

# 培养条件对毛栓菌木聚糖酶分泌的影响

柏玉洁, 朱启忠, 王 旭, 任延刚

(山东大学 威海分校海洋学院 山东 威海 264209)

**摘 要:** 研究了碳源、氮源、接种量、培养温度等培养条件对木聚糖酶分泌的影响; 结果表明: 麸皮作碳源、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作氮源有利于木聚糖酶的分泌, 接种量、培养温度、装液量、对木聚糖酶的分泌有较大影响。

**关键词:** 碳源; 氮源; 培养条件; 木聚糖酶; 毛栓菌

中图分类号: S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)07-0228-03

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性多糖, 约占细胞干重的 15% ~ 30%, 为自然界第二大可再生性资源<sup>[1]</sup>。木聚糖酶是半纤维素酶的一种, 是一种能降解木聚糖的复合酶。木聚糖酶在饲料资源开发和提高廉价副产品的利用率方面, 具有广阔的前景; 在造纸和纸浆工业中, 木聚糖酶的重要性在于其取代了有毒的化学物质, 同时通过酶法预处理可以回收该行业中有用的副产物; 木聚糖的水解产物(木糖和低聚木糖)可应用在食品行业, 比如作为增稠剂、脂肪替代物或抗冷冻食品添加剂; 此外木聚糖酶在制药工业、焙烤工业、酿酒行业中也有重要应用<sup>[2]</sup>。

毛栓菌是具有较强的木聚糖分解能力的白腐菌, 其降解木聚糖的能力主要取决于木聚糖酶活力的高低, 所以研究其分泌情况和活力具有重要的意义。已有的研究报道<sup>[3-5]</sup>多集中在对毛栓菌漆酶的分离、纯化和应用方面<sup>[6]</sup>, 但未见木聚糖酶研究方面的报道。该研究对毛栓菌产木聚糖酶的条件进行了探讨, 得到的结论可为饲料和造纸行业作为参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 毛栓菌(*Trametes troglit*)由山东威海玛珈山采集、分离、纯化而得, 经测定具有较强的木聚糖酶活性。

1.1.2 培养基 固体及斜面培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 马铃薯 200, 葡萄糖 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4$  1.5,  $\text{VB}_1$  0.01, 琼脂 20。氮源实验用培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 马铃薯 200, 葡萄糖 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4$  1.5,  $\text{VB}_1$  0.01, 在上述培养基中分别加入尿素、硫酸铵、硝酸铵、蛋白胨、玉米面、酵母膏、牛肉

膏、干酪素、硝酸钠、豆面 5 g 作氮源。碳源试验用培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 马铃薯 200,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4$  1.5,  $\text{VB}_1$  0.01,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5, 在上述培养基中分别加入蔗糖、壳聚糖、纤维素、淀粉、甘露醇、葡萄糖、麸皮、丙三醇 20 g 作碳源。其它试验均在综合马铃薯培养基[马铃薯 200, 葡萄糖 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4$  1.5,  $\text{VB}_1$  0.01,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5]的基础上进行。

### 1.2 试剂

1.2.1 底物 1% 1 g 木聚糖(sigma)加入柠檬酸钠缓冲液磁力搅拌过夜, 定容至 100 mL。

1.2.2 DNS 试剂 取酒石酸钾钠 182 g 溶于 500 mL 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 6.3 g, NaOH 21 g, 苯酚 5 g, 亚硫酸钠 5 g, 搅拌溶解, 冷却后定容至 1 000 mL, 贮于棕色瓶, 2 周后方可使用。

### 1.3 仪器

722E 型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

### 1.4 方法

1.4.1 菌丝体的培养 250 mL 锥形瓶中分别装入各试验用的培养基 50 mL, 接入 28℃培养 3 d 的平板菌种 3 片(用无菌打孔器打成直径 10 mm 的菌片), 130/min, 28℃恒温震荡培养 5 d, 每培养 3 个重复。

1.4.2 粗酶液的制备 培养 5 d 后的菌液, 取样 4 000 rpm 离心, 上清液即为粗酶液。

1.4.3 酶活力测定 取底物 1 mL 于管中, 据酶活大小加适量的粗酶液(要求最终测酶活时 OD 值在 0.2 ~ 0.8 之间), 补加柠檬酸钠缓冲液至 2 mL, 50℃水浴反应 30 min, 加 3 mL DNS 混匀, 沸水浴 7 min, 取出冷却后加水至 25 mL, 在 540 nm 处测 OD 值<sup>[7]</sup>。以每分钟 1 mL 粗酶液与木聚糖反应产生木糖的浓度( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )作为一个酶活单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳、氮源对菌丝体生长和木聚糖酶分泌的影响

第一作者简介: 柏玉洁(1987-), 女, 山东滨州人, 本科在读, 从事酶工程学研究。E-mail: baiyujie876@163.com。

通讯作者: 朱启忠。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

基金项目: 山东大学威海分校科研立项资助项目(A07047)。

收稿日期: 2008-02-14

2.1.1 碳源对菌丝体生长的影响 在液体培养基中加入不同的碳源,培养5 d后,称菌丝湿重,结果见表1。由表1可以看出,以壳聚糖和淀粉为碳源时菌丝生长最快,以纤维素和葡萄糖为碳源菌丝体生长最慢,就菌丝生长而言,壳聚糖和淀粉为最佳碳源。

2.1.2 氮源对菌丝体生长的影响 在液体培养基中加入不同的氮源,培养5 d后,称菌丝湿重,结果见表2。由表2可以看出,以蛋白胨和豆面为氮源时菌丝生长最快,以(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>和尿素为氮源时菌丝体生长最慢,所以就菌丝生长而言,蛋白胨和豆面是最佳氮源。

表 1 碳源对菌丝体生长及木聚糖酶分泌的影响

碳素	菌丝体湿重/g	木聚糖酶活力/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$
葡萄糖	0.536	3.948
麸皮	1.727	7.197
淀粉	2.738	1.031
壳聚糖	3.883	0.681
纤维素	0.199	3.049
甘露醇	1.324	0.760
蔗糖	0.615	4.078
丙三醇	1.209	0.590

2.1.3 碳源对木聚糖酶分泌的影响 由表1可以看出,麸皮作为碳源时木聚糖酶的分泌活性很高,麸皮中蛋白含量很高,蔗糖和葡萄糖为碳源也有利于酶的分泌。由表1可发现,菌丝体的生长量和酶类的分泌不成正相关,壳聚糖和淀粉作碳源虽能促进菌丝体的生长,但不能促进酶的分泌,蔗糖和葡萄糖作碳源菌丝生长量低但具有较高的酶活性。以醇类作碳源菌丝生长量和酶活性都较低。

2.1.4 氮源对漆酶分泌的影响 由表2可以看出,在该试验条件下,以(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>为氮源有利于木聚糖酶的分

泌,尿素也是很好的氮源。菌丝体的生长量和酶的分泌也不成正相关。综上所述,可以给出最佳的产酶培养基配方( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):马铃薯 200, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3, MgSO<sub>4</sub> 1.5, VB<sub>1</sub> 0.01, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5, 麸皮 20。酶活可达  $9.036 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 2 氮源对菌丝体生长及木聚糖酶分泌的影响

氮素	菌丝体湿重/g	木聚糖酶活力/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$
酵母膏	3.662	0.165
豆面	4.333	0.228
蛋白胨	5.127	0.173
尿素	0.082	6.284
干酪素	2.355	0.208
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.073	9.036
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.143	0.245
NaNO <sub>3</sub>	2.205	0.228
玉米面	3.556	0.213
牛肉膏	3.617	0.165

2.2 环境条件对木聚糖酶分泌的影响

2.2.1 接种量对木聚糖酶分泌的影响 液体培养基中分别接种菌片1、2、3、4、5、6片(用无菌打孔器打成直径10 mm的菌片)<sup>[8]</sup>,其酶活分别为7.274、7.491、7.732、10.122、5.729、5.657  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可见接种量对木聚糖酶的分泌有较大影响。一般随着接种量的增大分泌也增多,很快到达峰值,但接种量过大也会抑制木聚糖酶的分泌。如采用固体菌片接种,50 mL培养液接直径10 mm的菌片4片为宜(如图1)。

2.2.2 液体培养温度对木聚糖酶分泌的影响 分别在20℃、25℃、28℃、33℃、35℃的温度下培养,测得的酶活是1.255、2.354、6.377、1.167、1.149  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可见在28℃时酶活最高,过高或过低都会影响木聚糖酶的分泌(如图2)。

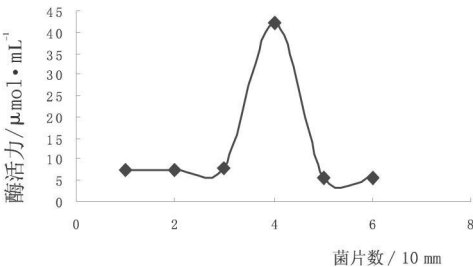


图 1 接种量对木聚糖酶分泌的影响

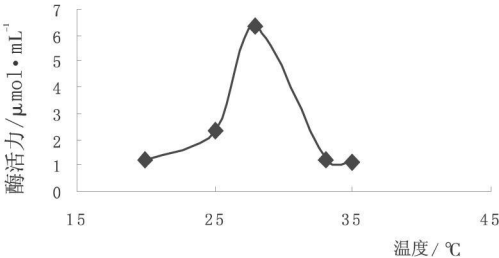


图 2 温度对木聚糖酶分泌的影响

2.2.3 装液量对木聚糖酶分泌的影响 在250 mL锥形瓶中加入1/3、1/4、1/5、1/6、1/7的液体的培养基,其酶活分别是4.547、4.788、5.247、5.053、4.908  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可见当装液量是50 mL时酶分泌最多,装液量过多或过少都会影响木聚糖酶的分泌(如图3)。

现仅对碳源、氮源、接种量、培养温度及装液量对木

聚糖酶分泌的影响进行了研究分析,结果表明,使用麸皮作碳源、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>作氮源、接种4片菌片、装液量1/5、在28℃下培养木聚糖酶的活性最大。有关其它因素的影响的研究仍在进行中。仅用马铃薯综合培养基为基础进行试验,且培养时间仅局限于5 d,有一定的局限性。

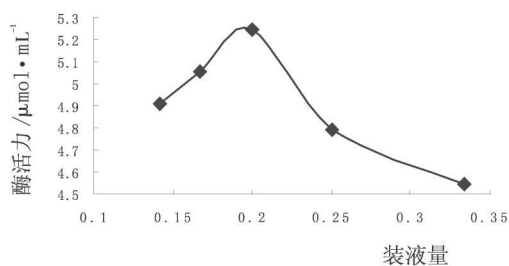


图3 装液量对木聚糖酶分泌的影响

## 参考文献

- [1] Swaroopa Rani. Xylanase production by hypoxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum* [J]. *Enzyme and microbiol* 1996 18: 23-28.
- [2] 怀文辉, 何秀萍. 微生物木聚糖酶研究进展及应用前景 [J]. *微生物学*

报, 2007, 27(2): 137.

- [3] Brian P Roy, Frederick Archibald. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism [J]. *Appl. Environ. Microbiol* 1993 59 (6): 1855-1863.
- [4] Patrick J Collins, Michiel J Kottelman, Jim A Field and Aland W dohson. Oxidation of Anthracene and benzo  $\alpha$ , pyrene by laccase from *Trametes versicolor* [J]. *Appl. Environ. Microbiol* 1996, 62(12): 4563-4567.
- [5] Johannes C, Majcherzyk A and huttermann. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1996 46: 313-317.
- [6] 王宜磊. 培养条件对毛栓菌漆酶分泌的影响 [J]. *微生物学杂志* 2003, 23(5): 28-30.
- [7] 董国强, 张猛白, 林开江. 半纤维素酶的 DNS 液显色法测定 [J]. *浙江农业科学*, 1989(2): 88-89.
- [8] 周长路. 不同接种量对毛栓菌胞外酶活性和菌丝体生长的影响 [J]. *菏泽师专学报*, 2000, 22(4): 29-30.

# Effects of Culture Conditions on Xylanase Production from *Trametes trogii*

BAI Yu-jie ZHU Qi-zhong, WANG Xu, REN Yan-gang

(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

**Abstract:** Effect of carbon source, nitrogen source, inoculation amount, culture temperature on xylanase production from *Trametes trogii* were studied. The results showed that wheat bran as carbon source, and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as nitrogen source had certain influence on xylanase production. But inoculation amount, culture temperature, liquid loadage had great influence on xylanase production.

**Key words:** Carbon source; Nitrogen source; Culture conditions; Xylanase; *Trametes trogii*

## 葡萄巧施叶面肥优质丰产

葡萄喷施叶面肥, 叶片受肥面广、肥效迅速、省工省肥, 是葡萄常用的施肥方法。一般肥液喷后 2 h 即开始吸收, 尿素喷施后 24 h 内可被吸收 88%。

花期喷施尿素与硼肥混合液, 可提高坐果率; 幼果和浆果成熟期喷施过磷酸钙溶液, 能使果品含糖量明显提高, 并增强抗病力; 浆果迅速生长前喷施钾肥, 产量可提高 7%~10%, 含糖量增加 1.5%~2.5%; 浆果变软初期喷施稀土溶液, 增产又增甜。叶面喷施要取得最佳效果, 应掌握以下技术要点。

**1 喷施方法** 葡萄嫩叶角质层比老叶薄, 肥液渗透量大; 叶背面气孔比叶正面多, 吸收快。因此, 葡萄施叶面肥应以嫩梢、幼叶和叶背面为主。喷施力求雾粒细微, 以利均匀密布, 喷至叶片全部湿润, 肥液欲滴而不下落为限。大田葡萄用背负式喷雾器和弥雾机配合进

行, 高架葡萄用高压喷雾机喷布。一般在年生长发育周期内喷施 4~6 次。根据需要可多种肥料混合喷施, 也可与农药(包括植物生长调节剂)混喷兼防病虫害。

**2 喷施适期** 一般来说, 在葡萄整个生长季节均可施用叶面肥, 最好在新梢生长前喷施“催梢肥”, 在开花、坐果期喷施“稳花稳果肥”; 果实膨大期喷施“壮果肥”。整个生长发育阶段, 出现缺素症, 应及时对症喷施补救。使肥料品种因生育期不同而有所侧重, 从萌芽、展叶至开花前后, 宜喷氮肥; 从春季新梢开始生长, 到浆果成熟期, 尤其是新梢旺长期到浆果膨大期, 喷施磷肥效果最好; 浆果膨大期喷钾肥最佳; 花期喷硼效果好; 浆果变软初期喷施稀土微肥作用大。

**3 喷施天气与时间** 叶面喷施受风、气温、湿度的影响, 在一定的范围内, 温

度越高, 叶片吸肥越快; 湿度越大, 吸肥越多; 风速越小, 肥液在叶片上湿润时间越长, 吸肥越多且飘移损失越小, 为提高喷施效果, 最好选择无风的阴天喷施, 晴天则宜在温度适宜 (18~25℃)、湿度较大、蒸发量较小的早晨或傍晚进行。

**4 适宜肥料与喷施浓度** 常用的氮肥有 0.2%~0.4% 的尿素溶液、0.3%~0.5% 的硫酸铵溶液; 磷肥为 5% 的过磷酸钙浸泡过滤液; 钾肥有 0.4%~0.5% 的硫酸钾溶液, 1% 的硝酸钾溶液。磷酸二氢钾为磷钾复合肥料, 喷施浓度为 0.2%~0.3%, 草木灰也是很好的钾肥源, 一般喷施 3% 的浸出液。微量元素肥料有 0.1%~0.2% 的硼砂或硼酸溶液、0.05%~0.15% 的硫酸锌溶液、0.1% 的硫酸亚铁溶液、0.1% 的硫酸镁溶液、0.5%~0.1% 的硫酸锰溶液。稀土为 0.05%~0.1% 的硝酸稀土溶液。