

会员登录

用户名:
密码:
验证码: 3828

相关文章

- 酶法制备乳源活性肽的工艺研...
- 植酸酶的耐热性及其耐热机理...
- 减少饲料酶制剂在高温加工过...
- 外源植酸酶对饲料钙、磷体外...
- 半纤维素酶在饲料工业中的应...
- 中性植酸酶分子生物学研究进...
- 纤维素酶活力测定条件研究
- Bacillus subtilis T15产木聚...
- 饲用植酸酶的应用研究
- 酶制剂在反刍动物上的应用

合作伙伴



枯草芽孢杆菌XY1905木聚糖酶酶学性质的初步研究

作者:崔月明 樊妙姬 栾桂龙 凌云 韦莉莉 蒋艳明 期号:2005年第6期

摘要 对从土壤中筛选到的一株枯草芽孢杆菌XY1905木聚糖酶的酶学性质进行了初步研究,结果表明:木聚糖酶测定的最佳条件是pH为6,反应时间10min,反应温度60℃;热稳定性很强,在80℃下保温1h,剩余酶活96.44%;对金属离子不敏感。

关键词 枯草芽孢杆菌;木聚糖酶;酶学性质
中图分类号 S816.6

The Properties of Xylanase by Bacillus Subtilis XY1905

Cui Yueying, Fan Miaoji, Luan Guilong, Ling Yun, Wei Lili, Jiang Yanming

Abstract The study were carried out to measure the properties of xylanase by bacillus subtilis XY1905 which was screened from the soil. The result showed that the optimal conditions for measuring the activity of xylanase were: reaction pH 6.0, reaction time 10 min. reaction temperature 60℃. Xylanase is stable when heated and 96.44% of activity remained after 1h at 80℃. It is unsensitive to metalli cions.

Key words bacillus subtilis; xylanase; enzyme properties

木聚糖是半纤维素的主要成分,属于植物细胞壁中的结构性非淀粉多糖,约占细胞干重的15%~30%,为自然界第二大可再生资源[1]。木聚糖酶是一种能够降解木聚糖的复合酶,主要由内切和外切β-1,4-D-木聚糖酶组成。在工业上有广阔的应用前景:在饲料工业中,可将半纤维素降解为低聚木糖,降低因粘度而引起的抗营养作用,改善饲料性能;在造纸工业中,用木聚糖酶预处理可以降低漂白中氯和含氯化物的用量,减轻环境污染并且改善了漂白效果;在食品工业中可改善面团质地,用于果汁、啤酒的澄清,所分解产生的低聚木糖可用做食品添加剂[2]。但应用于不同工业所需木聚糖酶的性质不同,如造纸需要耐碱性的木聚糖酶,而用在饲料中希望得到偏酸性耐高温的酶。本试验从土壤里分离得到了20多株木聚糖酶产酶菌,初步进行了鉴定并建立了木聚糖酶菌种库,其中有3株细菌产酶活较高,本实验主要对一株枯草芽孢杆菌XY1905的木聚糖酶的酶学性质进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 XY1905 本实验室从南宁纸厂土壤中筛选[3]。1.1.2 种子培养基(g/l) (NH₄)₂SO₄ 0.5, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.3, CaCl₂·2H₂O 0.2, K₂SO₄ 0.1, NaCl 0.2, 自制玉米芯半纤维素[4]15, pH7。

1.1.3 产酶培养基(g/l) 将种子培养基中的半纤维素改为稻草粉28和麸皮12, pH7。

1.2 试剂

1.2.1 D-木糖(sigma)溶液10μmol/ml 0.15g溶于柠檬酸缓冲液中定容至100 ml。

1.2.2 底物1% 1g燕麦木聚糖(sigma)加入柠檬酸缓冲液中磁力搅拌过夜,定容至100 ml。

1.2.3 DNS试剂 取酒石酸钾钠182g溶于500ml水中,加热(不超过60℃),在热溶液中依次加入3,5-二硝基水杨酸6.3g、NaOH 21g、苯酚5g、亚硫酸钠5g搅拌使它们溶解,冷却后定容至1 000 ml,贮于棕色瓶,两周后方可使用。

1.3 标准曲线的制作

分别取木糖溶液0.1、0.2……0.7ml于试管中补加柠檬酸缓冲液至2ml,再加3mlDNS混匀,煮沸10min,取出冷却后加水至25ml,以蒸馏水作空白,在540 nm处测OD值。可得到OD值与相应的木糖浓度的标准曲线。

1.4 酶活力测定的一般方法[5, 6]

1.4.1 粗酶液的制备 取出发酵后的酶液,8 000r/min离心5min,上清即为粗酶液。

1.4.2 酶活力测定 取底物1ml于管中,据酶活大小加适量稀释的粗酶液(要求最终测酶活时OD值在0.2~0.8之间),补加柠檬酸缓冲液至2ml,50℃水浴反应30min,加3mlDNS混匀,煮沸10min,取出冷却后加水至25ml,在540nm处测OD值。以每分钟产生1μmol分子木糖的酶量作为一个酶活单位。

1.5 制定因素位级表[7]

根据预备试验,选定pH值、反应温度和反应时间3个因素,每个因素取4个水平,本试验不考察各因素间的交互作用,选用正交表L₁₆(4³),见表1。

表1 因素水平

水 平	A pH值	B 温度(℃)	C 反应时间(min)
1	4	45	10
2	5	50	15
3	6	55	30
4	7	60	45

2 结果和分析

2.1 测定条件的正交试验结果

表2 正交试验结果

序 号	A pH值	B 温度(℃)	C 反应时间(min)	酶 活 (TU)
1	4	45	10	1.2
2	5	50	15	1.5
3	6	55	30	2.1
4	7	60	45	2.5

1	1	1	1	1.88
2	1	2	2	0.38
3	1	3	3	0.25
4	1	4	4	2.25
5	2	1	3	2.08
6	2	2	4	4.43
7	2	3	1	4.06
8	2	4	2	1.76
9	3	1	4	2.67
10	3	2	3	3.71
11	3	3	2	5.13
12	3	4	1	3.08
13	4	1	2	3.03
14	4	2	1	2.03
15	4	3	4	2.77
16	4	4	3	
K1	3.93	8.97	14.47	
K2	12.28	9.2	12.27	
K3	13.27	10.55	8.07	
K4	10.91	12.21	6.12	
k1	0.98	2.24	3.62	
k2	3.21	2.3	3.07	
k3	3.32	2.64	2.02	
k4	2.73	3.05	1.53	
R	2.34	0.81	2.09	

根据正交试验结果表2的极差R值可以得出，影响XY1905所产木聚糖酶活性的因素依次为A>C>B；即反应的pH值对酶活性的影响最大，其次是反应时间，而反应温度的各个k值较为接近极差很小。再从表3的方差分析结果来看，pH值和反应时间远远大于F_{0.01}是极显著因素，而反应温度的F值小于F_{0.05}，在实验选取的水平范围内不显著。

表3 方差分析

方差来源	方差	自由度	均方	F比	优化水平
A	14.03	3	4.68	39**	A3
B	1.67	3	0.56	4.67	
C	10.93	3	3.64	0.33**	C1
S _e	0.69	6	0.12		
S _■	27.32				

注：F_■(3,6)=9.78, F_■(3,6)=4.76。

2.2 正交优化水平分析

从图1可以更直观的看出，pH在第2、第3水平时酶活较高，在第3水平时达到最大，若pH偏大或偏小酶活都明显下降；随着反应时间的延长，酶活性呈现明显的下降趋势，当反应时间为第1水平时所测的酶活最高；而反应温度呈缓慢上升趋势，从此趋势来看反应温度还需要进一步优化，此枯草芽孢杆菌木聚糖酶的最佳反应温度可能更高。比较表2中的k值，选出最优化水平组合为A3C1B4，即最适反应pH值为6，时间10min，温度60℃。但由于B因素不显著，可以不取优化水平，即优化水平组合可写为A3C1B。

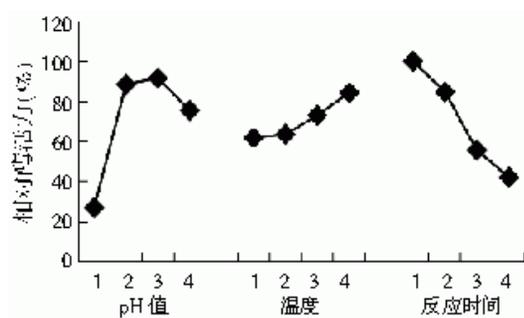


图1 因素水平与酶活的关系

2.3 酶反应温度的进一步优化

将XY1905的木聚糖酶粗酶液分别在不同温度下测酶活，随着温度的升高酶活力逐渐下降，在60℃时酶活力最高，为该酶的最适作用温度（图2）。

60 65 70 75 80
温度(°C)

图2 温度对酶的影响

2.4 酶的热稳定性

将木聚糖酶粗酶液分别在不同温度下保温1h, 然后按优化方法测定酶活力。以未保温的酶活力作为100%。结果表明, 在40~60℃保温酶活力不仅没有下降反而有所升高, 可能是在保温的较高温度下酶显得更活泼, 在加入底物之后能迅速发生反应, 从而使所测酶活偏高; 在70℃、80℃保温酶活力下降4%左右。

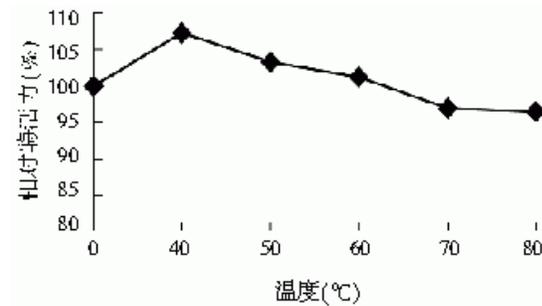


图3 木聚糖酶的热稳定性

2.5 酶的pH稳定性

将粗酶液放在不同pH值的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 40℃保温2h按优化方法测定酶活力。在pH7时对酶活性影响最小, 在酸性条件下, 酶活随酸度的增加逐渐下降。

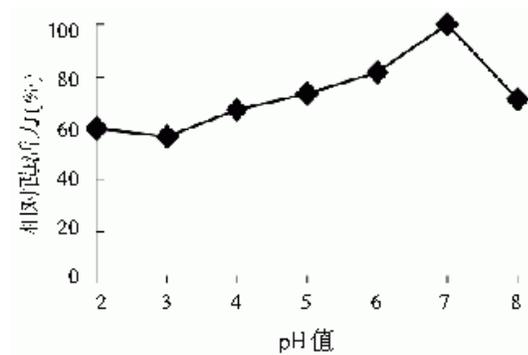


图4 木聚糖酶的pH稳定性

2.6 金属离子对酶活性的影响

将粗酶液放在1mM/l的不同金属离子溶液中, 40℃保温2h按优化方法测定酶活力。Ba²⁺对酶活有促进作用; Mn²⁺、K⁺、Zn²⁺对酶活有抑制作用, 其中Mn²⁺的抑制作用最强, 酶活下降14%; 其它离子对酶活无明显影响。

3 讨论

XY1905所产酶的最适测定条件为pH6, 反应时间10min, 反应温度60℃, 可初步判定此酶在偏酸性环境及较高温环境下有较高酶活, 有做饲料添加剂的潜力。另外, 反应时间若是更短, 酶活性会更高, 但由于自动化程度不高, 为了减小误差仍选反应时间为10min。

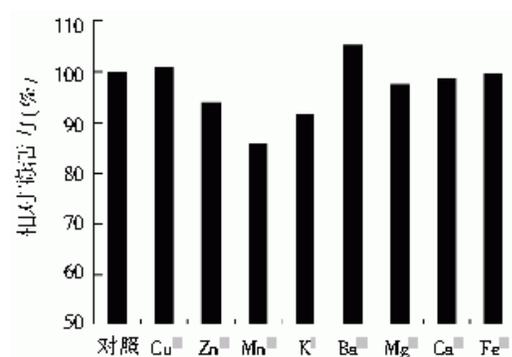


图5 金属离子对酶活性的影响

此酶的热稳定性在已发表的木聚糖酶中可能是最好的, 在80℃下保温1h剩余酶活为96.44%; 真菌生产的木聚糖酶耐热性普遍较差[8-10], 保温1h半失活温度在55℃左右, 现用的饲用酶制剂中木聚糖酶[11]在85℃湿热处理10min剩余酶活为34.62%由于此酶的热稳定性很好就可以保证在饲料加工的制粒过程中酶活性几乎没有损失。

此酶对1mM/l的金属离子不太敏感, 而青霉菌所产酶[12]在1mg/l的浓度下受Cu²⁺的强烈抑制, 剩余酶活为27.3%, 因此不同来源的木聚糖酶对金属离子的敏感程度有较大差异。

参考文献

1 Swaroepa Rani. Xylanase production by hypoxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbiol.*, 1996, 18: 23~28

- 2 怀文辉, 何秀萍等. 微生物木聚糖酶研究进展及应用前景. 微生物学通报, 2000, 27 (2): 137
- 3 王宜磊, 邓振旭. 透明圈法快速筛选半纤维素分解菌. 生物技术, 2000, 10 (1): 37~39
- 4 邵佩兰, 徐明等. 用碱法提取玉米芯木聚糖的研究. 宁夏农学院学报, 2000, 21 (4): 47~48
- 5 Khan, A. W. Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures. Enzyme Microb. Technol., 1986, 8: 373~377
- 6 董国强, 张猛白, 林开江. 半纤维素酶的DNS液显色法测定. 浙江农业科学, 1989, 2: 88~89
- 7 杜荣骞. 生物统计学. 高等教育出版社, 1985
- 8 张翠霞, 王艳华等. 黑曲霉生产木聚糖酶固态发酵及粗酶制剂性质的研究. 饲料研究, 2004, 3: 7~9
- 9 占纪勋, 刘廷志等. 黑曲霉S13所产木聚糖酶的性质及应用研究. 北京工商大学学报(自然科学版), 2003, 21 (2): 4~6
- 10 吴克, 刘斌等. 绿色木霉木聚糖酶的纯化和性质. 生物学杂志, 2001, 18 (6): 15~17
- 11 李莲, 罗长才. 饲用酶制剂中木聚糖酶酶学性质的研究. 饲料工业, 2003, 24 (1): 19~21
- 12 朱启忠. 青霉菌M8产胞外木聚糖酶的培养条件及性质研究. 聊城师院学报(自然科学版), 1999, 12 (4): 69~7

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有: 饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址: 沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编: 110036 投稿: E-mail: tg@feedindustry.com.cn 广告: E-mail: ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部: (024) 86391926 (传真) 编辑二部: (024) 86391925 (传真) 网络部、发行部: (024) 86391237 总编室: (024) 86391923 (传真)