

内切木聚糖酶的选择性纯化及酶解制备 低聚木糖的研究



MAO L S

毛连山, 勇强, 宋向阳, 姚春才, 余世袁

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘 要: 研究了超滤分离除去里氏木霉木聚糖酶中的外切- β -木糖苷酶, 以及酶解制备低聚木糖。研究表明: 用超滤的方法能完全除去外切- β -木糖苷酶, 透过液经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定为单带, 酶解产物全部是低聚木糖, 当酶解时间从 2 h 延长到 10 h 时, 低聚木糖的得率从 26.83% 增加到 54.22%; 而用粗木聚糖酶酶解制备低聚木糖时, 当酶解时间从

2 h 延长到 10 h 时, 低聚木糖得率从 17.97% 下降到 11.12%。因此, 采用该技术可以大幅度增加总糖中低聚木糖所占的比例, 显著提高木聚糖原料的有效利用率。

关键词: 低聚木糖; 酶水解; 木聚糖酶; 里氏木霉。

中图分类号: TQ920.1; Q556

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2006)01-0124-03

Study on Production of Xylo-oligosaccharides from Xylan Hydrolyzed by Selectively Purified Endo- β -xylanase

MAO Lian-shan, YONG Qiang, SONG Xiang-yang, YAO Chun-cai, YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Studies on removing exo- β -xylosidase by ultrafiltration from xylanase synthesized by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by selectively purified xylanase were investigated. It was found that ultrafiltration could remove completely exo- β -xylosidase from xylanase system. The liquid of permeation of ultrafiltration was identified to be homogeneous by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) chromatography, and the product of enzymatic hydrolysis from the liquid of permeation of ultrafiltration was wholly xylo-oligosaccharides. The yield of xylo-oligosaccharides increased from 26.83% to 54.22% when enzymatic hydrolysis time was increased from 2 h to 10 h. However, during the production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by coarse xylanases, the yield of xylo-oligosaccharides dropped from 17.97% to 11.12%, when enzymatic hydrolysis time was increased from 2 h to 10 h. It was concluded that the effective conversion of xylan was enhanced and the ratio of xylo-oligosaccharides to xylose was markedly increased with this method, and this technique would provide a new way for xylo-oligosaccharides production.

Key words: xylo-oligosaccharides; enzymatic hydrolysis; xylanase; *Trichoderma reesei*.

低聚木糖是一种安全、无毒和高效的双歧因子, 可自然增殖人体和动物肠道内的双歧杆菌并产生多种保健作用^[1]。目前, 低聚木糖的制备方法主要采用生物酶水解法, 洪枫等通过沉淀剂 H 处理粗木聚糖酶液和调控酶解时的 pH 值, 使得酶解产物中的木糖含量降低, 大幅度增加总糖中低聚木糖所占的比例^[2-3]; 赵林果等通过多轮定向酶解重复利用未水解的木聚糖, 提高了原料的利用率和低聚木糖的得率^[4]。通常认为木聚糖酶主要是由内切-1,4- β -木聚糖酶(EC3.2.1.8)和外切- β -木糖苷酶(EC3.2.1.37)组成^[5], 一般而言, 前者从主链内部作用于木糖苷链, 可随机将木聚糖主链降解成短链的低聚木糖, 而后者作用于短链的低聚木糖, 从非还原性末端释放出木糖, 而且外切- β -木糖苷酶对低聚木糖的亲合力较强, 它的存在导致

收稿日期: 2004-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070636)

作者简介: 毛连山(1970-), 男, 江苏兴化人, 副教授, 博士, 从事林产生物化学加工研究。

木糖的含量增高,降低了低聚木糖的纯度和得率,因此如何将外切- β -木糖苷酶从木聚糖酶系中分离出去已成为该技术的关键。作者采用了超滤分离除去里氏木霉木聚糖酶中的外切- β -木糖苷酶,并对酶解制备低聚木糖进行了研究。

1 材料与方法

1.1 粗木聚糖和木聚糖酶液的制备

粗木聚糖酶和木聚糖酶液由南京林业大学生物化工研究所提供,制备方法见文献[6]。

1.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

凝胶电泳按文献[7]的方法进行,凝胶质量分数为 12.5%,缓冲液为 Tris-HCl 溶液,pH 值 8.6。

1.3 测定方法

低聚木糖的分析、木聚糖酶酶活和外切- β -木糖苷酶酶活的测定,方法见文献[8]。

2 结果与讨论

2.1 超滤分离粗木聚糖酶的结果

内切- β -木聚糖酶和外切- β -木糖苷酶的相对分子质量(M_w)差别较大,内切- β -木聚糖酶的 M_w 一般在 10 000 ~ 50 000 u 之间,而外切- β -木糖苷酶的 M_w 一般在 100 000 u 以上^[5],可以采用超滤方法将它们分离,超滤条件为:温度 25 °C,压力 4 kPa,进料速度 450 mL/min。里氏木霉 Rut C-30 培养的粗酶液通过超滤分离得到透过液和截留液,分别测定粗木聚糖酶、超滤透过液和截留液的木聚糖酶和木糖苷酶的酶活,并对它们进行了电泳分析,结果见表 1。

表 1 超滤分离粗木聚糖酶的结果

Table 1 Results of ultrafiltration separation of coarse xylanases

项目 items	总木聚糖酶酶活/(IU · mL ⁻¹) total xylanases activity	总木糖苷酶酶活/(IU · mL ⁻¹) total xylosidase activity	电泳结果 results of SDS-PAGE
粗木聚糖酶 coarse xylanases	7310	61.39	有两条色带 two ribbons
超滤透过液 liquid of permeation	6572	未被检出 can't be checked	有一条色带 one ribbon
超滤截留液 liquid of interception	457	52.62	有两条色带 two ribbons

由表 1 可知:粗木聚糖酶液中含有一定量的木糖苷酶,经过超滤分离后,透过液中没有外切- β -木糖苷酶或外切- β -木糖苷酶的数量很少,没有被检出,内切- β -木聚糖酶酶活的得率较高,达 89.91%,大部分外切- β -木糖苷酶和小部分内切- β -木聚糖酶留在截留液中,还有少量的外切- β -木糖苷酶和内切- β -木聚糖酶吸附在超滤膜上。电泳结果显示粗木聚糖酶液有两条色带,而超滤透过液只有一条色带,这说明超滤分离已选择性地在外切- β -木糖苷酶分离出去了。分别对透过液和截留液进行了酶解木聚糖的实验发现透过液的酶解产物全部是低聚木糖,没有木糖,透过液是内切- β -木聚糖酶。截留液的酶解产物只有少量的低聚木糖,木糖的含量很高,截留液是内切- β -木聚糖酶和外切- β -木糖苷酶的混合酶^[9]。再次说明用超滤的方法可以选择性除去里氏木霉 Rut C-30 培养的粗酶液中的外切- β -木糖苷酶。

2.2 粗木聚糖酶超滤前后酶解效果的比较

本实验分别采用粗木聚糖酶以及超滤处理后的透过液水解木聚糖。酶解条件为:底物质量浓度 32.50 g/L,酶用量 2%(体积分数),pH 值 4.8,酶解温度 50 °C,酶解时间分别为 2、4、6、8 和 10 h,酶解结果见表 2。

由表 2 可以看出,粗木聚糖酶在未经超滤处理前,木糖得率、总糖得率均随酶解时间的延长而提高,而低聚木糖的得率随着酶解时间的延长而降低,酶解时间大于 6 h 后,低聚木糖得率下降的幅度减缓,低聚木糖占总糖的比例随着酶解时间的延长而下降;经超滤处理后,由于除去了外切- β -木糖苷酶,透过液的酶解产物全部是低聚木糖,低聚木糖得率和总糖得率随着酶解时间的延长不断提高,酶解 10 h

时,低聚木糖含量达 54.22%,与粗木聚糖酶制备低聚木糖相比,低聚木糖得率提高了 43.10%,木聚糖原料的利用率大幅度提高。

粗木聚糖酶液中外切- β -木糖苷酶的酶活较低(表1),但酶解产物中木糖含量却很高,尤其是酶解后期木糖含量更高,酶解 10 h 时,木糖含量高达 25.03%,低聚木糖含量只有 11.12%,这说明了外切- β -木糖苷酶对低聚木糖的亲合力较强,具有较强的酶解低聚木糖的能力,从而使得产物中低聚木糖的含量降低,而木糖的含量稳步上升。因此要想提高低聚木糖的纯度和得率,必须将粗木聚糖酶体系中外切- β -木糖苷酶除去。

表2 粗木聚糖酶超滤前后酶解结果的比较

Table 2 Results of enzymatic hydrolysis with coarse xylanase and the liquid of permeation of ultrafiltration

项目 items	酶解时间/h enzymatic hydrolysis time	糖得率 sugar yield/%			低聚木糖与总糖比值/% ratio of xylo-oligosaccharides to total sugar
		木糖 xylose	低聚木糖 xylo-oligosaccharides	总糖 total sugar	
粗木聚糖酶 coarse xylanases	2	7.06	17.97	25.03	71.79
	4	12.83	12.39	25.22	49.13
	6	14.04	11.78	25.42	44.77
	8	21.33	11.38	32.71	34.79
	10	25.03	11.12	36.15	30.75
超滤透过液 liquid of permeation	2	0	26.83	26.83	100
	4	0	33.42	33.42	100
	6	0	42.80	42.80	100
	8	0	46.11	46.11	100
	10	0	54.22	54.22	100

3 结论

3.1 粗木聚糖酶通过超滤分离可以有效地将外切- β -木糖苷酶除去。实验表明,超滤透过液中没有外切- β -木糖苷酶被检出,内切- β -木聚糖酶酶活的得率较高,达 89.91%。

3.2 实验结果表明,超滤透过液酶解木聚糖 10 h 时,低聚木糖含量达 54.22%,与粗木聚糖酶制备低聚木糖相比,低聚木糖得率提高了 43.10%,木聚糖原料的利用率大幅度提高。

3.3 粗木聚糖酶液中外切- β -木糖苷酶的酶活较低,但外切- β -木糖苷酶对低聚木糖的亲合力较强,具有较强的酶解低聚木糖的能力,从而使得产物中低聚木糖的含量较低,而木糖的含量较高。

参考文献:

- [1]徐勇,余世袁,江华,等. 培养条件对低聚木糖增殖青春双歧杆菌的影响[J]. 林产化学与工业,2001,21(3):34-38.
- [2]洪枫,陈牧,余世袁. 酶的选择性纯化及酶解制备木低聚糖的研究[J]. 林产化学与工业,1999,19(2):49-54.
- [3]洪枫,陈牧,余世袁. 木聚糖酶最适 pH 值的研究[J]. 纤维素科学与技术,2000,8(2):13-17.
- [4]赵林果,余世袁,吴伟志. 多轮定向酶解木聚糖制备木低聚糖的研究[J]. 林产化学与工业,2000,20(3):75-79.
- [5]SADDLER J N. Bioconversion of Forestry and Agricultural Plant Residues[M]. Oxford: CAB International, 1993. 131-182.
- [6]毛连山,徐勇,宋向阳,等. 以酶解渣为碳源制备木聚糖酶的研究[J]. 林产化学与工业,2001,21(4):33-38.
- [7]SCHAGGER H. Tricine sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein the range from 1 to 100 kDa [J]. Anal Biochem, 1987,166(2):368-379.
- [8]毛连山. 木聚糖酶的定向合成及其在纸浆漂白中的应用[D]. 南京:南京林业大学博士学位论文,2002. 19-20.
- [9]毛连山,尤纪雪,勇强,等. 内切木聚糖酶和外切木糖苷酶对纸浆漂白性能的影响[J]. 林产化学与工业,2003, 23(2):7-11.