

黑木耳菌糠粗纤维素酶和木聚糖酶浸提条件研究

马怀良, 龚振杰, 陈 欢, 弥春霞, 杨 楠

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘 要: 在其它浸提条件一致的情况下, 分别选取不同时间、不同温度、不同液料比进行粗酶液制备, 测定羧甲基纤维素酶活力; 在单因素试验基础上, 以羧甲基纤维素酶活力和木聚糖酶活力为指标, 进行三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验, 研究浸提黑木耳菌糠羧甲基纤维素酶、木聚糖酶的最佳条件。结果表明: 黑木耳菌糠在高速组织捣碎机内 10 000 r/min 匀浆 2 min, 可使菌糠中的菌丝断裂, 有利于酶的释放; 羧甲基纤维素酶浸提最佳条件为温度 30℃、时间 1.0 h、液料比 40:1; 木聚糖酶浸提最佳条件为温度 25℃、时间 2.0 h、液料比 50:1。

关键词: 纤维素酶; 木聚糖酶; 黑木耳; 菌糠; 浸提

中图分类号: S 646.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0176-03

黑木耳是黑龙江省食用菌主栽品种, 每年产生大量的菌糠, 利用菌糠浸提纤维素酶和木聚糖酶, 具有来源丰富、成本低等优势。木屑作为黑木耳栽培的主要碳源, 可诱导菌丝产生纤维素酶^[12]、木聚糖酶^[3]等酶。黑木耳采收后菌糠中含有一定的纤维素酶^[4]和木聚糖酶^[5]。

在提取植物目标产物时, 常采用纤维素酶或者与木聚糖酶混合进行破壁处理, 对酶的纯度要求不高。而目前市场中纤维素酶、木聚糖酶纯度较高, 价格居高不下, 增加了生产成本。因此利用黑木耳菌糠中的纤维素酶和木聚糖酶进行应用具有重要意义。现对黑木耳菌糠粗纤维素酶和木聚糖酶浸提条件进行探索, 旨在为其进一步开发及应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 黑木耳菌糠及预处理

黑木耳(供试菌: 木耳特产 2 号; 栽培基质: 木屑 80%、麸皮 10%、米糠 8%、玉米粉 2%、石膏 1%、石灰 1%)。菌糠取自牡丹江市绿珠果蔬技术开发有限责任公司。黑木耳采收 3 茬后, 随机取 30 袋菌糠, 脱去菌袋, 摘掉表面的菇蕾, 用拌料机充分搅拌, 使其充分混合均匀。

1.2 粗酶液制备

精确称取黑木耳菌糠, 置于高速组织捣碎机内, 按不同液料比加入蒸馏水, 10 000 r/min 匀浆 2 min。另称取 1 份, 105℃烘干 4 h 后, 称重, 计算菌糠含水率。匀浆结束后, 将匀浆液转入三角瓶中并置于不同温度、不同时间, 转速为 120 r/min 的恒温振荡培养箱中浸提。浸提液于 4℃、3 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液^[4]。

1.3 酶活力测定

羧甲基纤维素钠(CMC-Na): Sigma 公司; 山毛榉木聚糖: Sigma 公司; 其余试剂为国产分析纯。羧甲基纤维素酶活力(CMCase activity)参见文献[6]; 木聚糖酶活力(Xylanase activity)测定方法在羧甲基纤维素酶活力基础上, 将底物换为 1%山毛榉木聚糖溶液、葡萄糖标准溶液换为木糖标准溶液, 其余相同。

酶活定义: 1 g 菌糠(干重)在 50℃、pH 5.5 条件下, 1 min 水解底物生成 1 μ mol 葡萄糖或木糖的酶量定义为 1 个酶活力单位, 以 IU/g 表示。

1.4 单因素试验

在其它浸提条件一致的情况下, 分别选择取不同时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h), 不同温度(20、25、30、35、40℃), 不同液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1)进行粗酶液制备, 并测定羧甲基纤维素酶活力。

1.5 正交试验

在 1.4 试验基础上, 以羧甲基纤维素酶活力和木聚糖酶活力为指标, 进行三因素(时间、温度、液料比)三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验, 3 次重复, 每重复测定 3 次, 研究浸提黑木耳菌糠羧甲基纤维素酶、木聚糖酶的最佳条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

第一作者简介: 马怀良(1976-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为应用微生物。

基金项目: 国家科技部科技人员服务企业行动资助项目(2009GJB20022)。

收稿日期: 2010-07-01

2.1.1 时间对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

如图1(温度25℃,液料比30:1)所示,羧甲基纤维素酶和木聚糖酶最佳浸提时间为1.5 h时。浸提时间小于1.5 h,羧甲基纤维素酶和木聚糖酶未充分溶出;浸提时间高于1.5 h,可能是浸出了较多的其它物质或酶结构被破坏,影响了酶活力。因此,适宜的浸提时间为1.0~2.0 h。

2.1.2 温度对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

如图2(液料比30:1,时间1.5 h)所示,羧甲基纤维素酶和木聚糖酶最佳浸提温度分别为35℃和25℃。温度

主要影响菌糠中酶向溶剂的扩散速率,温度较低酶浸出量少,温度较高加速了酶变性失活。在25~35℃时,有利于羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸出。

2.1.3 液料比对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

如图3(温度35℃,时间1.5 h)所示,羧甲基纤维素酶和木聚糖酶最佳液料比分别为30:1和40:1,此时已将酶基本浸出,再增加液料比,酶的浸出量变化不大。因此羧甲基纤维素酶和木聚糖酶料液比在30:1~50:1之间较为适宜。

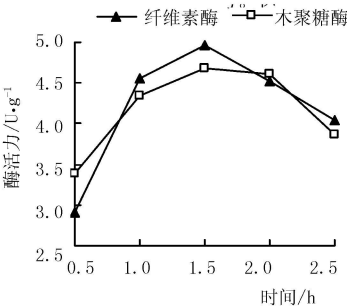


图1 时间对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

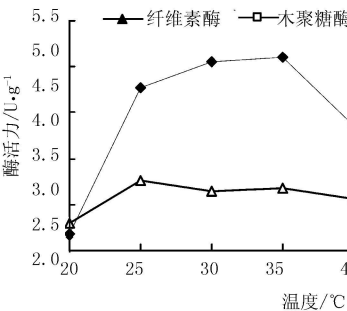


图2 温度对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

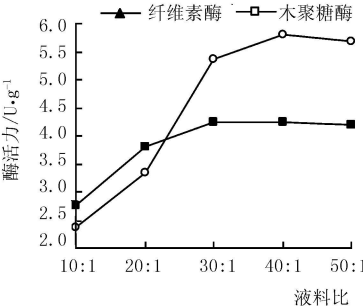


图3 液料比对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶浸提的影响

2.2 正交试验

表1可知,对羧甲基纤维素酶浸提影响的大小顺序为:液料比>温度>时间;对木聚糖酶浸提影响的大小顺序为:液料比>时间>温度。从多重比较结果来看,羧甲基纤维素酶浸提最佳条件为温度30℃、时间1.0 h、

液料比40:1;木聚糖酶浸提最佳条件为温度25℃、时间2.0 h、液料比50:1。这可能是纤维素酶与木聚糖酶在菌丝细胞中存在的部位不同,向溶剂扩散速率的不同导致。

3 结论

黑木耳菌糠在高速组织捣碎机内10 000 r/min匀浆2 min,可使菌糠中的菌丝断裂,有利于酶的释放。在单因素试验和正交试验中确定了纤维素酶为主的浸提条件为温度30℃、时间1.0 h、液料比40:1;木聚糖酶为主的浸提最佳条件为温度25℃、时间2.0 h、液料比50:1。在实际应用中,可根据需要选择以纤维素酶为主或以木聚糖酶为主的浸提条件。

参考文献

[1] 王宇,许修宏.黑木耳菌丝在自然堆积松木屑培养基中生长状况的初步研究[J].东北农业大学学报,2008,39(10):43-46.
[2] 韩增华,张介弛,张丕奇,等.黑木耳原种胞外酶活性的研究[J].生物技术,2009,19(5):14-16.
[3] 彭强.黑木耳培养料及营养生理特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
[4] 莫俏兰,常桂英.木耳菌糠中纤维素酶的提取与活性研究[J].广西轻工业,2009,124(3):18-19.
[5] 张国庆,董晓芳,王贺祥,等.8种食用菌菌渣中3种饲用酶活性的测定[J].中国食用菌,2009,28(5):28-29,56.
[6] 赵亚华.生物化学实验技术教程[M].广州:华南理工大学出版社,2000:149-151.

表1 正交试验结果

试验号	温度 /℃	时间 /h	液料比	羧甲基纤维	木聚糖酶
				素酶活力/1U·g ⁻¹	活力/1U·g ⁻¹
1	25	1.0	30:1	3.83Fe	2.44Cd
2	25	1.5	40:1	5.17Ce	3.31Bb
3	25	2.0	50:1	5.15Cc	4.41Aa
4	30	1.0	40:1	7.42Aa	2.64BCd
5	30	1.5	50:1	6.12Bb	3.29Bb
6	30	2.0	30:1	4.54DEd	2.64BCd
7	35	1.0	50:1	4.53DEd	2.69BCd
8	35	1.5	30:1	4.06EFe	2.80BCd
9	35	2.0	40:1	4.94CDcd	2.94BCbc
羧甲基纤维素酶					
K ₁	4.72	5.26	4.14		
K ₂	6.03	5.12	5.84		
K ₃	4.51	4.88	5.27		
R	1.52	0.38	1.70		
木聚糖酶					
K ₁	3.39	2.59	2.63		
K ₂	2.86	3.14	2.96		
K ₃	2.81	3.33	3.47		
R	0.58	0.74	0.84		

注:多重比较采用Duncan新复极差法,同一列中,不同的小写字母表示差异显著(P<0.05),不同的大写字母表示差异极显著(P<0.01),相同字母表示差异不显著。

猪苓多糖提取工艺的优化

王晶晶, 杨春文, 张莹莹, 董英伟, 杜带弟

(牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘 要: 对猪苓多糖的提取过程进行了研究。结果表明: 猪苓多糖的最佳提取工艺为: 用乙醇含量为 70%, pH 值为 6.5 的提取液提取; 用 Sevag 法去除蛋白效果最好; 用氧化脱色法除色素效果最好; 分级沉淀时乙醇浓度为 80% 时效果最好。

关键词: 猪苓; 多糖; 提取工艺; 优化; 乙醇

中图分类号: S 646.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)20-0178-03

猪苓(*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.) 属真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、猪苓(地花)属^[1]。猪苓菌核在我国已有 2 000 多年的用药历史, 其性平味甘, 具有利水渗湿、祛痰解毒的功能^[2], 大量近代药理和临床实践证明, 其提取物猪苓多糖是一种非特异性细胞免疫刺激剂, 可以抑制癌细胞生长, 目前被广泛用于癌症的辅助治疗, 在治疗病毒性肝炎、肝硬化、抗辐射和白血病方面也有良好的效果^[3]。近年来, 已经成为较受欢迎的抗癌、抗肿瘤及保健食品。

牡丹江师范学院生物系开设的生物工程下游技术

实验课中“猪苓多糖的提取”是其中一项内容, 其目的是使学生掌握新兴的生物产品制备技术, 提高学生的实践能力及未来的就业机会。但在实际授课中常面临费用高、产品产率低、产品质量差、产品利用率低、后续研究匮乏等问题。因此, 优化猪苓多糖的提取工艺, 并进一步开展对猪苓多糖分离、纯化的研究, 形成具有价廉、产量高、品质优的完整的猪苓多糖制备工艺体系, 并争取在未来开设猪苓多糖的药用成分分析和以小白鼠为试验对象的猪苓多糖的抗癌、抗辐射和治疗肝损伤的试验研究, 建立完整的、有深度的、有实际应用价值的试验体系, 是该研究的最终目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪苓购自牡丹江市天利医药商厦。

1.2 试验方法

1.2.1 pH 值和乙醇含量对猪苓多糖粗品提取率的影响

Study on Conditions of Extracting Crude CMCase and Xylanase from *Auricularia auricula-judae* Residue

MA Huai-liang, GONG Zhen-jie, CHEN Huan, MI Chun-xia, YANG Nan

(College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang Heilongjiang 157012)

Abstract: The other extraction conditions in the same situation, were selected at different times, different temperatures and different liquid ratio for crude enzyme preparation, the carboxymethyl cellulase activity was mensurated, based on single factor experiments to carboxymethyl cellulase and xylanase activity as an index, the best conditions of the extracting *Auricularia auricula-judae* residues carboxymethyl cellulase, xylanase. The results showed that the *Auricularia auricula-judae* residues were homogenized 2 minutes in waring blender (10 000 r/min), the mycelium can break, beneficial releasing of enzymes; optimal condition of extracting CMCase were temperature 30 °C, time 1.0 h and liquid-material ratio 40 : 1 and that of extracting xylanase were temperature 25 °C, time 2.0 h and liquid-material ratio 50 : 1.

Key words: CMCase; xylanase; *Auricularia auricula-judae*; residue; extraction