

细菌木聚糖酶高产菌的选育及产酶条件^{*}

许正宏 白云玲 孙 微 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

关键词 木聚糖酶, 诱变, 发酵条件

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0440-43

木聚糖是一种在植物体内大量存在的半纤维素,是在自然界中含量仅次于纤维素的一种可再生植物纤维。木聚糖酶(xylanase, EC3.2.1.8)是一类能够特异降解木聚糖的酶类。近年来,人们将其广泛应用于造纸工业的纸浆生物处理,与其他消化酶类一起用作饲料添加剂,以及应用于食品加工工业和纺织工业等。木聚糖酶可以由许多种微生物产生^[1],我国多集中于霉菌木聚糖酶的研究。本文报告了一株细菌木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室分离、保存的木聚糖酶产生菌 WXULI-11 及其突变株 WLUN024。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基(%) 半纤维素 1, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.5, pH8.5。

1.2.2 选择培养基(%) 半纤维素 1, KNO₃ 0.1, MgSO₄ 0.05, NaCl 0.05, K₂HPO₄ 0.05, 琼脂 2, pH8.5。

1.2.3 种子培养基(%) 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.5, pH8.5。

1.2.4 斜面培养基(%) 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 琼脂 2。

1.2.5 基础产酶培养基(%) 麸皮 4, 蛋白胨 0.5, K₂HPO₄ 0.5, pH8.5。

1.3 方法

1.3.1 半纤维素的制备 按文献[2]进行。

1.3.2 透明圈法筛选木聚糖酶产生菌^[3] 将经过富集培养的培养物稀释适当倍数,取 0.5~1.0mL 稀释菌液涂布选择培养基平板,待菌落长出后,复制平板,37℃ 培养至菌落直径约 1~2mm,小心向平板倒入适量无水乙醇,约 1h 后可以观察到清晰的半纤维素水解圈。选取水解圈大者作进一步筛选。

1.3.3 菌种鉴定 参照文献[4]进行。

1.3.4 UV、NTG 诱变 按文献[5]方法。

1.3.5 摇瓶培养方法 本实验如未特别说明,皆采用 250mL 三角瓶装液 30mL,旋转式摇瓶柜转速 220r/min 37℃ 培养。

1.3.6 木聚糖酶活力测定^[6] 发酵液经 4 000r/min 离心 10min 得到上清液,即为粗酶液。将粗酶液用 pH7.6,0.04mol/L 巴比妥钠缓冲液稀释适当倍数后,取 0.5mL 稀释酶液,加入 1mL1% 的木聚糖(Oat Spelt, Sigma)溶液,50℃ 保温 30min 后,用 DNS 法测定还原糖(以木糖为标准)。酶活力定义为上述条件

^{*} 江苏省科委“九、五”攻关课题(BE96042)

作者简介:许正宏(1971—),男,江苏泰州人,无锡轻工大学生物工程学院讲师,硕士,主要从事发酵工程及基因工程方面的研究

收稿日期:1999-03-29,修回日期:1999-07-12 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

下,每分钟释放 1 μ mol 的木糖的酶量为 1 个酶活单位(IU)。

1.3.7 木糖浓度对产酶的影响:将培养约 12h 的种子液于 5 000r/min 离心收集菌体,无菌生理盐水洗涤两次后,再用无菌生理盐水制备成菌悬液。接种于以不同浓度木糖作为唯一碳源代替麸皮的基础产酶培养基中,37℃ 培养 36h 后测其木聚糖酶活力。

2 结果

2.1 木聚糖酶产生菌的筛选

从某造纸厂废水沟取样,样品用适量无菌水稀释,取 1mL 接种富集培养基培养 96h 后,取适量涂布选择平板,选取透明圈大的约 60 株菌进行摇瓶复筛。经反复比较,最后选取一株于 37℃ 在产酶基础培养基中培养 36h,产酶可达 167IU/mL 的菌株,暂名为 WXULI-11。

2.2 WXULI-11 的初步鉴定结果

WXULI-11 在肉汤平板上生长,菌落为四周环状皱褶、中间微凹、灰白略带黄色,生长 2d 后大小在 2~3mm。革兰氏染色阴性,电镜观察为短杆状,无芽胞,无鞭毛。严格好氧,在以简单的有机化合物作为唯一碳源和能源的无机培养基中就可以生长,能利用乙酸盐、琥珀酸盐和乳酸盐。硝酸盐能作为氮源。能利用葡萄糖、蔗糖、半乳糖、棉子糖和木糖以及阿拉伯糖等产酸,但不产气;不能利用乳糖和鼠李糖。该菌的生长温度范围较广,在 4℃—48℃ 之间可生长。在 pH4.5 以下不生长,在 pH9.4 的条件下生长良好。该菌的淀粉水解、尿酶、吲哚、精氨酸双水解酶、氧化酶等实验阴性,过氧化氢酶、明胶水解等实验为阳性。

根据以上结果,将 WXULI-11 初步认定为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

2.3 WXULI-11 的诱变结果

UV 处理菌株 WXULI-11 60s,致死率约为 80%。通过选择平板粗筛及摇瓶复筛,15 号突变株在产酶基础培养基中的产酶可达 250IU/mL,比 WXULI-11 提高 49.7%,将此菌命名为 WLUV-015。

对 WLUV-015 进行 NTG 诱变,处理时间 30min,致死率为 86%,结果表明 WLUV-015 在经过 UV 诱变后再用 NTG 诱变,筛到一株在产酶基础培养基中培养 36h,酶活高达 354IU/mL 的突变株 24 号,命名为 WLUN024。

2.4 碳源对 WLUN024 的产酶影响

2.4.1 不同碳源对产酶的影响:将产酶基础培养基中碳源分别换为 1% 浓度的其它碳源,考察 WLUN024 的产酶情况,结果如表 1。

在以葡萄糖、蔗糖、淀粉等容易利用的物质作为碳源时,该菌几乎不产木聚糖酶,但菌体生长良好。在以含木糖苷类物质的木聚糖、麸皮、自制半纤维素(主要成分为木聚糖)等作为碳源时,该菌能够大量产生木聚糖酶,这一结果与以往的报道类似。由此可以初步推测该菌产木聚糖酶为诱导型,木聚糖是其最好的诱导物。值得一提的是该菌在以一定浓度的木糖为唯一碳源时,也能产生较多的木聚糖酶。

2.4.2 木糖对产酶的影响:不同浓度的木糖对 WLUN024 产酶的影响,结果如图 1。木糖浓度在 1% 以下时,随着浓度的增加,对酶合成有明显促进作用。当木糖浓度在 1%~2% 之间时,酶合成受到明显抑制。当木糖浓度超过 2%,则完全抑制该菌合成木聚糖酶。

2.5 氮源对 WLUN024 产酶的影响

在产酶基础培养基中,将蛋白胨分别替换为不同的氮源(以 N 含量等量计),产酶结果见表 2。

表 1 不同碳源对产酶的影响

碳源种类	酶活/(IU/mL)
木聚糖(Sigma)	190.2
自制半纤维素	118.7
木糖	32.2
麸皮	31.2
葡萄糖	1.98
蔗糖	1.38
淀粉	1.22
纤维二糖	0.50

WLUN024 在不同的氮源中的产酶能力有一定的差别,无机氮源中以铵盐比硝酸盐效果要好,其

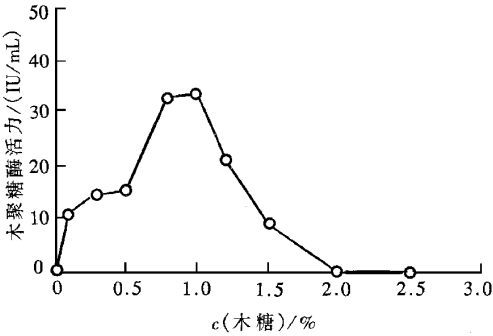


图1 木糖浓度对产酶的影响

中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为最好,可能是因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不仅提供菌体生长所需要的氮源,同时还提供了合成酶蛋白所需的硫源。有机氮源的效果普遍不如无机氮源好。

2.6 其他因子对WLUN024产酶的影响

2.6.1 磷源浓度对产酶的影响:在基础产酶培养基中分别添加不同浓度的 K_2HPO_4 ,观察其对产酶的影响,磷源浓度对产酶的影响并不十分显著。

2.6.2 培养基初始pH对产酶的影响:分别考察不同初始pH对产酶的影响,结果表明初始pH在6.5~8.5之间时,发酵终了pH最终趋于8.5,产酶水平相近。pH过高或过低都不利于产酶。

2.6.3 温度对产酶的影响:分别取不同的培养温度,考察其对产酶的影响,结果表明37℃是最佳发酵产酶温度。30℃时仅为37℃时产酶水平的69%,42℃时为37℃时的54%。

3 讨论

根据对WXULI-11的初步鉴定结果,尤其是该菌的一些生理生化特性,将其初步定为假单胞菌属。但该菌无鞭毛,生长温度范围比文献报道的假单胞菌宽,氧化酶实验阴性,因此该菌究竟是假单胞菌属中的一个新种或稀有种,抑或不属于假单胞菌属,还需作进一步的研究。

前人^[7]研究表明,木糖在不同的微生物合成木聚糖酶时所扮演的角色不同,它对某些木聚糖酶产生菌起诱导酶合成的作用,而对大多数菌株的产酶起阻遏作用。木糖对该菌产酶的影响则具有“双重效应”,即低浓度下的诱导,高浓度的阻遏。

参 考 文 献

[1] 朱 静,严自正.生物工程学报,1996,12(4):375~378.
[2] Breccia J D, Castro G R, Baigri M D, et al. J Appl Bacteriol, 1995, 78: 469~472.
[3] 周世宁,冯建勋,黄 蕾.生物技术,1997,7(2):15~18.
[4] 五大粗.细菌分类基础.北京:科学出版社,1977.44~57.
[5] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册.北京:中国轻工业出版社,1994.383~393.
[6] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J Biotech, 1992, 23: 257~270.
[7] 刘瑞田,曲音波.工业微生物学,1998,28(3):38~42.

表2 氮源种类对产酶的影响

氮源	相对酶活/%	终了 pH
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132	8.3
NH_4Cl	125	8.3
NH_4NO_3	125	8.5
NaNO_3	88	8.5
KNO_3	88	8.7
尿素	99	8.9
味精(99%)	77	9.0
豆饼粉	117	8.5
牛肉膏	96	8.6
酵母膏	111	8.5
蛋白胨	100	8.5

SCREENING AND FERMENTATION CONDITIONS OF A BACTERIAL STRAIN OVER-PRODUCING XYLANASE^{*}

Xu Zhenghong Bai Yunling Sun Wei Tao Wenyi

(School of Biotechnology ,Wuxi University of Light Industry ,Wuxi 214036)

Abstract : A xylanase producer WXULI-11 was isolated and identified as *Pseudomonas* sp. By combination treatment of WXULI-11 with UV and NTG a mutant WLUN024 was obtained and its enzyme activity reached 354IU/mL in 36h by shaking flask. The mechanism of its xylanase production was primarily studied. The results showed that this enzyme was induced by xylan ,xylose and some other xylosic material ,while xylose had " two-way effect "on xylanase synsthesis. Effects of ni-trogen and other factors on enzyme production were also investigated.

Key words : Xylanase ,Mutagenesis ,Fermentation conditions

^{*} The key research project in ' The ninth Five-year Plan 'of Jiangsu Committee of Science and Technology(BE96042)

《微生物学报》近况通报

本刊编辑部于 1999 年 11 月查询了中国科技信息所信息分析中心期刊检索结果 《微生物学报》总被引次数 334 ;影响因子 0.359 ;即年指标 0.079 ;自动总引比 0.11 ;地区分布数 17 ;基金和资助论文比例 0.66 ;指标综合加权评分 49.53。被国际六大检索系统中《CA》《苏联文摘杂志》等收录。

另据中国科学引文数据库 1998 年最新数据统计 ,在被引频次最高的中国科技期刊 5000 名排行表中 ,本刊名列第 68 位 ,并连续五年(1994~1998)入围中国科技期刊《引文频次百名表》。

《微生物学报》编辑部