



阿魏酸酯酶和木聚糖酶协同降解麦糟

李夏兰¹, 程珊影¹, 杨道秀¹, 方柏山^{1,2}

(¹ 华侨大学化工学院生物工程系, 福建 厦门 361021; ² 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

摘要: 橘青霉以麦糟为唯一碳源培养时, 阿魏酸酯酶的最佳发酵时间为 60 h, 其酶活力可达 40.8 mU/mL。在 pH 值为 5.0、45 °C、料液比 1 : 30 (g : mL) 条件下, 取 47.5 U/mL 的木聚糖酶粗酶液 15 mL, 加入 1.0 g 麦糟的乙醇不溶物, 反应 12 h 后, 加入 40.8 U/mL 的阿魏酸酯酶粗酶液 15 mL 再反应 12 h, 阿魏酸和低聚木糖释放率分别为 54.1% 和 161 mg/g (麦糟的乙醇不溶物)。实验结果还表明, 阿魏酸酯酶与木聚糖酶存在协同作用, 能极大提高麦糟中阿魏酸及低聚木糖的释放率, 有利于麦糟的降解。

关键词: 阿魏酸酯酶; 木聚糖酶; 麦糟; 生物降解

中图分类号: TQ 353.9

文献标志码: A

文章编号: 1000 - 6613 (2012) 05 - 1096 - 08

Utilization of feruloyl esterase and xylanase for the degradation of brewers' spent grain

LI Xialan¹, CHENG Shanying¹, YANG Daoxiu¹, FANG Baishan^{1,2}

(¹ Department of Chemical and Biochemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Huaqiao University, Xiamen 362021, Fujian, China; ² Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: The optimal fermentation time of *Penicillium citrinum* feruloyl esterase (PcFAE) was 60 h and its activity was 40.8 mU/mL when the Brewers' Spent Grain (BSG) was used as the sole carbon source for *Penicillium citrinum*. One gram of alcohol-insoluble residue (AIR) of Brewers' spent grain (BSG) was processed by the solution of crude xylanase (XG180) (47.5 U/mL, 15 mL) for 12 hours at the condition of the material-liquid ratio 1 : 30 (W/V), pH 5.0 and 45 °C, respectively. And then the solution of crude PcFAE (40.8 mU/mL) was added and the sample was processed for another 12 h. The maximum release rate of Ferulic acid (FA) was 54.1% and the release amount of xylooligosaccharide (XOS) was 161 mg/g (BSG-AIR), respectively. The results of our experiments showed that the release rate of FA and XOS from BSG-AIR increased significantly as the PcFAE could coordinate with the xylanase and enzymolysis process was also conducive to the degradation of BSG.

Key words: feruloyl esterases; xylanase; brewers' spent grain; biodegradation

已有报道表明, 阿魏酸酯酶可以和其它的半纤维素酶(如木聚糖酶)协同作用使微生物对植物细胞壁进行最大程度的降解^[1-3]。如 Faulds 等^[4]报道黑曲霉分泌的阿魏酸酯酶自身也能释放 FA, 但同时加入木聚糖酶, 其 FA 的释放量增加近 24 倍。Topakas 等^[5]报道, 嗜热侧孢霉产生的阿魏酸酯酶 StFaeC 与

收稿日期: 2011-11-16; 修改稿日期: 2011-12-15。

基金项目: 华侨大学人才启动基金(11BS221)及福建省科技重点项目(2011N0020)。

第一作者: 李夏兰(1965—), 女, 博士, 研究方向为生物化工。E-mail: xialan@hqu.edu.cn。联系人: 方柏山, 教授, 博士生导师。E-mail: fbs@xmu.edu.cn。

木聚糖酶协同作用从植物纤维质中释放的 FA 是无木聚糖酶时的 10 倍。Yu 等^[6]报道,黑曲霉分泌的 FAE 单独作用燕麦壳,其 FA 的释放率仅为 14%,但加入木聚糖酶后,FA 的最高释放量可达 69%。本文报道了实验室发酵的阿魏酸酯酶(命名为 PcFAE)协同木聚糖酶将麦糟中的半纤维素转化低聚木糖(xylooligosaccharide,简称 XOS),同时释放 FA 的结果,并初步探讨 PcFAE 降解麦糟(BSG)的作用机理。全面利用木质纤维素中的三大主要成分有很多报道,日前还未见有关阿魏酸酯酶和木聚糖酶协同作用降解木质纤维中的半纤维素同时产 FA 及 XOS 的报道。

1 实验

1.1 实验器材与试剂

FA 标准品、木聚糖,美国 Sigma 公司;木二糖及低聚木糖标准品,日本和光纯药工业株式会社;木聚糖酶 XG180,广州博士奥生化公司;其它常规试剂,均为国产或进口分析纯。BSG,福建泉州雪花啤酒厂提供。

Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;SP-2000 型光度计,上海光谱仪器有限公司;6890N 安捷伦气相色谱仪,美国 Agilent 公司。

橘青霉,本实验室从土壤中筛选得到,已鉴定为橘青霉^[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 阿魏酸含量的测定

按文献[8]的方法分析。

1.2.2 酶活力的测定方法

PcFAE 活力测定:以阿魏酸甲酯为底物,按文献[8]的方法测定。阿拉伯木聚糖酶活力测定:以燕麦木聚糖为底物,按文献[9]的方法测定。纤维素酶总酶活力测定:以定量滤纸为底物,按文献[10]的方法测定。阿拉伯糖糖苷酶活力测定:以对硝基苯基- α -L 型阿拉伯呋喃糖为底物,按文献[11]的方法测定。

1.2.3 低聚木糖总量的测定

采用 HPLC 法^[12]。色谱柱为 Aminex HPX-42A 柱,示差折光检测器。流动相为超纯水,流速 0.6 mL/min,柱温 85 °C。

1.2.4 阿魏酸释放率的测定

按参考文献[13]的方法测定。阿魏酸释放率为 FA 的释放量占 BSG 中碱提取的 FA 总量的百分率。

1.2.5 PcFAE 粗酶液的制备

PcFAE 的发酵工艺见文献[8]。将产 PcFAE 发酵液,10 000 r/min、4 °C 离心 5 min,得 PcFAE 粗酶液。

1.2.6 木聚糖酶粗酶液制备

取木聚糖酶 XG180(简称 XG180) 0.25 g,加入 20 mL 蒸馏水、40 °C 浸提 1 h,过滤,稀释 10 倍,得木聚糖酶粗酶液。

1.2.7 麦糟的乙醇预处理

把 BSG 浸没在 85%的乙醇中煮沸 5 min 冷却后过滤,重复该步骤两次。分别用无水乙醇和乙醚清洗烘干,过 50 目筛,得到 BSG 的乙醇不溶物(Alcohol insoluble residue of brewers' spent grain,简称 BSG-AIR)^[14]。

1.2.8 预处理后 BSG-AIR 残渣量的测定

将酶解液 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min,蒸馏水洗涤,取残渣 60 °C 干燥 8 h,称重。

1.2.9 PcFAE 与 XG180 协同酶解 BSG-AIR

将 1 g 的 BSG-AIR 同时加入 PcFAE 粗酶液和 XG180 粗酶液各 15 mL,在 pH 值 5.0、45 °C、料液比 1:30(g:mL)条件下,酶解 BSG-AIR 24 h。考察 FA 释放率和 XOS 的释放量。

1.2.10 PcFAE 与 XG180 酶解 BSG-AIR 的协同方式

将 PcFAE 粗酶液和 XG180 粗酶液以不同的顺序加入,在 pH 值 5.0、45 °C、料液比 1:30(g:mL)条件下酶解 BSG-AIR。考察 PcFAE 和 XG180 协同方式对 FA、XOS、单糖释放量及酶解后 BSG-AIR 干重的影响。

1.2.11 扫描电子显微镜对 BSG-AIR 纤维结构的观察

将样品烘干,均匀粘在贴有双面胶的样品台上,喷金后置于 S-3500N 型扫描电子显微镜下观察照相,加速电压为 15 kV,放大倍数为 600 倍。

2 结果与讨论

2.1 发酵过程主要木质纤维降解酶的产生

橘青霉以 BSG 为唯一碳源,在 220 r/min、28 °C 发酵 5 天,发酵过程中 PcFAE 酶、阿拉伯木聚糖酶和纤维素酶活力的变化情况见图 1。

由图 1 可知,发酵液中 PcFAE 酶活力随时间的延长开始逐渐上升,在 60 h 达到最高值,为 40.8 mU/mL,之后酶活力逐渐下降。阿拉伯木聚糖酶及

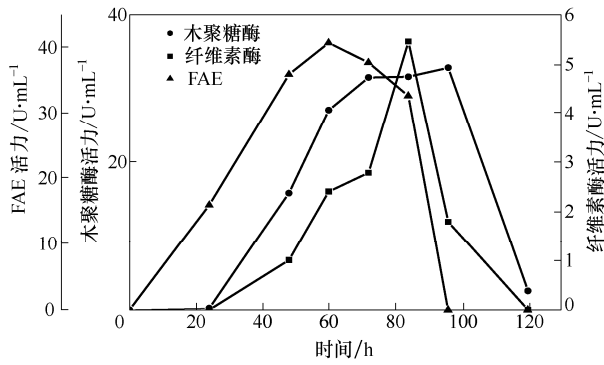


图 1 PcFAE、木聚糖酶和纤维素酶活力的时间曲线

纤维素酶活力与 PcFAE 酶活力的变化趋势一致,阿拉伯木聚糖酶在发酵 24 h 后酶活力逐渐上升,在 96 h 达到最高值,为 32.0 mU/mL;纤维素酶在发酵 48 h 酶活力开始逐渐上升,在 84 h 达到最高值,为 5.50 U/mL 左右。

在 PcFAE、阿拉伯木聚糖酶和纤维素酶这 3 种酶的酶活力均在达到一定值后逐渐降低,可能的原因是:一方面在发酵过程中菌体生长代谢产生甲酸、乙酸等有机酸类,抑制了酶活力;另一方面是从 BSG 释放得到的 FA、XOS 及葡萄糖等产物对酶产生反馈抑制作用,从而降低了酶活力。

日前报道的有关微生物同时分泌阿魏酸酯酶与木聚糖酶时,发酵过程中酶活力达最高的时间,阿魏酸酯酶比木聚糖酶延后一定的时间。Bartolome 等^[9]研究以 BSG 为唯一碳源培养除虫链霉菌 (*Streptomyces avermitili*) 时发现阿拉伯木聚糖酶的酶活力在 24 h 就达到最大值,而 PcFAE 酶活力延后 24 h 才到达最大值。Ferreira 等^[11]研究以甜菜浆为唯一碳源,培养唐德链霉菌 (*Streptomyces tendae*) 时也发现碳水化合物水解酶的酶活力在 24 h 达到最大值,而 PcFAE 活力则在 72 h 达到最大值。Panagiotou 等^[15]研究以 BSG 为唯一碳源培养巴西青霉 (*Penicillium brasilianum*),木聚糖酶酶活力在 96 h 达到最高,而阿魏酸酯酶活力延后 24 h。本实验结果却表明,橘青霉以 BSG 为唯一碳源发酵时,PcFAE 产酶最大值比阿拉伯木聚糖酶的产酶最大值

提前 36 h。这与文献报道的不一致。PcFAE 的产酶诱导机制需深入研究。

各菌株产 PcFAE 的能力见文献[16-18],由于发酵培养基中使用的木质纤维不同,测定 PcFAE 的底物不同,很难一一比较。在所报道的 43 种产 PcFAE 的菌株,酶活力最高的是菌株黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*),其以 1%玉米麸皮为碳源、28 °C、发酵 5 天,其酶活力最高可达 33 180 mU/mL (以阿魏酸甲酯为底物测定酶活力)^[19]。最低的为 *Streptomyces avermitili*,其以 1%燕麦木聚糖为碳源,37 °C、发酵 4 天,其酶活力只有 1.55m U/mL (以去淀粉麦麸为底物测定酶活力)^[20]。能与本文工作直接比较的,都以阿魏酸甲酯为底物测定酶活力,Bartolome 等^[9]研究的 *Streptomyces avermitili*,其以 1%BSG 为碳源、37 °C、发酵 2 天,其酶活力为 82 mU/mL。Panagiotou 等^[21]研究以 BSG 为唯一碳源培养 *Penicillium brasilianum*,其以 2% BSG 为碳源、30 °C、发酵 4 天,其酶活力为 64 mU/mL)。Mandalari 等^[22]研究以 BSG 为唯一碳源培养 *Talaromyces stipitatus*,其以 2% BSG 为碳源、37 °C、发酵 10 天,其酶活力为 140 mU/mL。本实验的橘青霉最高产酶酶活力为 40.8 mU/mL。

2.2 粗酶液中各种木质纤维降解酶的酶活力测定结果

测定 PcFAE 粗酶液及 XG180 粗酶液中木质纤维降解酶的酶活力,结果见表 1。

从表 1 可知,PcFAE 粗酶液及 XG180 粗酶液中还含有一定酶活力的纤维素酶和阿拉伯糖苷酶。

2.3 PcFAE 与 XG180 协同酶解 BSG-AIR 的结果

将表 1 中的 PcFAE 粗酶液及 XG180 粗酶液按 1.2.9 节步骤操作,FA 及 XOS 的释放情况见表 2。

当加入的是 PcFAE 纯酶时,在 40.8 mU PcFAE/g (BSG-AIR) 溶液中,不加 XG180 时其 FA 的释放量为 8.30%,当同时添加 47.5 U/mL XG180 时,FA 释放量可达 20.5%,说明 XG180 和阿魏酯酶对 FA 的释放有协同作用。当加入的是 PcFAE 粗酶液时,在 40.8 mU PcFAE/g (BSG-AIR)

表 1 粗酶液中各种木质纤维降解酶的酶活力

样品	PcFAE 酶活力/mU·mL ⁻¹	木聚糖酶活力/U·mL ⁻¹	纤维素酶活力/U·mL ⁻¹	阿拉伯糖苷酶活力/mU·mL ⁻¹
PcFAE 粗酶液	40.8	8.2	4.02	12.3
Xylanase 粗酶液	0	47.5	14.5	4.52

表2 PcFAE 添加或不添加 XG180 酶解 BSG-AIR 时 FA 及 XOS 释放

样品	PcFAE 纯酶		PcFAE 粗酶	
	不添加 XG180	添加 XG180	不添加 XG180	添加 XG180
FA 释放率/%	8.30	20.5	12.7	50.3
XOS 收率/mg·g ⁻¹ (BSG-AIR)	1.20	22.3	12.9	158

溶液中, 加入了 47.5 U/mL XG180, 其 FA 释放率最高可达 50.3%, 与 PcFAE 纯酶相比, 相应的 FA 释放量至少提高了 1.5 倍以上。这是因为 PcFAE 粗酶还含有其它木质纤维降解酶, 加强了 PcFAE 的协同作用。实验还发现, 若仅加 XG180 酶解 BSG-AIR, 而不添加 PcFAE 纯酶或 PcFAE 粗酶液, 其 FA 释放率仅为 1.45%, 这表明, PcFAE 是降解 BSG-AIR 释放 FA 的关键酶。

Faulds 等^[23-24]报道了阿魏酸低聚糖中 FA 释放率与 FA 与单糖的连结方式、单糖的种类及阿魏酸低聚糖长度大小有关, 因此选择合适的阿魏酸酯酶种类及木聚糖酶种类是提高木质纤维降解率的关键。Faulds 等报道 3 种不同类型的阿魏酸酯酶 (分别属于 A、B、C 类) 与不同家族的木聚糖酶作用, 结果表明不同种类的阿魏酸酯酶、不同家族的木聚糖酶及细胞壁材料 (麸皮、BSG) 不同、FA 释放率不同; 经纯化的阿魏酸酯酶与木聚糖酶协同作用时, BSG 的 FA 释放率最高为 26%; 其实验结果还表明, 与阿魏酸酯酶作用时, 11 家族的木聚糖酶更倾向于释放 FA, 而 10 家族的木聚糖酶更倾向于释放双阿魏酸^[25]。从表 2 可知, 本实验经纯化的阿魏酸酯酶与木聚糖酶协同作用时, FA 的释放率最高为 20.5%, 与 Faulds 等^[25]研究结果相比, 其 FA 释放率相对较小。这是因为阿魏酸酯酶种类不同, 作用的底物不同, 阿魏酸酯酶表现出的活性就不同, 如阿魏酸酯酶 A 类, 不能作用于与阿拉伯糖 2-O 连接的阿魏酸酯键, 而阿魏酸酯酶 B 类, 却有效地作用于与阿拉伯糖 2-O 连接的阿魏酸酯键^[26-27]。本研究中所用的木聚糖酶为 11 家族, PcFAE 也初步推定为 A 类^[8], 麦糟中的阿拉伯糖 2-O 连接的阿魏酸酯酶存在较多^[25], 因此其 FA 的释放率相对较低。

从表 2 可知, 当加入的是 PcFAE 纯酶时, 若不添加 XG180, 释放的 XOS 量很小, 为 1.2 mg/g (BSG-AIR)。说明 PcFAE 不是释放 XOS 的关键酶; 当添加 XG180, XOS 增加到 22.3 mg/g (BSG-AIR), 说明木聚糖酶与 PcFAE 有协同作用, 有利于 XOS

的释放。当加入的是 PcFAE 粗酶液时, 释放的 XOS 量为 12.9 mg/g (BSG-AIR), 与仅加 PcFAE 纯酶相比较, 这是因为 PcFAE 粗酶液已含有一定酶活力的木聚糖。当同时添加 XG180, 释放的 XOS 量为 158 mg/g (BSG-AIR)。

XOS 的释放量与所采用的木质纤维降解酶种类、阿拉伯木聚糖主链上的取代基团及取代密度, 尤其是 FA 在阿拉伯木聚糖主链上的取代位置及密度有关^[28-30]。因为 FA 在木聚糖上的取代, 使得木聚糖形成有柔性而不是刚性的结构, 易于木质纤维降解酶的进攻^[31]。但有关木质纤维结构与木质纤维降解酶的相互关系的生物信息学的报道非常少。

2.4 木聚糖酶添加方式对 FA 和 XOS 释放量的影响效果

在 pH 值 5.0、45 °C、料液比 1 : 30 (g : mL) 条件下, 将 40.8 mU/mL 的 PcFAE 粗酶液和 47.5 U/mL 的 XG180 粗酶液 (各酶活力见表 1) 以不同的方式加入, 探讨木聚糖酶与 PcFAE 的加入方式对 BSG-AIR 中 FA 和 XOS 释放量的影响, 实验结果见图 2~图 7。

图 2~图 7 横坐标的数字代表了下面不同的具体实验方案。

(1) 方案 1 取 PcFAE 粗酶液 15 mL, 加入 1.0 g BSG-AIR, 反应 12 h 后, 加入 15 mL pH 值为 5.0 的缓冲液再反应 12 h。

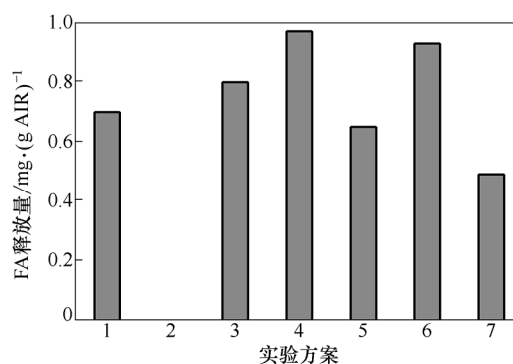


图2 协同作用方式对 FA 释放量的影响

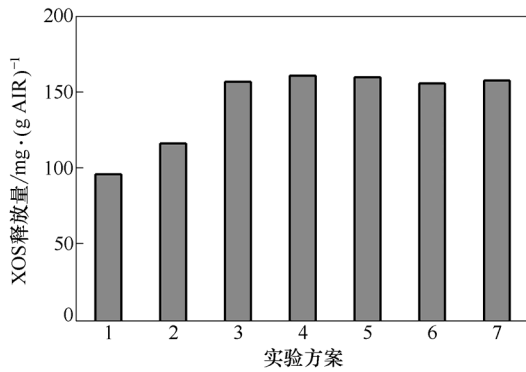


图 3 协同作用方式对 XOS 释放量的影响

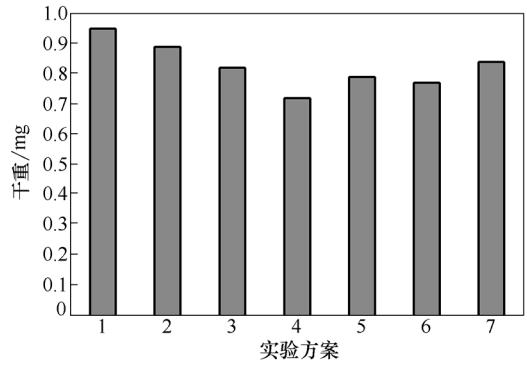


图 7 协同作用方式对酶解后 BSG-AIR 干重的影响

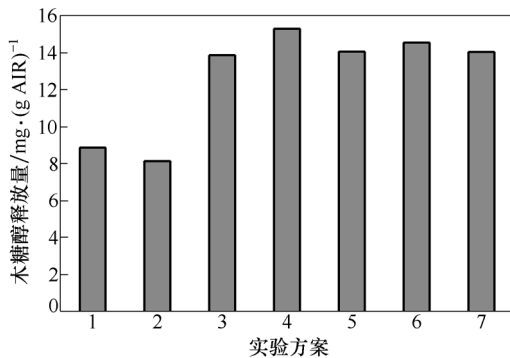


图 4 协同作用方式对木糖释放量的影响

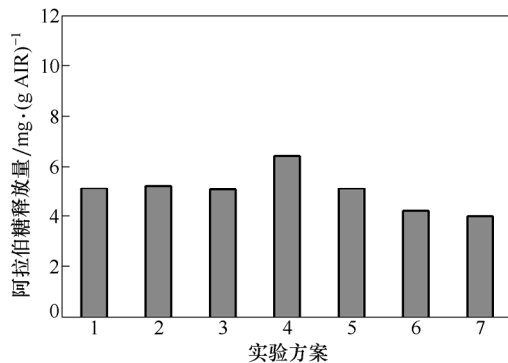


图 5 协同作用方式对阿拉伯糖释放量的影响

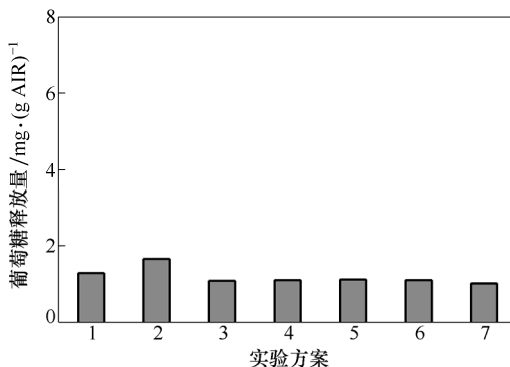


图 6 协同作用方式对葡萄糖释放量的影响

协同方式说明：1—仅 PcFAE 粗酶反应 24 h；2—仅木聚糖酶 XG180 反应 24 h；3—PcFAE 粗酶反应 12 h+木聚糖酶 XG180 反应 12 h；4—木聚糖酶 XG180 反应 12 h+PcFAE 粗酶反应 12 h；5—PcFAE 粗酶反应 6 h+木聚糖酶 XG180 反应 6 h+ PcFAE 粗酶反应 6 h+木聚糖酶 XG180 反应 6 h；6—木聚糖酶 XG180 反应 6 h+PcFAE 粗酶反应 6 h+木聚糖酶 XG180 反应 6 h+PcFAE 粗酶反应 6 h；7—PcFAE 粗酶和木聚糖酶 XG180 同时反应 24 h

(2) 方案 2 取 XG180 粗酶液 15 mL，加入 1.0 g BSG-AIR，反应 12 h 后，加入 15 mL pH 值为 5.0 的缓冲液再反应 12 h。

(3) 方案 3 取 PcFAE 粗酶液 15 mL，加入 1.0 g BSG-AIR，反应 12 h 后，加入 XG180 粗酶液 15 mL 再反应 12 h。

(4) 方案 4 取 XG180 粗酶液 15 mL，加入 1.0 g BSG-AIR，反应 12 h 后，加入 PcFAE 粗酶液 15 mL 再反应 12 h。

(5) 方案 5 取 PcFAE 粗酶液 7.5 mL，加入 1.0 g BSG-AIR 反应 6 h，加入 XG180 粗酶液 7.5 mL 反应 6 h，再加入 PcFAE 液 7.5 mL 反应 6 h，最后加 XG180 液 7.5 mL 反应 6 h。

(6) 方案 6 取 XG180 粗酶液 7.5 mL，加入 1.0 g BSG-AIR 反应 6 h，加入 PcFAE 粗酶液 7.5 mL 反应 6 h，再加入 XG180 粗酶液 7.5 mL 反应 6 h，最后加 PcFAE 粗酶液 7.5 mL 再反应 6 h。

(7) 方案 7 取 PcFAE 粗酶液 15 mL，同时加入 XG180 粗酶液 15 mL，加入 1.0 g BSG-AIR，反应 24 h。

从图 2 可知，只要加入 PcFAE，就有 FA 释放。方案 2 未加入 PcFAE，FA 释放量为 0。酶的添加顺序以方案 4 降解 BSG-AIR 释放 FA 的量最多，可达 0.97 mg/g (BSG-AIR)，对应的 FA 释放量为 54.1%，

方案6次之,说明在协同作用过程中先加入 XG180,反应一定时间后再加入 PcFAE 时,BSG-AIR 释放 FA 和 XOS 的协同效果相对较好。通过木糖和阿拉伯糖的释放情况(图4、图5)也进一步说明 BSG-AIR 中的半纤维素在第4组的协同作用方式下得到了较好的降解。

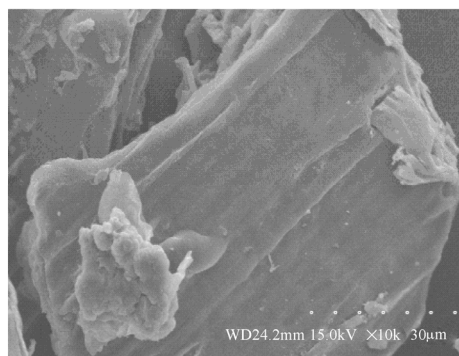
从图3可知,未加 PcFAE 的第1组 XOS 的释放量最小,尽管第1组没有添加 XG180,但是因 PcFAE 粗酶液中存在木聚糖酶,仍有少量的 XOS 的释放,其它组的 XOS 释放量几乎相同,第4组 XOS 释放量相对最大,为 161 mg/g (BSG-AIR)。说明 PcFAE 可增强 XOS 的释放量,有利于 BSG-AIR 中半纤维素的降解,加入顺序对 XOS 释放量影响较小。从图4、图5可知,6种酶加入方式,都有阿拉伯糖及木糖的释放,也进一步说明 PcFAE 及 XG180 含有阿拉伯糖苷酶和木糖苷酶,能降解半纤维素中木聚糖的糖苷键或与木聚糖连结的阿拉伯糖苷键。第4组加入方式,木糖及阿拉伯糖释放量相对最大,这是因为第4组加入方式是先加入木聚糖酶,半纤维素已有一定的初步降解,酶的空间位阻相对最小。比较第4组和第6组的加入方式,其 FA、单糖和 XOS 的释放量都几乎相同,这说明影响木质纤维降解的是其空间结构,而非酶的失活,这与 Faulds 等^[32]的研究结果一致。

从图6可知,6种酶的加入方式,葡萄糖的释放量都极小,说明木质素、半纤维素对纤维素的保护作用还未完全解除。

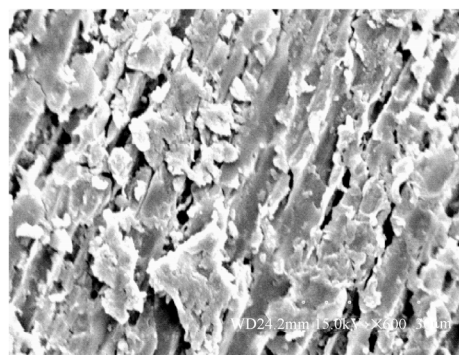
比较6种添加酶的方式,都表明先加入 XG180 而后加入 PcFAE 更有利于 BSG-AIR 的降解。图7表明第4组加入方式所得的酶解后的 BSG-AIR 残渣的干重最小,间接说明 BSG-AIR 木质纤维降解程度最大。本实验结果可推测,木聚糖酶是先水解半纤维素中的木聚糖主链断裂成小分子的片断,降低了 PcFAE 的空间位阻,PcFAE 才进行酯解。

Bartolome 等^[4, 33]研究表明,从复杂的植物细胞壁中释放出 FA 可能有两步骤:第一步为特定的细胞壁降解酶(如木聚糖酶)将细胞壁中的半纤维素降解为分子量相对较小的阿魏酸寡聚多糖,改变细胞壁的物理化学性质;第二步为 PcFAE 作用于在阿魏酸寡聚多糖,使 FA 释放。本实验的结果也证明这一结论。

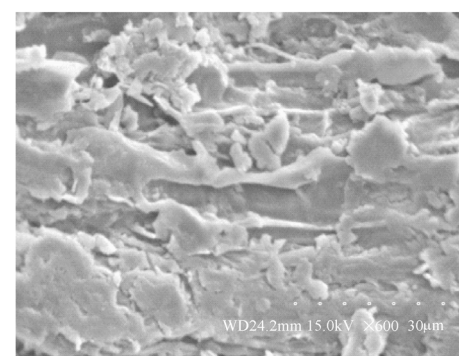
从图2和图3可知,在 pH 值为 5.0、45 °C 下,



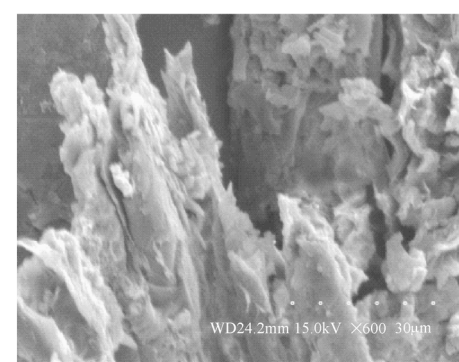
(a) 未经酶处理的BSG-AIR



(b) PcFAE单独酶解后的BSG-AIR



(c) 木聚糖酶XG180单独酶解后的BSG-AIR



(d) 木聚糖酶协同降解后的BSG-AIR

图8 BSG-AIR 结构的扫描电镜图(×600)

取 47.5 U/mL 的 XG180 粗酶液 15 mL, 加入 1.0 g

BSG-AIR, 反应 12 h 后, 加入 40.8 mU/mL 的 PcFAE 粗酶液 15 mL 再反应 12 h, 酶解 BSG-AIR 的效果最好, FA 释放量为 0.97 mg/g (BSG-AIR) (FA 释放率为 54.1%), XOS 的释放量为 161 mg/g (BSG-AIR)。Faulds 等^[34]将 1 kg 的去淀粉麦麸加入 10 L 的水, 加入总单位为 10^5 U 木聚糖酶, 37 °C 反应 16 h, 再加入 PcFAE 17 U, 37 °C 再反应 16 h, 得到 5.7 g 的 FA, 麦麸的 FA 释放率为 57%。本实验结果与之相近。

2.5 BSG-AIR 酶解前后结构的变化

BSG-AIR 酶解前后显微结构图, 见图 8。

由图 8 可见, 未经过酶降解的 BSG-AIR 表面比较光滑, 质地紧密[图 8(a)]; 经过 PcFAE 液降解后的 BSG-AIR 表面出现较深的凹痕[图 8(b)]; 经过 XG180 降解后的 BSG-AIR 与未经酶处理的 BSG-AIR 相比, 表面得多一些破坏但效果不明显[图 8(c)]; 而经过 PcFAE 液和 XG180 协同降解后的 BSG-AIR 横断面均出现了明显的断裂和破损[图 8(d)]。实验表明 BSG-AIR 的三维网状结构在 PcFAE 粗酶液和 XG180 酶液的协同作用下得到了一定程度的破坏。

3 结 论

(1) 橘青霉以 BSG 为唯一碳源培养时, PcFAE 最佳发酵时间为 60 h, 其酶活力为 40.8 mU/mL, 而阿拉伯木聚糖酶最佳发酵时间为 96 h, 其酶活力为 32 mU/mL。PcFAE 产酶最大值比阿拉伯木聚糖酶的产酶最大值提前 36 h。

(2) 在 pH 值为 5.0、45 °C、料液比 1 : 30 (g : mL) 条件下, 取 47.5 U/mL 的 XG180 粗酶液 15 mL, 加入 1.0 g BSG-AIR, 反应 12 h 后, 加入 40.8 U/mL 的 PcFAE 粗酶液 15 mL 再反应 12 h, 酶解 BSG-AIR 的效果最好, FA 的释放量为 0.97 mg/g (BSG-AIR) (FA 的释放量为 54.1%), XOS 的释放量为 161 mg/g (BSG-AIR)。

参 考 文 献

[1] Shin H, Chen R. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517[J]. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2006, 38 (3-4): 478-485.

[2] Moure A, Gullon P, Dominguez H, et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals[J]. *Process Biochem.*, 2006, 41 (9): 1913-1923.

[3] Faulds C B, Sancho A, Bartolome B. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2002, 60 (4): 489-494.

[4] Faulds C B, Williamson G. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 1995, 43 (6): 1082-1087.

[5] Topakas E, Vafiadi C, Stamatis H, et al. *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis[J]. *Enzyme. Microb. Tech.*, 2005, 36 (5-6): 729-736.

[6] Yu P, Maenz D, McKinnon J, et al. Enzymic release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus* ferulic acid esterase[J]. *Can. J. Anim. Sci.*, 2000, 80: 776-777.

[7] 李夏兰, 胡雪松, 范韵敏, 等. 一株产阿魏酸酯酶青霉菌株的筛选、鉴定及生长特征[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(11): 1588-1593.

[8] 李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质[J]. *微生物学报*, 2010, 50 (8): 1058-1064.

[9] Bartolome B, Gomes-sordoves C, Sancho A I, et al. Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339[J]. *Enzyme. Microb. Tech.*, 2003, 32 (1): 140-144.

[10] 刘德海, 杨玉华, 安明理. 纤维素酶活性的测定方法[J]. *中国饲料*, 2002, 17: 27-28.

[11] Ferreira P, Diez N, Faulds C B, et al. Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*[J]. *Bioresource Technol.*, 2007, 98 (8): 1522-1528.

[12] 张晓萍. 低聚木糖各组分高效液相分析方程的建立及应用[D]. 南京: 南京林业大学, 2006.

[13] Bartolome B, Santos M, Jimenez J, et al. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain[J]. *J. Cereal. Sci.*, 2002, 36 (1): 51-58.

[14] Waldron K, Selvendran R. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues[J]. *Physiol. Plantarum*, 1990, 80 (4): 568-575.

[15] Panagiotou G, Olavarria R, Olsson L. *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory: The essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall[J]. *J. Biotechnol.*, 2007, 130 (3): 219-228.

[16] Benoit I, Danchin E, Bleichrodt R, et al. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30 (3): 387-396.

[17] Wong D W. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 133 (2): 87-112.

[18] Fazary A, Ju Y. Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives[J]. *Acta Bioch. Bioph. Sin.*, 2007, 39 (11): 811-828.

[19] Mathew S, Abraham T. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation[J]. *Enzyme. Microb. Tech.*, 2005, 36 (4): 565-570.

[20] Garcia B, Ball A, Rodriguez J, et al. Induction of ferulic acid esterase

(下转第 1108 页)

参 考 文 献

- [1] 张峰. 糠醛下游产品——糠偶姻酯、醚类衍生物的合成与制备[D]. 长春: 吉林大学, 2007: 8-16.
- [2] 王利芳, 郭大光, 任雅琳. 溶剂辅助糠醛精制废润滑油[J]. 化工进展, 2011, 30 (2): 402-406.
- [3] 吴也成. 稀酸加压连续水解生产糠醛 [J]. 甘蔗糖业, 2005 (6): 26-29.
- [4] 刘杰, 封禄田. 糠醛生产方法及产品开发 [J]. 辽宁化工, 1999(2): 28.
- [5] 史伟明, 张楠. 糠醛生产“三废”情况的调查[J]. 黑龙江环境通报, 2002, 26 (1): 57-58.
- [6] Zeitsch K J. Fortuitous radical reactions in furfural and charcoal reactors[J]. *Chemical Innovation*, 2000, 30 (3): 34-38.
- [7] Antal M J J, Leesomboon T, Mok W S. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose[J]. *Carbohydr. Res.*, 1991, 217 (1): 71-85.
- [8] Basta A H, El-Saied H. Furfural production and kinetics of pentosans hydrolysis in corncobs[J]. *Cellul. Chem. Technol.*, 2003, 37 (1-2): 79-94.
- [9] Dunlop A P, Stout P R, Swadesh S. Autoxidation of furfural[J]. *Ind. Eng. Chem.*, 1946, 38 (7): 705-708.
- [10] Dunlop A P. Furfural formation and behavior[J]. *Ind. Eng. Chem.*, 1948, 40 (2): 204-209.
- [11] Williams D L, Dunlop A P. Kinetics of furfural destruction in acidic aqueous media[J]. *Ind. Eng. Chem.*, 1948, 40 (2): 239-241.
- [12] 庄伟强, 刘爱民. 玉米芯制糠醛的工艺条件研究[J]. 化工进展, 2003, 22 (8): 864-865.
- [13] 高礼芳, 徐红彬, 张懿, 等. 高温稀酸催化玉米芯水解生产糠醛工艺优化[J]. 过程工程学报, 2010, 10 (2): 292-297
- [14] Wang Y, Lai V W, Kwong F Y, et al. Synthesis of aryl phosphines via phosphination with triphenylphosphine by supported palladium catalysts [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 9433-9439.
- [15] 李淑君. 植物纤维水解技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 104-105.
- [16] 程能林, 胡声闻. 溶剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994: 843.
- [17] Dunlop A P. Furfural formation and behavior[J]. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1948, 40 (2): 204-209.
- [18] 李翠清, 刘嘉敏, 丁福臣, 等. 胺类化合物对糠醛氧化安定性影响[J]. 石油化工高等学校学报, 2002, 15 (3): 28-30.
- [19] Paul Frøyen. Phosphorus in organic synthesis. Acyloxyphosphonium salts as chemoselective acylating reagents[J]. *Pergamon*, 1997: 5359-5362.
- [20] 杨朝霞, 李梅, 董建军, 等. 高效液相色谱同时测定啤酒中的 5-羟甲基糠醛和糠醛[J]. 酿酒科技, 2006 (9): 88-90.
- [21] McAuley K, Svendsen A, Patkar S, et al. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*[J]. *Acta Crystallogr D*, 2004, 60 (5): 878-887.
- [22] Mandalari G, Bisignano G, Lo Curto R, et al. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products[J]. *Bioresource Technol.*, 2008, 99 (11): 5130-5133.
- [23] Faulds C B, Kroon P, Saulnier L, et al. Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases[J]. *Carbohydr. Polym.*, 1995, 27 (3): 187-190.
- [24] Faulds C B, Ralet M, Williamson G, et al. Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*[J]. *Bba-Gen. Subjects*, 1995, 1243 (2): 265-269.
- [25] Faulds C B, Zanichelli D, Crepin V F, et al. Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: Influence of xylanase[J]. *J. Cereal. Sci.*, 2003, 38 (3): 281-288.
- [26] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. *Process Biochem.*, 2007, 42 (4): 497-509.
- [27] Williamson G, Kroon P, Faulds C B. Hairy plant polysaccharides: A close shave with microbial esterases[J]. *Microbiology*, 1998, 144 (8): 2011-2023.
- [28] Debeire P, Priem B, Strecker G, et al. Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe, *clostridium thermolacticum*—A proposal for its action mechanism on larchwood 4-O-methylglucuronoxylan[J]. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 187 (3): 573-580.
- [29] Liab K, Azadi P, Collins R, et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures[J]. *Enzyme. Microb. Tech.*, 2000, 27 (1-2): 89-94.
- [30] Beaugrand J, Cronier D, Debeire P, et al. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility[J]. *J. Cereal. Sci.*, 2004, 40 (3): 223-230.
- [31] Dervilly-Pinel G, Thibault J, Saulnier L. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans[J]. *Carbohydr. Res.*, 2001, 330 (3): 365-372.
- [32] Faulds C B, Mandalari G, LoCurto R, et al. Arabinoxylan and mono-and dimeric ferulic acid release from brewery's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64 (5): 644-650.
- [33] Bartolome B, Faulds C B, Tuohy M, et al. Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat bran[J]. *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 1995, 22 (1): 65-73.
- [34] Faulds C B, Bartolome B, Williamson G. Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases[J]. *Ind. Crop. Prod.*, 1997, 6 (3-4): 367-374.

(上接第 1102 页)

and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30[J]. *Fems. Microbiol. Lett.*, 1998, 158 (1): 95-99.