

不溶性着色蔗渣木聚糖检测木聚糖酶活性*

何成新 张厚瑞 曾健智 方 宏 陈海珊

(广西植物研究所 桂林 541006)

摘要: 蔗渣木聚糖经 1,4-丁二醇二环氧甘油醚与染料气巴蓝 3GA 交联形成不溶性着色固体。这种着色蔗渣木聚糖在 pH4~8 范围内表现稳定,用于评价木聚糖酶活性及在平板上检测产酶微生物具有简捷而灵敏的效果。

关键词: 蔗渣, 木聚糖, 染料, 木聚糖酶

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0045-05

INSOLUBLE DYE XYLAN OF SUGAR CANE BAGASSE AND ITS APPLICATION FOR MEASUREMENT OF XYLANASE ACTIVITY

HE Chen-Xing ZHANG Hou-Rui ZHENG Jian-Zhi FANG Hong CHEN Hai-Shan

(Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006)

Abstract: Xylan from sugar cane bagasse can be cross-linked by 1, 4-butanedioldiglycidylether with dye Cibacron blue 3GA to form an insoluble dye solid. This substrate was stable from pH4 to pH8 at 50℃ for 24h or 100℃ for 30min. It is easy and sensitive to use this dyed xylan from sugar cane bagasse in measuring xylanase activity and screening xylanase-producing microorganisms on agar plate.

Key words: Sugar cane bagasse, Xylan, Dye, Xylanase

木聚糖是植物细胞壁半纤维素的主要成分,是自然界可再生获得的丰富资源之一。木聚糖的酶法降解在食品工业,饲料工业,纸浆漂白工业中具有重要的应用价值^[1]。以往虽有多种方法评价木聚糖酶活性,但是都存在操作繁琐的缺点。1997 年南韩学者 Lee 等人^[2]用气巴蓝 3G-A (Cibacron blue 3GA) 交联着色燕麦木聚糖合成一种不溶性固体染料,用来评价木聚糖酶活性,具有简捷而灵敏的效果。

1997 年 Hespell^[3]等人收集了国际上不同厂商的木聚糖酶以不同植物的木聚糖检验活性,结果发现,一种聚糖酶对不同木聚糖所表现的活性相距甚远。朱静等人^[4]以焦曲霉产木聚糖酶水解不同来源的木聚糖,其水解速度也有很大的差别。因此,特定的植物木聚糖只有选用特定的木聚糖酶系,才能充分发挥酶的作用。

蔗渣是我国资源极为丰富的制糖工业副产物,蔗渣木聚糖的酶解利用在我国有着十分特殊的意义。建立一套快速而灵敏的方法对作用于蔗渣木聚糖的酶活性检测是十分必要的。基于这一目的,我们参照 Lee 等人^[2]的方法合成了不溶性固体染料-气巴蓝着色蔗渣木聚糖,并检验了其在木聚糖酶活性检测方面的应用效果,现将结果报告如下。

* 广西自然科学基金资助项目 (No.9811015)

广西青年科学基金资助项目 (No.0007010)

收稿日期: 2002-01-09, 修回日期: 2002-03-23

1 材料与方法

1.1 试剂与原料

染料, 气巴蓝 3G-A (Cibacron blue 3GA); 交联剂, 1, 4-丁二醇二环氧甘油醚 (1, 4-butanedioldiglycidylether), 购自 Sigma。甘蔗渣取自当地糖厂, 加适量的去离子水煮沸 1h, 滤干后再加水煮沸 1 次, 最后风干并粉碎备用。

1.2 微生物菌株

产木聚糖酶细菌, 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) IFFI 10090, 购自中国工业微生物菌种保藏中心; 产木聚糖酶真菌, 绿色木霉 (*Trichoderma viride*) AS3.3711, 无木聚糖酶活性菌株, 热带假丝酵母 AS3.3711 (*Candida tropicalis*) AS2.637, 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

1.3 试验方法

1.3.1 蔗渣木聚糖分离: 干燥蔗渣粉 100g, 甲苯-乙醇 (2:1, V/V) 溶液室温下浸提 12 h 脱蜡质, 滤去并挥干溶剂。脱蜡蔗渣加 2% 次氯酸钠溶液 1,000mL, pH 4, 75℃ 保温 2h, 脱去木素后用蒸馏水洗涤 3 次, 再次风干。脱木素蔗渣用 15% KOH-1.5% H_3BO_3 室温下浸提 12h, 抽滤。滤液减压浓缩至小体积, 用 10% 盐酸中和至 pH 5, 加 3 倍体积 95% 的乙醇沉淀, 沉淀物用 70% 乙醇反复洗涤, 冷冻干燥后得灰白色蔗渣木聚糖。

1.3.2 蔗渣木聚糖交联着色: 蔗渣木聚糖 2g 加入 30mL 蒸馏水, 浸润后加入 10mL 2mol/L NaOH, 溶解成透明溶液, 然后加入 1.5g 气巴蓝, 1.2mL 1, 4-丁二醇二环氧甘油醚, 搅匀, 静置 48h 后形成弹性极好的凝胶。将凝胶捣碎成细小颗粒, 沸水反复冲洗至洗出液无色。凝胶颗粒依次用 25%, 50%, 75%, 95% 乙醇洗涤脱水, 最后用丙酮, 石油醚处理, 80℃ 真空挥干石油醚后得深蓝色, 粉末状气巴蓝-蔗渣木聚糖不溶性固体染料。

1.3.3 木聚糖酶制备: 每 100 mL 培养液中含: 蔗渣粉 1 g, 麦麸 4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, KH_2PO_4 0.15g, 蛋白胨 0.5 g。250mL 三角瓶装量 25mL, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 10min。产酶菌株每支斜面菌种注入无菌水 2mL, 制成菌体 (孢子) 悬浮液, 接种四瓶培养物, 27℃ 摇瓶发酵 4d。

IFFI10090 发酵结束加入 2% $CaCl_2$, 2% 壳聚糖絮凝, 离心用 5% 盐酸调至 pH 3.5, 搅拌中加入固体硫酸铵至 70% 饱和度, 离心收集沉淀酶糊。沉淀酶糊置于透析袋中对蒸馏水透析至无硫酸根离子检出, 再次离心后的上清液即为酶液。AS3.3711 发酵结束后离心除去菌体, 上清液直接用 70% 饱和度硫酸铵沉淀, 此后的步骤同 IFFI10090。

1.3.4 染料含量测定: 取着色蔗渣木聚糖固体染料粉末 50mg (80℃ 真空干燥 6h), 加入酶液 5mL, 55℃ 水浴酶解至固体染料粉末溶解完全, 测定 625nm 处吸光度。另取气巴蓝 50mg 溶于 5mL 酶液中, 625nm 处测定吸光度。酶液作空白对照。按下述公式计算气巴蓝着色蔗渣木聚糖中染料气巴蓝的含量:

$$\text{染料含量} = \frac{\text{气巴蓝-木聚糖固体染料酶液吸光度 } A_{625} / (50\text{mg}/5\text{mL})}{\text{气巴蓝溶液的吸光度 } A_{625} / (50\text{mg}/5\text{mL})}$$

1.3.5 水解液成分分析: 50mg 蔗渣木聚糖加入相当于原发酵液体积的酶液 1mL, 45℃ 水解 24h, 纸层析检测水解液中的主要糖类。展开剂: 正丁醇: 吡啶: 水 = 4: 3: 3; 显色剂: 用水饱和的正丁醇配制含 2% 二苯胺, 2% 邻苯二甲酸溶液, 喷雾后加热显色。

1.3.6 着色蔗渣木聚糖稳定性检验: 用缓冲强度为 50mmol/L, pH3~8 柠檬酸-磷酸缓冲液, 按 10mg/mL 配制着色蔗渣木聚糖固体染料悬浮液, 50℃ 反应 24h, 离心取上清液, 625nm 处测定吸光度。按同一方法配制的悬浮液, 经 100℃ 水浴 30min, 离心, 吸取上清液测定吸光度。蒸馏水作空白对照。

1.3.7 着色蔗渣木聚糖固体染料检验酶活性: 10mg 着色蔗渣木聚糖染料加入已经稀释不同倍数的酶液 5 mL, 50℃ 振荡保温 15min, 100℃ 煮沸 10min 中止反应, 检测离心上清液 625nm 处吸光度。

以普通蔗渣木聚糖代替着色蔗渣木聚糖, 在上方法的同等条件下反应, DNS 法测定酶解液的还原糖。

1.3.8 平板检测产酶菌株: 100mL 普通麦芽汁-琼脂培养基加入气巴蓝-蔗渣木聚糖固体染料粉末 50mg, 3.5×10^4 Pa 蒸汽灭菌 15min, 制成平板后接入供试微生物菌种, 25℃ 培养 7d, 检验结果并拍照。

2 结果与分析

经测定, 本法制备的着色蔗渣木聚糖, 染料含量为 72mg 气巴蓝/g 着色蔗渣木聚糖。在 50mol/L, pH3~8 柠檬酸-磷酸缓冲液内, 在 50℃, 24h, 或 100℃, 30min, pH3 时均显著分解, 而在 pH 4~8 范围则表现良好的稳定性, 见图 1。

微生物产木聚糖酶系中包括有内切木聚糖酶与外切木聚糖酶。内切木

聚糖酶, 或称 β -木聚糖酶, 其作用是切开木聚糖主链, 降低基质的聚合度。内切木聚糖酶作用前期所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, 最后生成木三糖、木二糖, 一般不会生成木糖单糖^[1]。外切木聚糖酶, 或称 β -木糖苷酶, 主要作用是水解短链的低聚木糖或木二糖, 并从此非还原性末端释放出木糖^[1]。

纸色谱 (图 2) 分析表明, IFFI10090 木聚糖酶的水解物中含有大量低聚木糖, 而 AS3.3711 木聚糖酶的水解物则以木糖单糖为主。这可以解释为: 在 IFFI10090 所产的木聚糖酶系中, 内切木聚糖酶的活力较高, 而外切木聚糖酶活力相对较低, 所以在反应体系中积累了较多的低聚木糖。而 AS3.3711 则有很强的外切木聚糖酶活性, 所以酶解产物不能停留在低聚糖阶段, 而是继续水解成为木糖单糖。

木聚糖酶水解着色蔗渣木聚糖, 以吸光度变化表征酶解液中释放出的染料含量, 用对应浓度的酶液水解普通蔗渣木聚糖, 用 DNS 法测得的吸光度变化表征酶解液中的还原糖含量。两种方法对 IFFI10090, AS3.3711 酶液的测定结果见图 3, 图 4。

在图 3、图 4 中, 染料法与 DNS 法测得的吸光度变化均呈良好的平行关系, 因此着色蔗渣木聚糖酶解液的比色变化, 通过适当的换算

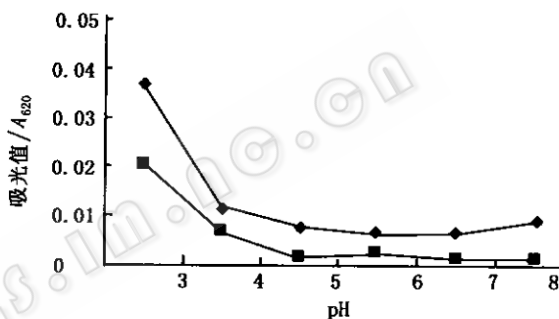


图 1 气巴蓝着色蔗渣木聚糖在不同处理条件下染料释放的变化

◆ 100℃ 30min, ■ 50℃ 24h

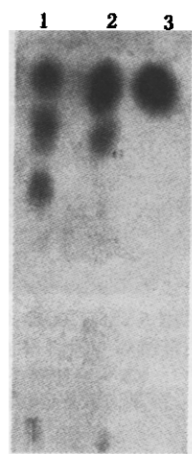


图 2 木聚糖酶液水解蔗渣木聚糖的纸色谱分析

1 IFFI10090, 2 AS3.3711, 3 木糖

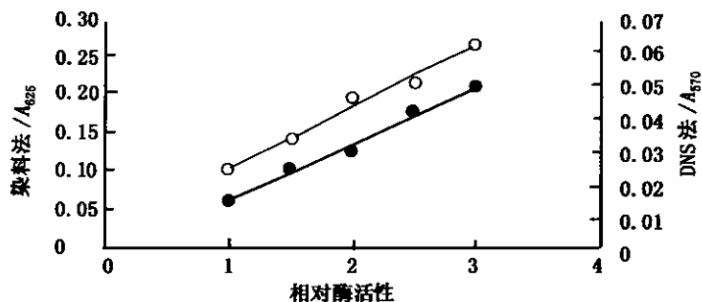


图3 DNS法与染料法(气巴蓝着色蔗渣木聚糖)测定 IFFI10090 木聚糖酶活性的关系

—○—染料法, —●—DNS法

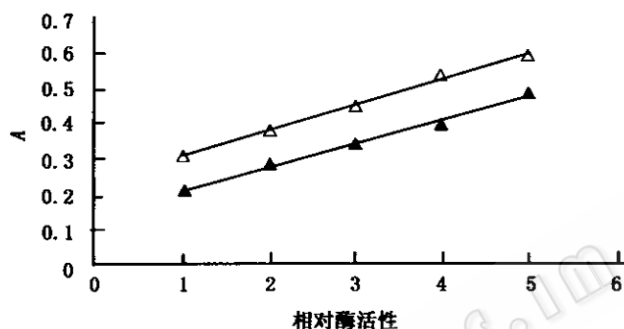


图4 DNS法与染料法(气巴蓝着色蔗渣木聚糖)测定 AS3.3711 木聚糖酶活性的关系

—△—染料法, —▲—DNS法(A₅₇₀)

可以表示为 DNS 法测定的还原糖含量变化。

比较图 3、图 4 还可以看出, 两种木聚糖酶液作用于同一种木聚糖, DNS 法与染料法所测得的吸光度比值(DNS 法/染料法)有很大差异, IFFI10090 显然小于 AS3.3711。这种现象是不难理解的, 因为根据图 2 的结果, IF-

FI10090 酶解的主要产物是低聚糖, 而 AS3.3711 酶解的主要产物是木糖单糖, 所以同等量的木聚糖被水解后(染料法测定值相等), AS3.3711 酶解液中的还原糖(DNS 法测定值)显然要高于 IFFI10090。

用气巴蓝-蔗渣木聚糖固体染料平板接入产木聚糖酶菌株 IF-FI10090, 不产木聚糖酶菌株 AS2.637, 培养 7d 后的结果见图 5。

图 5 显示出, IFFI90 分泌的木聚糖酶已将气巴蓝-蔗渣木聚糖染料颗粒溶解, 形成巨大的水解圈。而 AS2.637 由于缺乏木聚糖酶, 菌落周围的蓝色气巴蓝-蔗渣木聚糖染料颗粒仍清晰可辨, 没有形成水解圈。

3 结论

由本法制备的蔗渣木聚糖通过交联剂 1,4-丁二醇二环氧甘油醚与染料气巴蓝交联, 所生成的着色蔗渣木聚糖染料具有水不溶性, 并有较高的稳定性, 用于评价木聚糖酶对蔗渣木聚糖的活性和筛选产酶微生物, 具有方法简捷和灵敏可靠的效果。

参考文献

- [1] unna A. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17 (1): 39~67.
- [2] Lee S T, Lee J J. Journal of Microbiological Methods, 1997, 29 (1): 1~5.
- [3] Hespell R B, Patricia J O. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 62: 87~97.
- [4] 朱 静, 王 皓, 梁改芹, 等. 生物工程学报, 1999, 15 (1): 75~78.

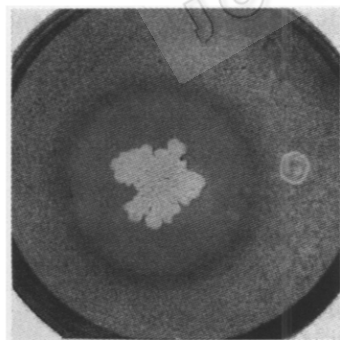


图5 IFFI10090 (左边)分泌的木聚糖酶将琼脂平板中的气巴蓝着色蔗渣木聚糖固体溶解, 形成清晰的水解圈
平板内右边的菌落 AS2.637, 作木聚糖酶活性的阴性对照