宁酸对木聚糖酶的最大抑制质量浓度为 0.50 mg/mL,最大抑制率为 37.18%,超过最大抑制质量浓度,其抑制效果会有所降低。

参考文献(References):

[1] 刘树立, 张华, 张春艳, 等. 纤维素酶分子结构及作用机理的研究进展[J]. 食品科技, 2007, (7):12—15.
LIU Shu-li, ZHANG Hua, ZHANG Chun-yan, et al. Progress of the molecular structure and mechanim about cellulase [J]. Food Science and Technology, 2007, (7):12—15. (in Chinese)

[2] 孙智谋, 蒋磊, 张俊波, 等. 世界各国木质纤维原料生物转化燃料乙醇的工业化进程[J]. 酿酒科技, 2007, (1):91—94.
SUN Zhi-mou, JIANG Lei, ZHANG Jun, et al. Industrialization course of bioconversion of fuel alcohol by cellulosic materials around the world[J]. Liquor—making Science and Technology, 2007, (1):91—94. (in Chinese)

[3] 李文哲, 张波. 生物质能源与发展[J]. 现代化农业, 2006, (11):1—5.
LI Wen-zhe, ZHANG Bo. Current situation and development of biomass energy[J]. Modernizing Agriculture, 2006, (11): 1—5. (in Chinese)

[4] 靳胜英, 张礼安, 张福琴. 纤维质原料制乙醇的关键技术[J]. 化学工业与工程技术, 2009, (4):32—37.

- Jin Sheng-ying, Zhang Li-an, Zhang Fu-qin. Key techniques for preparation ethanol with lignocellulosic materials[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2009, (4):32—37. (in Chinese)
- [5] 章冬霞, 元伟, 孙秀云, 等. 木质纤维素酶水解技术的研究[J]. *吉林化工学院学报*, 2009, 26(1):1—5.
ZHANG Dong-xia, QI Wei, SUN Xiu-yun, et al. Research on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material[J]. *Journal of Jilin Institute of Chemical Technology*, 2009, 26(1):1—5. (in Chinese)
- [6] 余洪波, 张晓昱, 柯静, 等. 生物—碱氧化预处理玉米秸秆酶解条件的优化[J]. *农业工程学报*, 2009, 25(4):201—205.
YU Hong-bo, ZHANG Xiao-jing, KE Jing, et al. Bio-alkaline oxidation pretreatment of corn stover hydrolysis Optimization[J]. *Transactions of the CSAE*, 2009, 25(4):201—205. (in Chinese)
- [7] Feng X, Sun R C, Sun J X, et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 552:207—217.
- [8] Torre P, Aliakbarian B, RIVAS B, et al. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis[J]. *Biochem Eng J*, 2008, 40(3): 500—506.
- [9] Ferreira P, Diez N, Faulds C B, et al. Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(8):1522—1528.
- [10] Buranov A U, Mazza G. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(4):1542—1548.
- [11] 袁小平, 姚惠源. *Bacillus subtilis* 木聚糖酶的纯化及其对小麦麸皮的作用[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 24(1):19—23.
YUAN Xiao-ping, YAO Hui-yuan. Purification of endoxylanases from *Bacillus subtilis* and their actions on Wheat Bran [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 24(1):19—23. (in Chinese)
- [12] Anderson W F, Akin D E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35:355—366.
- [13] Mussatto S I, Fernandes M, Milagre A M, et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43:124—129.
- [14] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

科技信息

中国有机产品认证信息将上网实时公布

市场上,人们常看到各种标着“有机”字样的大米、蔬菜、水果,如何确认它真的是有机产品呢?国家认证认可监督管理委员会近日表示,正采取措施加强监管,有机产品认证追溯信息届时要通过国家认监委官网实时公布。

近年,有机产品需求明显上升,但有机产品仍存在夸大与虚假宣传等问题。国家认监委表示,正采取措施对有机产品认证标志加强管理,要求认证机构采用更为严格的防伪、追溯等手段,在有机认证标志编码前应注明“有机码”字样,并赋予每枚认证标志唯一编码,确保“每枚有机认证标志能从市场溯源到每张对应的有机产品认证证书、获证产品和生产企业”。

认监委将开发具有统一赋号、网络查询功能的有机产品认证信息采集和认证标志溯源系统,通过国家认监委官方网站等渠道实时公布有机产品认证信息,解决有机产品认证标志无法查询、验证问题。

[消息来源]新京报. 中国有机产品认证信息将上网实时公布[EB/OL]. (2011—12—19). [2011—12—20]. http://news.xinhuanet.com/food/2011-12/19/c_122443286.htm

欧盟食品安全局就食品中的 TBBPA 及其衍生物发布科学意见

应欧盟委员会的要求,12月19日欧盟食品安全局就食品中的四溴双酚 A(TBBPA)及其衍生物发布了科学意见。

四溴双酚 A 及其衍生物广泛用作阻燃剂。从 2007 年到 2010 年期间的 344 份 TBBPA 数据分析食品样品由两个欧洲国家(挪威和西班牙)提交给了欧盟食品安全局。欧盟食品安全局认为,在欧盟地区通过饮食途径接触到的四溴双酚 A 对人体无健康威胁,另外婴儿通过母乳接触到四溴双酚 A 后所面临的风险较低,儿童通过室内粉尘接触到四溴双酚 A 后所面临的风险亦较低。

[消息来源]EFSA. EFSA publishes general guidance on 90-day feeding studies on whole food and feed [EB/OL]. (2011—12—19). [2011—12—20]. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2477.htm>

(江南大学 图书馆 张群供稿)