

用于生产低聚木糖的木聚糖酶菌株筛选^{*}

A Screening of Xylanase Producing Strains for Xylooligosaccharide Production

蔡爱华¹ 何成新¹ 曾健智¹ 张厚瑞^{1* * *} 徐庆²
Cai Aihua¹ He Chengxin¹ Zeng Jianzhi¹ Zhang Hounui¹ Xu Qing²

(1. 广西植物研究所 桂林市雁山 541006; 2. 桂林医学院药理学系 桂林市乐群路 541002)

(1. Guangxi Institute of Botany, Yanshan, Guilin, Guangxi, 541006, China;

2. The Phamnic Dept. of Guilin Medicine College, Lequnlu, Guilin, Guangxi, 541002, China)

摘要 比较分别属于木霉属 (*Trichoderma*)、毛壳属 (*Chaetomium*)、黑曲霉属 (*Aspergillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的 12 个菌株的木聚糖酶活性, 以蔗渣木聚糖为底物, 分析不同菌株木聚糖酶水解产物中的糖类组成, 考察木聚糖酶系的稳定性。结果表明, 毛壳属菌株所产木聚糖酶的水解产物中, 低聚木糖的比例普遍高于其它类型菌株, 其中球毛壳 AS3.3601 不仅木聚糖酶的活性较高, 而且酶系稳定性最好, 水解液中木二糖、木三糖占总糖含量的 76% 以上。球毛壳 AS3.3601 的发酵液按最大剂量 0.4ml/10g 给小鼠灌胃, 每天 1 次, 连续 7d, 所有受试小鼠均无中毒反应, 初步认为球毛壳 AS3.3601 对于口服是安全的。

关键词 低聚木糖 木聚糖酶 菌株 筛选

中图分类号 Q949.32; TS201.3

Abstract The xylanase activity of 12 different strains belonging to *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Aspergillus* and *Bacillus* were contrasted. Using the xylan of sugar cane bagasse as substrate, the carbohydrate components in the hydrolysis solution of xylanases from different strains were analysed and the steadiness of xylanases from some strains were also evaluated. The results showed that the enzymatic products by the xylanase from the strains of *Chaetomium* contained commonly much more xylooligosaccharides than those from the others. The best performance happened in *Chaetomium globosum* AS3.3601, which produced both the high activity xylanase and good steadiness of enzymatic systems, further more, the amount of xylobiose and xylotriose occupied at least 76 percent of the total sugar in its enzymatic products. Force feeding the mice with broth of *Chaetomium globosum* AS3.3601 once per day at the maximum amount of 0.4ml/10g lasted for 7 days. At the end, none of the treated mice was poisoned. Therefore we can tentatively regard *Chaetomium globosum* AS3.3601 as safe strain for orally taking.

Key words xylooligosaccharide, xylanase, strain, screening

低聚木糖是最近发展起来的一种功能性食品添加剂, 除具有功能性低聚糖的一般特性外, 与其它功能性低聚糖相比, 还具有有效用量小、耐热、耐酸等特点^[1]。此外, 低聚木糖在人消化系统中不具消化性, 并且比其它低聚糖更能有效地抑制肠道内双糖酶的活性, 延缓糖类水解, 更加有效地控制糖尿病人的血

糖水平^[2]。因此, 低聚木糖成为国内外竞相研究开发的功能性低聚糖之一。

低聚木糖采用酶法水解木聚糖制得, 主要活性成分包括木二糖及木三糖, 副产物木糖单糖不具有低聚木糖那样的生理活性^[3]。对于工业化生产而言, 酶水解木聚糖后能生成较高比例的低聚木糖是十分重要的, 因为含木聚糖的原料资源虽然丰富, 但木聚糖的提取成本并不低廉。木聚糖水解酶类主要包括内切木聚糖酶与外切木聚糖酶^[4]。内切木聚糖酶, 或称 β -木聚糖酶 (EC3.2.1.8), 其作用是切开木聚糖主链, 降低基质的聚合度^[4]。在内切木聚糖酶作用的前期, 所

2004-09-13 收稿。

* 广西青年科学基金 (NO. 0007010) 与广西创新能力建设基金 (No. 033015-1B) 资助项目。

* * 通讯作者, E-mail: zhhr@gl.gx.cninfo.net

形成的主要产物是聚合度较大的低聚木糖,随着水解的深入最后生成木二糖、木三糖,但一般不会生成木糖单糖。外切木聚糖酶,或称 β -木糖甙酶(EC3.2.1.37),其主要水解短链的低聚木糖或木二糖,并从非还原性末端释放出木糖单糖,木二糖是此酶的最好底物^[4]。对于不同微生物菌株所分泌的木聚糖酶,其中的内切木聚糖酶与外切木聚糖酶的活性存在很大差异,因而不同来源的木聚糖酶作用于同样的木聚糖底物,产物中的木糖与低聚木糖相对含量也存在很大区别。因此,筛选获得能生成高比例低聚木糖的产酶微生物,对于低聚木糖工业化生产而言是十分重要的。

本研究收集 12 个产木聚糖酶微生物菌株,考察这些菌株产木聚糖酶的活性,并以蔗渣木聚糖为底物比较它们生成低聚木糖的能力,同时研究部分菌株木聚糖酶系的稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌种

本试验使用的 12 个菌株,分别属于木霉属(*Trichoderma*)、毛壳属(*Chaetomium*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),PDA 培养基斜面置于冰箱中保存。

1.2 材料

木二糖、木三糖标准样品购自日本国和光纯药株式会社(Wako Pure Chemical Industries. L. t. d)。木糖、阿拉伯糖标准样品购自美国 Sigma 公司,葡萄糖、甲醇为国产分析纯,其它试剂为国产化学纯,蔗渣木聚糖制备方法同文献[4],其纯度为 80%左右。

1.3 种子培养

PDA 液体培养基,121℃灭菌 15 min,250 ml 三角瓶装 25 ml 液体培养基,取一小块试管斜面培养物接种,28℃,200 r/min 摇床培养 48 h。

1.4 酶液制备

培养基:麦麸 2 g/100ml,蔗渣 0.5 g/100ml,酵母膏 1 g/100 ml, KH₂PO₄ 0.5 g/100 ml, KClO₄ 0.5 g/100 ml, NH₄NO₃ 0.5 g/100 ml, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/100 ml;培养基中另加少许蔗渣木聚糖,自然 pH 值。250 ml 三角瓶装量 30 ml,接 1 ml 种子菌液,28℃,200 r/min 摇床培养 4 d。摇瓶培养终止后,立即离心除去沉淀,上清液即为酶液。

1.5 酶活性检测

木聚糖酶活性检测采用染料法^[5]。15mg 气巴兰着色蔗渣木聚糖加入酶液 5ml,45℃水解 15min,立即置入沸水中灭活 10min,离心除去不溶物,上清液用

721 分光光度计在 620nm 处测定吸光值。用空白酶液作对照。

气巴兰着色蔗渣木聚糖经酶水解后释放出的染料吸光值(A₆₂₀)与用同一浓度酶液水解蔗渣木聚糖所释放出的还原糖(以木糖为标准)含量存在下述关系^[5]:

$$\text{还原糖}(\text{mg/ml})=1.1812 \times A_{620} + 0.0805.$$

所以,本研究直接以气巴兰着色蔗渣木聚糖水解释放出的染料吸光值(A₆₂₀)表示木聚糖酶的相对活性。

1.6 水解液成分的定量分析

蔗渣木聚糖经过量的木聚糖酶,在 45℃、pH 值 5.5 的条件下,24h 充分水解后,离心,上清液加入等体积甲醇,离心除去沉淀,得待测样品。HPLC 检测条件为:Waters510 泵、410 示差折光检测器、U6k 手动进样器、810 色谱工作站,4.6×mmHypersilNH₂ 柱,35℃柱温,流动相,乙腈:水=80:20,流速 1ml/min。

1.7 毒性实验

以球毛壳 AS3.3601 摇床培养发酵 4d,离心除去菌体的发酵液作为试液。动物为昆明种小鼠,体重(22±2)g,雌雄兼用,由广西医科大学动物室提供。取小鼠 10 只,禁食 12h,不禁水,按最大剂量 0.4ml/10g(即相当于发酵液 40ml/kg)一次性灌胃。每天灌胃 1 次,连续 7d,记录小鼠毒性反应情况。

2 结果与分析

2.1 不同菌株的木聚糖酶活性

比较不同菌株发酵液中木聚糖酶活性(表 1)的结果表明,木霉属各菌株产木聚糖酶活力普遍较高,其次为黑曲霉。毛壳菌木聚糖酶活力相对较低,一般只能达到木霉菌产木聚糖酶活性的 50%~60%。本试验中,枯草芽胞杆菌的木聚糖酶活性最弱,不足木霉菌产木聚糖酶活力的 1/6。

2.2 不同菌株产木聚糖酶的水解物组成

自行分离的蔗渣木聚糖经过量的木聚糖酶充分水解后,分析产物中糖类的组成(表 2)可以发现,木霉、黑曲霉产木聚糖酶的酶活性虽然高,其水解物却以木糖单糖为主;在毛壳属的菌株中,除小头毛壳 AS3.3593 的酶解产物以木糖单糖为主要成分之外,毛壳属的其它菌株产的木聚糖酶的水解产物中均含有大量的低聚木糖。此外,枯草芽胞杆菌 IFFI10090 的酶解产物中也有较多的低聚木糖。

2.3 菌株产木聚糖酶系的稳定性

对木聚糖酶活力相对较高,并能生成较多低聚木糖的毛壳属 5 个菌株,进行 3 个批次的重复培养。比

表 1 不同菌株产木聚糖酶的活性比较

Table 1 The activity contrast of xylanase fermented by different strains

菌株 Strains	来源与编号 Resource and serial number	木聚糖酶相对活性 Relatively activity of xylanase(A ₆₂₀)
球毛壳 <i>Chaetomium globosum</i>	AS3. 749	0.578
	AS3. 1054	0.788
	AS3. 3601	0.432
	AS3. 4254	0.888
长刺毛壳 <i>Chaetomium dolichotrichum</i>	AS3. 3609	0.421
小头毛壳 <i>Chaetomium murorum</i>	AS3. 3593	0.758
反曲毛壳 <i>Chaetomium reflexum</i>	AS3. 3602	0.416
绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	AS3. 3711	1.234
	AS3. 4004	1.245
木霉 <i>Trichoderma</i> sp.	AS3. 4265	1.453
	IFF110090	0.201
枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	IFF110090	0.201
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	AS3. 4309	1.112

表 2 不同来源木聚糖酶水解液中的糖类组成

Table 2 The carbohydrate component in the hydrolysate solutions of different xylanase

来源与编号 Resources and serial number	水解液中的糖类组成 The carbohydrate component in the hydrolysate solutions(mg/g xylan)					总低聚木糖 Total xylooligosaccharide (%)
	木糖 Xylose	木二糖 Xylobiose	木三糖 Xylobiose	阿拉伯糖 Arabinose	葡萄糖 Glucose	
AS3. 749	131.7	297.6	204.3	75.1	46.5	65.8
AS3. 1054	181.5	201.3	251.6	79.2	48.3	60.0
AS3. 3601	55.6	326.3	256.2	71.3	48.5	76.9
AS3. 4254	285.7	201.3	185.3	74.5	42.8	49.0
AS3. 3609	152.4	204.8	204.9	68.7	57.3	58.5
AS3. 3593	498.5	105.6	—	69.3	45.8	14.7
AS3. 3602	104.5	298.7	254.3	68.4	38.6	72.3
AS3. 3711	604.5	65.3	—	74.3	47.5	8.3
AS3. 4004	608.7	84.2	—	56.3	46.8	10.6
AS3. 4265	593.3	101.8	—	80.7	48.3	12.3
IFF110090	101.2	212.8	286.8	70.2	57.2	68.6
AS3. 4309	665.3	21.2	—	76.9	64.3	2.6

“—”表示未检测到。“—”stand for none

较不同批次木聚糖酶水解的结果表明,5个毛壳菌株不同批次的酶液,充分水解底物后都能生成含量相近的葡萄糖与阿拉伯糖(表3)。木聚糖是一种非均一聚糖,除主链由木糖聚合而成外,通常还含有以葡萄糖残基、阿拉伯糖残基为主的支链^[9]。参试菌株所有批次的酶液作用于蔗渣木聚糖之后,水解生成的葡萄糖及阿拉伯糖的含量相近,说明这些菌株的木聚糖酶具有良好的脱支活性^[7]。因此,蔗渣木聚糖侧链存在的葡萄糖残基与阿拉伯糖残基,并不影响木聚糖酶对

主链水解的进行。

比较不同批次酶液水解产物中低聚糖含量的变化(表3)可以发现,有4个菌株(AS3. 749, AS3. 1054, AS3. 3602, AS3. 3609)对环境因素变化颇为敏感,对于其不同批次的酶液,水解物中低聚糖含量有很大的变化。例如 AS3. 3602, 3个批次酶液的水解物,其低聚木糖含量差异几乎达到3倍。杨瑞金等^[7]也曾发现,某些微生物菌株在不同培养条件下获得的木聚糖酶水解物中低聚木糖含量很不稳定。显然,此类木聚糖酶系对环境因素敏感的菌株,并不能很好地满足低聚木糖的生产要求,因为环境影响的因素很多,并难以精确控制。

菌株 AS3. 3601 木聚糖酶的水解结果显然令人满意,在其3个批次酶液的水解物当中,低聚木糖的含量都在76%左右(表3),表现出低聚木糖含量高而稳定的特点。显然,菌株 AS3. 3601 的这一特点对于低聚木糖生产十分有利。

表 3 不同批次培养的木聚糖酶水解物中糖类组成的变化

Table 3 The changes of carbohydrate s component in the hydrolysate solutions of different xylanase group

菌株 Strains	批号 Group	水解物中糖类组成 The carbohydrate component in the hydrolysate solutions(mg/g xylan)					总低聚木糖 Total xylooligosaccharide (%)
		木糖 Xylose	木二糖 Xylobiose	木三糖 Xylobiose	阿拉伯糖 Arabinose	葡萄糖 Glucose	
AS3. 749	1	314.5	321.3	—	78.3	54.2	41.8
	2	213.3	203.5	218.3	76.5	58.1	54.8
	3	406.7	114.3	85.6	75.3	57.2	27.5
AS3. 1054	1	308.5	116.4	126.3	68.1	58.3	35.5
	2	183.6	214.2	206.3	74.5	56.1	57.2
	3	284.7	201.3	105.1	73.2	54.6	42.6
AS3. 3601	1	55.3	334.7	257.2	78.9	53.7	76.8
	2	57.2	364.3	234.6	76.1	53.4	76.2
	3	58.4	342.5	253.4	75.5	54.6	76.0
AS3. 3602	1	301.3	121.2	146.3	70.2	58.3	38.2
	2	405.2	151.6	—	68.9	54.6	22.8
	3	163.2	238.3	214.2	74.6	57.1	60.5
AS3. 3609	1	365.3	206.2	—	70.8	56.3	29.4
	2	158.3	242.2	231.4	76.3	58.1	61.8
	3	401.1	158.7	—	69.2	57.1	23.0

“—”表示未检测到。“—”Stand for none.

2.4 毒性实验

将菌株 AS3. 3601 的发酵液按 40ml/kg 的最大剂量,连续灌喂小鼠 7d,所有受试鼠均未表现出中毒反应(表4)。可以初步确定,菌株 AS3. 3601 的发酵液对于口服是比较安全性的。

表 4 AS3 3601 菌株发酵液的毒性反应

Table 4 The toxicity react of AS3 3601 strain' broth

器官系统 Organic system	检查方法 Method	毒性表现 Toxicity symptom
中枢和运动	行为 Behavior	无异常叫声,躁动不安 Have not unusually cry, restless and uneasy.
神经系统 Nervous system of centre and sport	对刺激反应 Amazing response	无烦躁易怒或抑制状态 Calmly
	异常运动 Unusually moven	无抽搐、麻痹、强迫动作 No tic, paralysis and force acting
植物神经系统 Automatic nervous system	神经反射 The nerve reflecting	无迟钝、丧失 Not reflect slowly or lose reflect ability
	瞳孔 Pupil	不缩小或放大 No change
呼吸系统 Respiratory system	分泌物 Secretion	不流涎或流泪 Not slobber and tear
	鼻 Nose	无分泌物 No secretion
消化系统 Digestive system	呼吸及其频率 Breathe and frequency	无阵式呼吸, Kussmaul 呼吸 No intermitten breath and Kussmaul breath
	大便 Stool	无腹泻、便秘 No diarrhea and constipation
皮肤和毛 Skin and hair	颜色及其完整性 Color and integrity	无充血、竖毛或发疹 No congestion, hair up and rash

3 小结

在本研究筛选的分别属于 4 个属的 12 个产木聚糖酶微生物菌株当中,以木霉、黑曲霉的木聚糖酶活性较高,但其水解物均以木糖单糖为主,它们在低聚木糖生产中没有应用价值。

毛壳属菌株的木聚糖酶活性低于木霉、黑曲霉,但明显高于枯草芽胞杆菌。本属的参试菌株均能生成一定量的低聚木糖,但只有球毛壳 AS3. 3601 的木

聚酶才表现出活性较高而稳定性好的特点。用球毛壳 AS3. 3601 3 个批次木聚糖酶液水解蔗渣木聚糖,各批产物中的木二糖、木三糖含量均占总糖的 76% 左右。

本次的急性毒性实验证明,球毛壳霉菌的发酵液未经任何纯化处理,对于动物口服也具有很高的安全性,符合食品卫生安全要求。球毛壳霉菌是粮食中一类常见的真菌,并未见有毛壳霉菌在食品中产生毒素和引起人中毒的报道^[8]。国外在经过大量的研究之后,实际用于低聚木糖商品化生产的产酶微生物也是球毛壳霉菌^[9]。

综上所述,从酶解产物的组成,木聚糖酶的稳定性,以及从食品卫生安全性的角度考虑,球毛壳 AS3. 3601 在低聚木糖制备中的应用价值值得重视。不过,这一菌株木聚糖酶活性仍属较低的水平,寻找能大幅度提高这一菌株木聚糖酶活性水平的途径,是其应用于低聚木糖生产之前必须解决的问题。

参考文献

- 1 郑建仙, 联立萍. 功能性低聚糖析论. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 3946.
- 2 GilJae, InKoo Rhee, Sung-Ok Kim, et al. FSTA. Food Science and Technology Abstracts 1999, 31(4): 436.
- 3 许正宏, 熊筱晶, 陶文沂. 低聚木糖的生产及应用研究进展. 食品与发酵工业, 2002, 28(1): 5659.
- 4 Sunna A, Antrani K G. Xylanolytic engymes from fungi and bacteria. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(1): 3967.
- 5 何成新, 张厚瑞, 曾健智, 等. 气巴蓝着色蔗渣木聚糖检测木聚糖酶活性. 微生物学通报, 2003, 30(1): 4548.
- 6 杨瑞金, 许时婴, 王 璋. 碱法提取木聚糖的酶法水解. 食品工业科技, 2001, 22(1): 1518.
- 7 谭仁祥编. 植物成分分析. 北京: 科学出版社, 2002. 537.
- 8 孟昭赫, 张国柱, 宋楚菊. 真菌毒素研究进展. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- 9 许正宏, 熊筱晶, 陶文沂. 低聚木糖的生产及应用研究进展. 食品与发酵工业, 2002, 28(1): 5659.

(责任编辑: 邓大玉 韦廷宗)

DNA 对紫外线的坚韧性

在地球上具有保护作用的氧气在大气层中积累了足够多之前, DNA 必须对紫外线引起的结构性破坏有极强的抵抗力, 才能在强烈的太阳辐射下的古老地球上存活。但是, 研究人员在研究这种坚韧性上一直面临一些困难, 因为 DNA 的结构是如此之复杂。

德国和波兰的研究人员用一种“2AP 簇”的分子作为 DNA 碱基对的模型进行初步研究发现, 按碱基对的方式排列的 DNA 分子在 65 沙秒内耗散了紫外线激发的能量, 比分子以不按碱基对的方式排列时快 20 倍。

德国和荷兰科学家展示了 DNA 如何得到一个修补紫外线引起损伤的酶的帮助。这种损伤通常是所谓的“CPD 损害”形式。在许多生物体中, DNA 光解酶能够用蓝光作为能源修补这些损害。为了更好地了解这个酶的作用, 研究人员用 1.8 埃的精度, 确定了与一个带有类似 CPD 损害的 DNA 分子结合的光解酶的结构, 结果发现了一个与酶活性点的胸腺嘧啶二聚体的中间反应。

据《科学时报》