

氮源对里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶 生物合成的影响*



勇 强, 李树炎, 陈 牧, 徐 勇, 余世袁

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

YONG Q

摘 要: 研究了氮源种类和比例、碳氮比(C/N)等因素对里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶生物合成的影响。在各种氮源中,蛋白胨是最好的氮源。复合氮源中当硫酸铵 N 和尿素 N 的比例为 13 时,木聚糖酶活力最高,达 93.3 IU/mL;当比例为 1:1 时,滤纸酶活力和羧甲基纤维素(CMC)酶活力达到最大值,分别为 0.263 FPIU/mL 和 0.026 IU/mL。当控制培养基的 C/N 为 8.0 和 6.0 时,它们对木聚糖酶和纤维素酶的诱导作用最强,分别为 95.1 IU/mL 和 0.310 FPIU/mL。

关键词: 里氏木霉;木聚糖酶;纤维素酶;生物漂白

中图分类号:Q556; TS745 文献标识码:A 文章编号:0253-2417(2004)03-0007-05

EFFECTS OF NITROGEN SOURCES ON THE BIOSYNTHESIS OF XYLANASE AND CELLULASE BY *TRICHODERMA REESEI*

YONG Qiang, LI Shu-yan, CHEN Mu, XU Yong, YU Shi-yuan

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

Abstract: Effects of nitrogen sources and C/N on the biosynthesis of xylanase and cellulase by *Trichoderma reesei* were investigated. Peptone is the best nitrogen source for xylanase and cellulase production among the nitrogen sources which have been studied. The highest xylanase activity was 93.3 IU/mL, when nitrogen from ammonium sulfate to that from urea was 13, and when this value was changed to 11, the highest filter paper activity and CMCase activity were obtained, which were 0.263 FPIU/mL and 0.026 IU/mL, respectively. The best ratio of C/N for the biosynthesis of xylanase and cellulases was different. It was 8.0 for the former and 6.0 for the latter. In these cases, xylanase activity and cellulase activity were 95.1 IU/mL and 0.310 FPIU/mL, respectively.

Key words: *Trichoderma reesei*; xylanase; cellulase; biobleaching

木聚糖酶是由内切木聚糖酶(EC 3.2.1.8)、外切木聚糖酶(EC 3.2.1.37)和降解支链取代基的辅助酶组成的能将木聚糖降解成单糖的一组酶的总称^[1]。近年来,木聚糖酶在植物纤维原料糖化、低聚木糖生产、生物漂白和生物脱墨领域的应用研究受到了人们的普遍关注^[2]。针对木聚糖酶的不同工业用途,对木聚糖酶酶系结构提出了不同的要求,以木聚糖酶在制浆造纸工业上的应用为例,为了保证纸

* 收稿日期:2003-11-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100142)

作者简介:勇强(1968-),男,江苏宜兴人,副教授,博士,从事植物资源生物转化的研究。

浆的强度和得率,要求木聚糖酶中不含纤维素酶或纤维素酶活力尽量低^[3]。因此不同用途木聚糖酶的定向合成显得十分重要。

因为含有编码纤维素酶和木聚糖酶的基因,里氏木霉(*Trichoderma reesei*)具有合成纤维素酶和木聚糖酶的能力^[4]。尽管里氏木霉的纤维素酶和木聚糖酶的合成受基因调控,而基因是稳定的,但在基因指导下的酶的合成受外界环境的影响是很大的^[5,6]。影响里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶合成的因素还包括碳源、氮源、诱导物、生长因子和培养条件等。作者研究了以木聚糖为碳源用里氏木霉合成木聚糖酶时,氮源对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响,为制备不同用途木聚糖酶提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

里氏木霉(*T. reesei*) Rut C 30, 纤维素酶和木聚糖酶生产菌株,于4℃保存在马铃薯-琼脂斜面培养基上。

1.2 木聚糖

一定量的玉米芯用水抽提,然后用一定浓度的碱液抽提,抽提液经酸中和、离心洗涤、脱盐后可获得一定浓度的木聚糖溶液。

1.3 蛋白胨

蛋白胨,生化试剂(BR),上海化学试剂公司生产。

1.4 培养基

种子扩大培养基采用 Mandels 培养基。产酶基础培养基组成如下(%):木糖 0.1,木聚糖 0.7,磷酸二氢钾 0.2,七水硫酸镁 0.008,二水氯化钙 0.04,七水硫酸亚铁 0.0005,一水硫酸锰 0.00016,七水硫酸锌 0.00014。

1.5 木聚糖酶的合成

50 mL 培养液置于 250 mL 带棉塞的三角瓶中,接种量 10%,于 170 r/min 的恒温振荡器上培养。产酶第 1 天温度控制在(30±1)℃,第 2 天后控制在(28±1)℃。

1.6 分析方法

还原糖测定采用 DNS 法;滤纸酶活力、CMC 酶活力和木聚糖酶活力按国际标准方法测定。

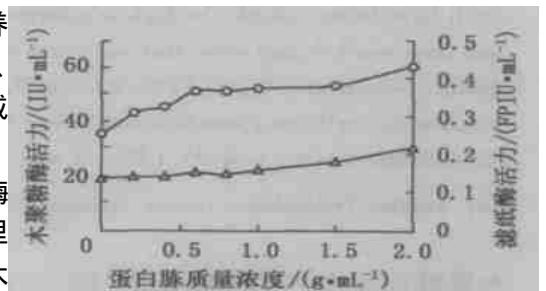
2 结果与讨论

2.1 蛋白胨浓度对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响

里氏木霉在木聚糖质量浓度为 7 g/L 的 Mandels 培养基中产酶,培养基中蛋白胨质量浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 g/L 时对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响如图 1。

里氏木霉在以木聚糖为碳源和诱导物合成木聚糖酶时,也产生少量纤维素酶。可能原因有二:一是木聚糖对里氏木霉合成纤维素酶有一定的诱导作用,二是在自制的木聚糖中,或多或少地存在少量的纤维素或低聚葡萄糖,它们的存在对纤维素酶有诱导作用。

由图 1 可知,里氏木霉在合成木聚糖酶和纤维素酶的过程中,随着培养基中蛋白胨浓度的增加,木聚糖酶活力、滤纸酶活力均不断上升。当蛋白胨质量浓度从 0 上升到 2.0 g/L 时,木聚糖酶活力由 35.5 IU/mL 提高到 60.5



—○—木聚糖酶活力 xylanase activity;

—△—滤纸酶活力 filter paper activity

图 1 蛋白胨浓度对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响

Fig. 1 Effects of peptone concn. on biosynthesis of xylanase and cellulase

IU/mL, 滤纸酶活力由 0.136 FPIU/mL 提高到 0.218 FPIU/mL。这说明蛋白胨对木聚糖酶的合成具

有明显的促进作用, 是产酶的较好氮源。但培养基中蛋白胨浓度越高, 产酶成本越高, 同时, 工业生产中培养基中蛋白胨浓度过高会带来过多的泡沫, 从而对酶的生产带来不利的影响, 所以在培养基中蛋白胨浓度一般不宜过高。

培养基中蛋白胨浓度为 2 g/L 时, 里氏木霉产酶过程中各参数随时间的变化规律见图 2。

从里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶生物合成的历程可以看出, 里氏木霉在产酶过程中, 木聚糖酶活力、纤维素酶活力随着培养时间的延长而提高, 产酶 2 d, 木聚糖酶活力和滤纸酶活力分别达到 60.5 IU/mL 和 0.218 FPIU/mL。但当产酶时间延长到第 3 天后, 木聚糖酶活力有所增加而滤纸酶活力有所降低, 分别为 66.9 IU/mL 和 0.202 FPIU/mL。这是因为在产酶后期, 酶活力大小受到 2 种因素的综合影响, 一方面, 在产酶后期, 当培养基中的营养物质消耗完后, 微生物细胞逐渐死亡自溶, 细胞内物质包括酶蛋白释放到培养液中, 从而引起产酶后期酶活力升高。另一方面, 产酶后期细胞自溶过程中, 随着杂蛋白释放到培养液中引起培养液中氨基氮上升, 导致 pH 值在产酶后期急剧升高, 产酶第 3 天, 培养液 pH 值上升到 7.42, 较高的 pH 值使部分酶失去活性, 从而引起酶活力的下降。从图 2 还可以看出, 与木聚糖酶相比, 纤维素酶对高 pH 值更加敏感。当培养液 pH 值从第 2 天的 5.88 上升到第 3 天的 7.42 时, 上述 2 种因素的综合作用使木聚糖酶活力有所增加而滤纸酶活力反而略有降低。

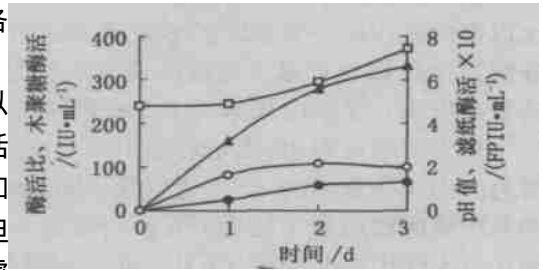
当木聚糖酶用于纸浆漂白时, 要求其中的纤维素酶活力越低越好, 通常用木聚糖酶活力和纤维素酶活力的比值来表示, 木聚糖酶活力和纤维素酶活力比值越大, 说明木聚糖酶中纤维素酶活力相对越少, 木聚糖酶适合于用作纸浆漂白。从图 2 可知, 木聚糖酶活力和纤维素酶活力比值随着产酶时间的延长而不断提高, 产酶第 2 天, 木聚糖酶活力和纤维素酶活力比值从第 1 天的 161.1 提高到 277.5, 说明在里氏木霉木聚糖酶合成过程中, 木聚糖酶合成的速度相对快于纤维素酶合成的速度。产酶第 3 天, 木聚糖酶活力和纤维素酶活力比值提高到 331.2, 除上述原因外, 产酶后期由于细胞自溶和 pH 值急剧升高的综合因素导致木聚糖酶活力升高而纤维素酶活力降低也是引起酶活比升高的主要原因。

2.2 氮源的种类和比例对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响

在木聚糖酶制备过程中, 酶的合成同时受诱导物和酶蛋白前体的调控, 诱导物主要来自于碳源, 而酶蛋白的前体则主要来自于氮源。与碳源一样, 氮源的种类和性质也影响酶的活力和产率。

表 1 是在保持培养基中总氮量不变的前提下, 单一氮源和复合氮源以及复合氮源中不同的氮源比例对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响作用。

由表 1 可以看出, 当培养基中以蛋白胨作为单一氮源时, 木聚糖酶活力优于其它单一氮源和复合氮源。当分别以蛋白胨、硫酸铵和尿素为单一氮源时, 木聚糖酶活力分别为 99.6、59.6 和 47.9 IU/mL。当硫酸铵与



—●—木聚糖酶活 xylanase activity; —▲—酶活比 xylanase/cellulase; —○—滤纸酶活 filter paper activity; —□—pH 值 pH value

图 2 里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶合成过程中各参数随时间变化规律

Fig. 2 Time course of xylanase and cellulase biosynthesis by *T. reesei*

表 1 不同氮源种类和不同比例的木聚糖酶和纤维素酶的合成

Table 1 The xylanase and cellulase biosynthesis in different variety and ratio of nitrogen sources

| 氮源 nitrogen sources | 木聚糖酶活 /(IU·mL ⁻¹) xylanase activity | 滤纸酶活 /(FPIU·mL ⁻¹) filter paper activity | CMC 酶活 /(IU·mL ⁻¹) CMCase activity |
|------------------------|---|--|--|
| 硫酸铵 ammonia sulfate | 59.6 | 0.162 | 0 |
| SNUN ¹⁾ | | | |
| I | 49.0 | 0.209 | 0.016 |
| II | 77.0 | 0.263 | 0.026 |
| III | 93.3 | 0.237 | 0.015 |
| IV | 79.6 | 0.195 | 0.002 |
| 尿素 urea | 47.9 | 0.094 | 0 |
| 蛋白胨 peptone | 99.6 | 0.246 | 0.073 |

1) SN、UN 分别指培养基硫酸铵中总氮和尿素中总氮

尿素按不同比例混合组成复合氮源时,木聚糖酶活力比单一氮源时高,而且木聚糖酶活力与培养基中氮的来源和比例有关,随着培养基中来自硫酸铵的N的比例不断减少和来自尿素的N的比例不断增加,木聚糖酶活力呈现先上升后下降的趋势。当培养基中来自硫酸铵的N和来自尿素的N的比例为13时(即培养基中硫酸铵质量浓度为0.8 g/L,尿素为1.1 g/L时),木聚糖酶活力最高,达93.3 IU/mL;但仍比以蛋白胨作单一氮源时的木聚糖酶活力低。而当培养基中来自硫酸铵的N和来自尿素的N的比例分别为5:1(即培养基中硫酸铵质量浓度为2.6 g/L,尿素为0.24 g/L时)和1:5时(即培养基中硫酸铵质量浓度为0.5 g/L,尿素为1.2 g/L时),木聚糖酶活力分别为49.0和79.6 IU/mL。

从表1还可看出,当培养基中来自硫酸铵的N和来自尿素的N的比例从5:1降低到1:5时,滤纸酶活力和内切葡聚糖酶活力(通常用CMC酶活力表示)均是先上升后下降,当它们的比例为1:1时(即培养基中硫酸铵质量浓度为1.6 g/L,尿素为0.72 g/L),两者达到最大值,滤纸酶活力和CMC酶活力分别为0.263 FPIU/mL和0.026 IU/mL。这说明不同比例氮源浓度对纤维素酶活力和CMC酶活力的影响作用是一致的,这与内切葡聚糖酶是纤维素酶系中的一个组分的结论相一致。

在各种氮源中,蛋白胨对纤维素酶、内切葡聚糖酶的诱导作用最强,当培养基中蛋白胨为单一氮源时,滤纸酶活力和CMC酶活力分别为0.246 FPIU/mL和0.073 IU/mL。当采用硫酸铵或尿素作单一氮源时,CMC酶活力很低或检测不到,而采用复合氮源时却能够产生内切葡萄糖酶,说明氮源对内切葡聚糖酶的合成有较大的诱导作用。

2.3 碳氮比对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响

微生物的生长和产物的合成除了与碳源和氮源的种类有关外,还与它们的比例有关。碳氮比(C/N)是影响微生物酶合成的一个重要因素。微生物酶的合成一般都有一个较适碳氮比范围,采用适宜的碳氮比是提高酶活力和酶产率的关键技术之一。

以木聚糖为碳源,通过改变氮源中硫酸铵和尿素的量但不改变培养基中硫酸铵和尿素的比例,进行了不同碳氮比对木聚糖酶和纤维素酶合成影响的研究。碳氮比对里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶的影响作用见表2。

从表2看出,随着碳氮比的增加,木聚糖酶活力先上升后下降。当碳氮比从2.0上升到8.0时,木聚糖酶活力由60.5 IU/mL提高到95.1 IU/mL,进一步提高碳氮比时,木聚糖酶活力下降,这说明木聚糖酶的合成存在一个较合适的碳氮比范围。以木聚糖为碳源,里氏木霉合成木聚糖酶的最适碳氮比为8.0左右。过高或过低的碳氮比均不利于木聚糖酶的合成。

表2 碳氮比对木聚糖酶和纤维素酶合成的影响

Table 2 Effects of C/N ratio to xylanase and cellulase preparation

| C/N | 木聚糖酶活 /(IU _{mL} ⁻¹) xylanase activity | CMC酶活 /(IU _{mL} ⁻¹) CMCase activity | 滤纸酶活 /(FPIU _{mL} ⁻¹) filter paper activity | 酶活比 xylanase /cellulase |
|------|--|--|---|-------------------------------|
| 2.0 | 60.5 | 0.247 | 0.235 | 257.4 |
| 4.0 | 85.2 | 0.243 | 0.265 | |
| 5.0 | 76.6 | 0.270 | 0.269 | 284.8 |
| 6.0 | 88.8 | 0.271 | 0.310 | 286.5 |
| 8.0 | 95.1 | 0.258 | 0.303 | 313.9 |
| 10.0 | 71.0 | 0.217 | 0.235 | 302.1 |

与木聚糖酶合成一样,里氏木霉合成

纤维素酶时也存在一个最适碳氮比问题。由表2可知,随着碳氮比的变化,滤纸酶活力和CMC酶活力的变化趋势是一致的,当碳氮比为6.0时,滤纸酶活力和CMC酶活力均达到最大值,分别为0.310 FPIU/mL和0.271 IU/mL,高于或低于此值均不利于纤维素酶的合成。

从表2还可以看出,随着碳氮比的增大,木聚糖酶活和滤纸酶活的比值先增大后减小。当碳氮比从2.0上升到8.0时,酶活比由257.4上升到313.9;但当碳氮比由8.0增大到10.0时,酶活比由313.9减小到302.1。因此,当以制备漂白用木聚糖酶为目的时,碳氮比以8.0为宜。

3 结论

3.1 蛋白胨对里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶具有明显的促进作用。当Mandels培养基中蛋白胨浓度为2.0 g/L时,木聚糖酶活力和滤纸酶活力分别为60.5 IU/mL和0.218 FPIU/mL。

3.2 里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶过程中, 纤维素酶比木聚糖酶对终点 pH 值敏感, 较高的终点 pH 值有利于提高酶活比, 从而适合于纸浆漂白。当产酶终点 pH 值为 7.42 时, 酶活比达到 331.2。

3.3 当培养基中硫酸铵 N 和尿素 N 的比例为 13 时, 木聚糖酶活力最高, 达 93.3 IU/mL; 当比例为 11 时, 滤纸酶活力和 CMC 酶活力均达到最大值, 分别为 0.263 FPIU/mL 和 0.026 IU/mL。

3.4 里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶的最适碳氮比不一样, 分别为 8.0 和 6.0, 相应的木聚糖酶活力和纤维素酶活力分别为 95.1 IU/mL 和 0.310 FPIU/mL。当以制备适宜于纸浆漂白的木聚糖酶时, 碳氮比以 8.0 最佳, 此时酶活比为 313.9。

参考文献:

- [1] CHRISTOV L P, PRIOR B A. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties, and significance[J]. Enzyme Microbial Technol, 1993, 15(6): 460-475.
- [2] 勇 强. 植物纤维资源的高效生物利用[J]. 林业科技开发, 2002, 16(3): 6-8.
- [3] BAJPAI P. Application of enzyme in the pulp and paper industry[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(2): 147-157.
- [4] ROYER J C, NAKES J P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*[J]. Enzyme Microbial Technol, 1989, 11(7): 405-410.
- [5] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992. 34-63.
- [6] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257-268.

大型精密仪器 准确分析结果

林化所仪器分析中心

中国林业科学研究院林产化学工业研究所重点实验室仪器分析中心拥有如下大型精密仪器及装置, 可对林化产品及其它化工产品的结构、性质进行定性、定量分析。

- 美国 Nicolet 气相色谱-傅立叶红外联用仪
- 美国 Agilent 气相色谱-质谱联用仪
- 美国 P-E 公司 AA300 原子吸收光谱仪
- 英国 Malvern 公司 Mastersizer 2000 激光粒度仪
- 日本 Shimadzu LG-10AD 液相色谱仪
- 日本 Rigaku TAS100 热重、差热分析仪
- 超临界 CO₂ 萃取装置

法定检验机构 第三方公正评价

国家林业局林化产品质量监督检验站

挂靠在中国林业科学研究院林产化学工业研究所的国家林业局林化产品质量监督检验站, 是国家林业局授权的法定检验机构, 具有第三方公正地位。可对如下产品进行质量监督和产品质量检验。

- 脂松香及再加工产品
- 松节油及再加工产品
- 栲胶原料、栲胶产品
- 单宁酸原料、工业单宁酸、工业没食子酸、络合剂等
- 活性炭产品
- 其它归口的林化产品

欢迎来人来函联系产品分析和产品质量检验

联系地址: 210042 南京市锁金五村 16 号林化所内

联系人: 张新民, 朱水兰, 黄海涛

电话: 025-85482448, 85482449 传真: 025-85413445

E-mail: zhangxinmin328@163.com

账号: 工商行南京板仓分理处 4301012509001028549 中国林业科学研究院林产化学工业研究所