

蟹味菇产木聚糖酶的条件及其酶性质的研究

张瑞景, 朱启忠, 高丽伟, 王 冕, 许晓慧, 方 雅

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

摘 要: 采用液体摇瓶培养方法, 探讨了碳源、氮源等因素对蟹味菇分泌木聚糖酶能力的影响, 并对木聚糖酶的部分性质进行了研究。结果表明: 以玉米芯+麸皮作为碳源, 硝酸铵作为氮源时蟹味菇产木聚糖酶的活力最高; 木聚糖酶的最适反应pH为4.6, 最适反应温度是35℃。

关键词: 木聚糖酶; 蟹味菇; 培养条件; 酶活

中图分类号: S 646.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)16-0189-03

木聚糖是半纤维素的主要组成成分, 属于植物细胞壁中的结构性非淀粉性多糖, 为自然界的第二大可再生资源。但木聚糖在动物消化道内不能被消化吸收, 并且阻碍其它营养成分的消化利用。木聚糖酶是降解木聚糖的复合酶, 包括多种内切酶和外切酶, 其中内切β-1, 4-D-木聚糖酶是最关键的酶。木聚糖酶在食品、饲料、造纸等众多行业有着广阔的应用前景。木聚糖酶能够有效降解谷物饲料的细胞壁结构, 释放出胞内养分从而增

加饲料的利用率和动物的生产性能^[1]; 在造纸工业中用木聚糖酶预处理纸浆可取代有毒化学物质, 改善漂白效果并可回收有用的副产品; 在食品工业上, 木聚糖酶的水解产物—寡木糖是一类保健食品, 还可以用于制备食品增稠剂和澄清果汁^[2]。

目前对食用菌产木聚糖酶的研究还较少。蟹味菇是一种营养价值很高的食用菌, 资料显示蟹味菇是木聚糖酶高产菌。该试验对蟹味菇木聚糖酶进行了初步的酶学性质研究, 并且对液体培养条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种: 蟹味菇 (*Hypsizigus marmoreus*) 购买于山东省鱼台县食用菌研究所。

培养基: 斜面及固体培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 磷酸二氢钾 3, 无水硫酸镁 1.5, 维生素 B₁ 0.01, 琼

第一作者简介: 张瑞景(1987-), 女, 山东菏泽人, 本科, 研究方向为生物科学。

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 山东单县人, 教授, 硕士生导师, 现从事生物化学的教学和科研工作。

基金项目: 山东大学威海分校科研资助项目(A09025)。

收稿日期: 2010-05-07

堆。一般 25~30 d 即可长满料面, 发菌结束后, 即可进入覆土出菇。

4.5 覆土处理

覆土最好采用有一定粘性的肥沃菜园土, 要过筛打碎, 加入 1%石灰粉, 每 100 kg 土喷 1 000 倍甲醛 5~10 kg 起堆。用塑料布密封闷 24 h 即可。

将发满菌的菌袋脱去塑料袋, 从中间切断, 竖排, 菌棒间隔 2~3 cm, 填以肥土, 料上覆 3 cm 左右的土, 灌水、平整, 并盖黑色薄膜。

4.6 出菇管理

待覆土层上出现大量鸡腿菇菌丝后, 调节湿度至 85%~90%, 温度至 16~20℃, 同时每天揭膜透气, 增加氧气, 刺激菌丝扭结形成菌蕾。待长出菌蕾时, 要加强温湿度的调节, 湿度不宜过大, 每天可向空间、地面喷水 1~2 次, 保持空气相对湿度 80%~90%。若气温高于 25℃时应采取降温措施。子实体生长阶段不需要太强的光线, 黑暗光可提高菇体洁白。经 7~15 d, 子实体

6~7 成熟后即可采收。

5 采收及采后管理

鸡腿菇成熟的速度极快, 必须在菌盖含苞未放, 菌环即将或刚刚松动 6~7 成熟时的菌蕾期适时采收, 必要时要早起和下午各采 1 次。采收时, 一手按住菇体一侧覆土层, 一手捏住子实体左右轻轻转动采下。削净菇脚上的泥土和菇体上的鳞片后即可上市鲜销或加工。

采后及时清理床面, 浇 1 次透水, 并结合浇水增施 1%的三元复合肥, 平整床面, 保温保湿, 增加氧气和光照, 促其继续分化出菇。

6 病虫害防治

在鸡腿菇的栽培过程中病害主要有绿霉、木霉、鬼伞等, 这些可通过使用 50%克霉灵 200 倍液拌料和环境消毒解决。而对鸡爪菌则要进行综合防治。土壤处理、畦床消毒、杀菌剂拌料、降低土壤湿度等方法解决。虫害以地蛆、蝼蛄为主, 可用 50%敌敌畏 100 倍液或生物虫百杀等拌土或拌料杀虫, 效果很好。

脂 20。液体培养基(g/L): 马铃薯 200, 麸皮 20, 磷酸二氢钾 3, 无水硫酸镁 1.5, 维生素 B₁ 0.01。

1.2 试验仪器及试剂

752 型紫外可见光光度计(上海光谱仪器有限公司)、SZH 型水浴恒温振荡器(龙口市先科仪器有限公司); 木聚糖和木糖均购于 Sigma 公司, 其它试剂均为分析纯。

1.3 粗酶液的制备方法

1.3.1 菌种的发酵 250 mL 锥形瓶中加入 60 mL 液体培养基, 接入 3 片($R=1\text{ cm}$)适当菌龄蟹味菇菌种, 25℃ 90 r/min, 摇床培养 9 d。

1.3.2 粗酶液的制备 取发酵液 3 500 r/min 离心 5 min, 上清液即为粗酶液^[3-4]。

1.4 酶活力测定^[5]

取底物 1 mL 于试管中, 根据酶活力的大小加适量的粗酶液, 补加磷酸氢二钠缓冲液至 2 mL, 35℃ 反应 30 min, 加 3 mL DNS 混匀, 沸水浴 10 min, 取出后冷却加入 20 mL 水, 在 540 nm 处测 OD 值。以 1 min 内 1 mL 粗酶液与木聚糖反应产生的木糖的量($\mu\text{g/mL}$)作为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 不同碳、氮源对木聚糖酶分泌的影响

2.1.1 不同碳源对木聚糖酶分泌的影响 分别用待测碳源(玉米芯和麸皮(1:1)、淀粉、玉米芯、麦草粉、蔗糖、

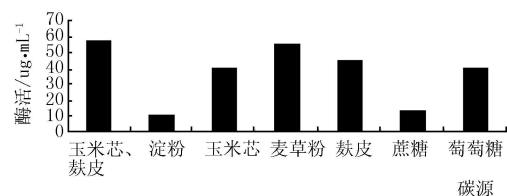


图1 不同碳源对蟹味菇产木聚糖酶的影响

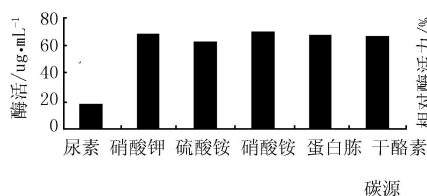


图2 不同氮源对蟹味菇产木聚糖酶的影响

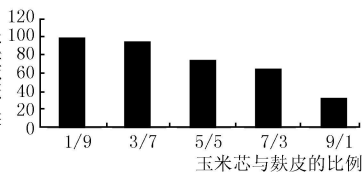


图3 不同比例的玉米芯与麸皮对蟹味菇产木聚糖酶的影响

2.1.4 不同碳源氮源比例对蟹味菇产木聚糖酶的影响

在得出最佳氮源的基础上改变氮源的添加量(0.5%、1%、2%、3%、4%)从而改变碳氮比, 培养 9 d 后测定木聚糖酶的活力。由图 4 可知, 当氮源含量为 2% 时为最佳。综上所述, 最优液体培养基为(g/L): 土豆 200, 磷酸二氢钾 3, 无水硫酸镁 1.5, 维生素 B₁ 0.01, 硝酸铵 20, 玉米芯 2, 麸皮 18。

2.1.5 装液量对蟹味菇产木聚糖酶的影响 在 250 mL 的锥形瓶中分别装入 85、65、50、40 mL 的最优液体培养基, 接入 3 片菌种进行培养。由图 5 可知, 当装液量为 40 mL 时产酶量最高, 装液量过多会影响木聚糖酶的分泌。

2.1.6 不同接种量对蟹味菇产木聚糖酶的影响 当装

葡萄糖)代替基础液体培养基中的麸皮, 培养 9 d 后测木聚糖酶活力。由图 1 可知, 在该试验条件下, 以玉米芯+麸皮(1:1)为碳源时蟹味菇分泌木聚糖酶的量最多, 麦草粉为碳源时所得酶量也较多, 但以淀粉和蔗糖为碳源时木聚糖酶的分泌量较少。分析原因可能是木聚糖酶作为诱导酶, 其酶的活力大小与诱导物的种类和多少有关^[6]。玉米芯+麸皮作为复合碳源时的产酶活性高于单一碳源可能是因为麸皮中有较多的生长因子有利于蟹味菇的生长, 而玉米芯中的木聚糖更有利于诱导木聚糖酶的合成与胞外分泌^[7]。

2.1.2 不同氮源对蟹味菇产木聚糖酶的影响 按 0.5% 的量用待测氮源(硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾、干酪素、蛋白胨、尿素)代替最优碳源液体培养基中的硫酸铵, 培养 9 d 后测定木聚糖酶的活力。由图 2 可知, 以硝酸铵为氮源时木聚糖酶的酶活力最高, 硝酸钾次之, 尿素最低。

2.1.3 不同比例的玉米芯与麸皮的量对蟹味菇产木聚糖酶的影响^[8] 以最优的氮源为氮源改变最适碳源中玉米芯与麸皮的比率 培养后测定木聚糖酶的活力(以最高的酶活力为 100%)。由图 3 可知, 当玉米芯:麸皮为 1:9 时为最佳。蟹味菇产木聚糖酶的量受玉米芯与麸皮的比率有关, 比例越高发酵液粘度越高, 供氧越少, 对菌体生长不利导致酶活力下降; 比例越高释放出的木聚糖浓度也会随之增加, 抑制对木聚糖酶的诱导^[9]。

液量为 40 mL 时分别接入 2、3、4、5、6 片菌种。由图 6 可知, 当接种量为 3 片时产酶量最高。接种量过高时不利于生长, 产酶量低; 接种量过低时养分利用不完全, 产酶量也低。

2.1.7 培养时间对蟹味菇产木聚糖酶的影响 培养时间对蟹味菇产木聚糖酶的影响同参考文献^[4]。

2.2 蟹味菇木聚糖酶的性质

2.2.1 木聚糖酶的最适 pH 木聚糖酶粗酶液于不同 pH(2.2、3.0、3.8、4.6、5.4、6.2、7.0、7.8)条件下进行酶解反应, 测剩余酶活(以最高酶活力为 100%), 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 在 pH 2.2~4.6 时酶活随 pH 的升高而升高, 在 pH 4.6 时酶活达到最高值接着酶活随 pH 的升高而降低。

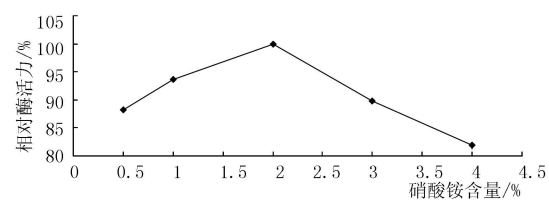


图 4 不同碳源氮源比例对蟹味菇产木聚糖酶的影响

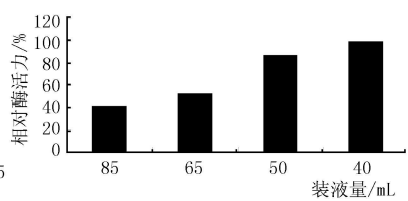


图 5 不同装液量对蟹味菇产木聚糖酶的影响

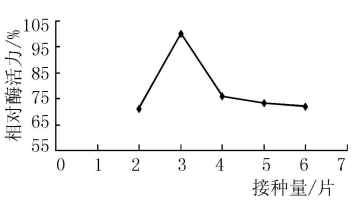


图 6 不同接种量对蟹味菇产木聚糖酶的影响

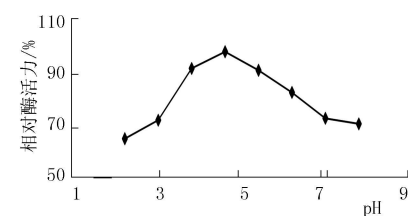


图 7 蟹味菇产木聚糖酶的最适 pH

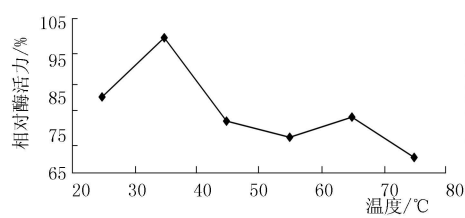


图 8 蟹味菇产木聚糖酶的最适温度

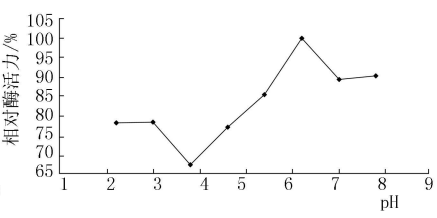


图 9 蟹味菇产木聚糖酶的 pH 稳定性

2.2.2 木聚糖酶的最适反应温度 在 pH 4.6 的条件下, 分别于不同温度(25、35、45、55、65、75℃)进行酶解反应, 测剩余酶活(以最高酶活力为 100%), 结果如图 8 所示。由图 8 可知, 木聚糖酶活力受温度影响较大, 在 35℃左右达到最高值, 高于 35℃酶活力迅速降低, 可能是因为温度太高破坏了酶蛋白的结构, 造成酶活力降低。

2.2.3 木聚糖酶的 pH 稳定性 将粗酶液于不同 pH (2.0~6.0)的缓冲液中室温(25℃)下保温 60 min 后, 按最适反应条件测定剩余酶活力(以最高的酶活力为 100%), 结果如图 9 所示。由图 9 可知, 酶在 pH 为 6.2 时较稳定。

3 讨论与结论

该试验对碳源、氮源、装液量、接种量对蟹味菇产木聚糖酶的影响进行了研究分析, 结果表明, 最适碳源是玉米芯+麸皮(1:9), 最适氮源是硝酸铵, 由此得出最适液体培养基配方如下: 马铃薯 20%, 磷酸二氢钾 0.3%, 无水硫酸镁 0.15%, 硝酸铵 2%, 玉米芯 0.2%, 麸皮 1.8%, 维生素 B₁ 0.01%; 最适装液量为 40 mL/250 mL 锥形

瓶, 接种量为 3 片/250 mL 锥形瓶。对木聚糖酶酶学性质的研究表明, 酶的最适反应 pH 4.6, 最适反应温度为 35℃, 酶在 pH 6.2 时稳定性较高。

参考文献

[1] 郭志强, 顾维志, 李佩建, 等. 木聚糖酶的研究进展[J]. 畜禽业, 2008 (6): 18-20.
[2] 李立恒. 环状芽孢杆菌果胶酶和木聚糖酶分离纯化及性质研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
[3] 林友照, 出小平. 蟹味菇生物学特性研究与最适培养料筛选[J]. 中国食用菌, 2007, 26(6): 29-31.
[4] 任延刚, 朱启忠, 黄庆瑞, 等. 蟹味菇组织培养及分泌胞外酶的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1927-1928, 1938.
[5] 李科, 孙彦平, 蔡小波, 等. 黄曲霉产木聚糖酶条件优化及酶解产物初步分析[J]. 生物技术通报, 2009(S1): 348-351, 363.
[6] 崔月明, 樊妙姬, 栾桂龙, 等. 枯草芽孢杆菌 XY1905 木聚糖酶酶学性质的初步研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(6): 21-23.
[7] 彭新榜, 马歌丽, 李国毅, 等. MB22 木聚糖酶发酵条件的研究[J]. 饲料工业, 2004, 25(12): 49-51.
[8] 汪世华, 胡开辉. 木聚糖酶高产菌株的诱变育种及产酶条件研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(4): 496-500.

The Study on Culture Conditions of *Hypsizigus marmoreus*
Producing Xylanase and Some Properties of Xylanase

ZHANG Rui-jing, ZHU Qi-zhong, GAO Li-wei, WANG Mian, XU Xiao-hui, FANG Ya
(Marine College Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

Abstract: The carbon and nitrogen source and other factors affecting *Hypsizigus marmoreus* producing xylanase in liquid shake-flask fermentation and some properties of xylanase were studied. Some properties of xylanase were studied. The results showed that the best carbon source was corn cob + wheat bran, the best nitrogen source was ammonium nitrate. The optimal reaction pH was 4.6, the optimal reaction temperature was 35℃.

Key words: xylanase; *Hypsizigus marmoreus*; culture condition; enzyme activity