

产木聚糖酶菌株的选育及其液体发酵条件

陈惠忠 高培基 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南)

从土壤中筛出一株生长快产木聚糖酶活力较高的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) C-2 菌株, 经紫外线和甲基磺酸乙酯诱变, 获得一突变株 An-76, 其生长减缓, 孢子形成能力减弱, 产生的木聚糖酶和 β -木糖苷酶活力分别可达 353.6IU/ml 和 4.5IU/ml。测定了 An-76 的正常产酶曲线, 研究了麸皮、氮源、碳源及半纤维素浓度对产酶的影响。最适培养条件为: 起始 pH6.0、28°C、96h。酶的最适作用条件为 50—55°C, pH4.8, 在 pH1.2—11.4 范围内稳定。酶的热稳定性较差, 55°C 保温 1 小时, 剩余活力为 40%。只有在含木糖苷类物质存在时, An-76 才大量合成木聚糖酶。

关键词 黑曲霉; 木聚糖酶; 诱变

纤维素类物质做为一类大量存在而又可再生的重要潜在资源, 受到越来越广泛的注意。半纤维素是植物性纤维材料的重要组成部分之一, 约占 15—30%, 主要成分为木聚糖。微生物产生的木聚糖酶可将其降解为木糖及少量其它单糖。国外已有不少研究者对黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[1]、木霉 (*Trichoderma* sp.)^[2]、绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*)^[3]、焦曲霉 (*A. ustus*)^[4] 等的木聚糖酶进行了研究, 但有关通过遗传诱变提高产酶活力的报告不多。我们通过广泛筛选, 获得一株产木聚糖酶活力较高菌株 C-2, 经紫外线、甲基磺酸乙酯交替诱变获得一高活力突变株 An-76, 并对其液体发酵条件进行了研究。

材料和方法

(一) 半纤维素的制备

玉米秸粉(济南东郊)粉碎过 1mm 筛。基本上采用 Whistler 和 Feather 法^[5]。乙醇, 氯化钠预浸洗除去可溶性糖和粗蛋白, 氢氧化钠抽提, 乙酸中和, 最后用乙醇将半

纤维素沉淀供菌株筛选用。

(二) 培养基和培养方法

1. 斜面培养基: 10% 麸皮浸汁, 1.6% 琼脂, pH6.0。

2. Mandels 氏营养盐液^[6]。

3. 半纤维素双层平板的制备: 按参考文献[6], 以半纤维素代替纤维素。

4. 产酶培养基: Mandels 氏营养盐液中加总液量 (W/V) 2% 的半纤维素, 0.5% 麸皮, 0.1% 蛋白胨。

5. 培养条件: (1) 初筛: 40ml “L” 弯管中加入 20ml 培养液, 用孢子或孢子悬液接种, 180r/min 旋转式振摇 (WDP 型微生物多用培养箱, 山东大学制造)^[7], 28°C, 4 天。(2) 复筛: 250ml 三角瓶中装 30ml 培养液, 其余与(1)同。

(三) 诱变处理方法

1. 紫外线处理: 制备 10^6 — 10^7 孢子/ml 单孢子悬液, 使成 1mm 左右液层, 30W 紫外灯下, 距 25cm, 照射 5min。

本文于 1988 年 12 月 1 日收到。

2. 甲基磺酸乙酯处理^[8]: 取孢子悬液和甲基磺酸乙酯各 5ml, 置无菌试管中, 充分混合, 28℃, 密封振荡处理 5 小时, 稀释 100 倍中止反应。

(四) 分析方法

1. 培养液在 4℃, 4000 r/min 离心(日立, 55p72) 10min, 上清液即为粗酶液。

2. 木聚糖酶活力^[9]: 取 0.1ml 适当稀释的酶液, 加 1ml 用 0.2mol/L pH4.8 醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖(Sigma Larchwood xylan) 溶液, 50℃ 酶解 30min 用 DNS 法测定还原糖(以木糖计)。

3. β -木糖苷酶活力^[10]: 取 0.1ml 适当稀释的酶液, 加 0.5ml 用 0.2mol/L pH3.8 醋酸缓冲液配制的 2.5mmol/L pNPX (Sigma 公司产品) 溶液, 50℃ 酶解 30min, 加入 4ml 0.25mol/L 碳酸钠溶液终止反应, 在 722 光栅分光光度计上(上海第二分析仪器厂) 410nm 测其吸光度。

4. 内切-葡聚糖酶活力: 取 0.1ml 适当稀释的酶液加 1ml pH4.8 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液配制的 1% 羧甲基纤维素钠(上海天山化学试剂厂) 溶液, 50℃ 酶解 30min, 用 DNS 法测还原糖(以葡萄糖计)。

5. β -葡萄糖苷酶活力: 取 0.1ml 适当稀释的酶液, 加 1ml pH4.8 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液配制的 1% 水杨素溶液, 50℃ 酶解 30min。

6. 胞外可溶性蛋白: Folin 酚法^[11]。

(五) 对比试验用菌株

斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) JU1 (由本室曲音波同志提供)。里斯木霉 (*T. reesei*) QM 9414 (1978 年由美国陆军 Natick 发展中心赠送)。

结 果

(一) 出发菌株的筛选和鉴定

1. 半纤维素双层平板法筛选: 从济南

市郊长期覆盖腐烂植物秸秆的区域采集 5 个土样, 分别配成 1% 悬液。取少量混入上层培养基, 做成双层平板。用 0.3% 胆酸钠作菌落抑制剂, 使菌落直径在 4 天时约 4—5mm。选取一系列单菌落, 经液体摇管初筛后, 测定木聚糖酶和 β -木糖苷酶活力, 取其中酶活力较高的进行摇瓶复筛。其中一株经纯化后, 用作进一步选育的出发菌株, 菌号为 C-2。

2. 菌株的鉴定: 对照“*The Genus Aspergillus*” (Raper & Fennell, 1965) C-2 的主要形态特征, C-2 与黑曲霉 (*Aspergillus niger* van Tieghem) 的形态基本相符。

C-2 在 2% 半纤维素为碳源的产酶培养基中, 菌体生长旺盛, 木聚糖酶和 β -木糖苷酶分别达 112.3IU/ml 和 2.3IU/ml, 并有较高的 β -葡萄糖苷酶活力和一定量的内切-葡聚糖酶活力, 以木糖为碳源时, 也产生木聚糖酶和 β -木糖苷酶。

(二) 高产菌株的诱变选育

筛选诱变过程见图 1。

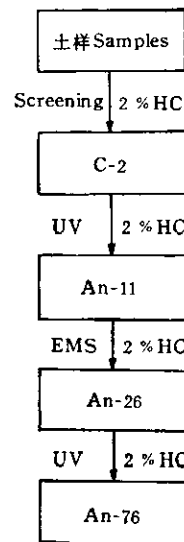


图 1 菌株筛选流程

Fig. 1 Genealogy of the mutants
HC: 半纤维素 Hemicellulose UV: 紫外线
照射 Ultraviolet irradiation; EMS: 甲基
磺酸乙酯 ethyl methane sulfonate

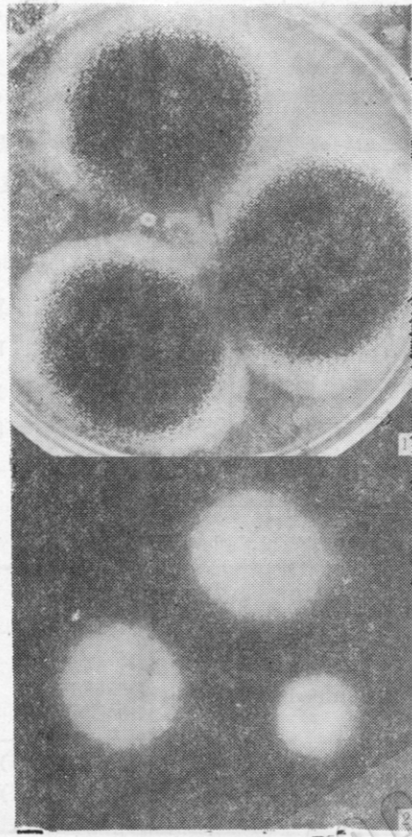


图2 黑曲霉的菌落形态

Fig. 2 The shape of *Aspergillus niger* colony
 1. 黑曲霉 C-2 点种于察氏平皿培养 9 天的菌落形态 The shape of *Aspergillus niger* C-2 colony which grew on the Czapek agar plate after nine incubation.
 2. 黑曲霉 An-76 点种于察氏平皿培养 9 天的菌落形态 The shape of *Aspergillus niger* An-76 colony which grew on the Czapek agar plate after nine incubation.

同 C-2 相比, An-76 菌落的生长明显减慢, 产孢子能力降低(图 2), 只有延长培养时间, 才产生少量孢子, 但在显微镜下, 仍可见少量典型的分生孢子结构, 孢子呈淡棕黑色, 具有原菌株的分类特征。

(三) An-76 常规培养条件下的产酶情况

用产酶培养基研究了 An-76 在常规培养条件下的产酶情况(图 3)。接种开始至 40 小时, 基本上检测不到胞外酶活力, 目测可见此阶段发酵液中的不溶性半纤维素被迅速降解, 菌体生长迅速。40 小时后, 发酵液逐渐澄清, 胞外酶才大量增加, 发酵液 pH 下降。84 小时后, 菌体开始自溶。超声波破碎菌体表明, 部分 β -木糖苷酶以胞内形式存在, 而木聚糖酶在菌体破碎前后的上清液中基本上无差别。

三株突变株的木聚糖酶和 β -木糖苷酶的活力都比出发株有明显提高, 其中 An-76 的两种酶分别为 C-2 的 3.1 和 2 倍。比活也相应提高。出发株和突变株所产的两类木聚糖酶活皆高于 JU1 和 QM 9414 (表 1)。

(四) An-76 的产酶条件

1. 碳源的影响: 分别添加 1% 不同碳源, 进行产酶试验。从表 2 可见尽管在以

表 1 不同菌株在 2% 半纤维素培养基中产酶情况

Table 1 Comparison of the enzyme production of various strains in 2% hemicellulose medium

| 菌株 Strain | β -木聚糖酶活力 β -Xylanase activity | | β -木糖苷酶活力 β -Xylosidase activity | | 可溶性蛋白质 Soluble protein mg/ml |
|--------------|-----------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | IU/ml | IU/mg prot. | IU/ml | IU/mg prot. | |
| C-2 | 112.3 | 12.6 | 2.3 | 0.26 | 8.9 |
| An-11 | 236.2 | 27.1 | 2.9 | 0.33 | 8.7 |
| An-26 | 297.4 | 36.1 | 3.1 | 0.38 | 8.2 |
| An-76 | 353.6 | 42.3 | 4.5 | 0.54 | 8.4 |
| JU-1 | 59.1 | 8.0 | 0.2 | 0.03 | 7.4 |
| QM9414 | 19.4 | 1.8 | 5.5×10^{-3} | 5.1×10^{-4} | 10.7 |

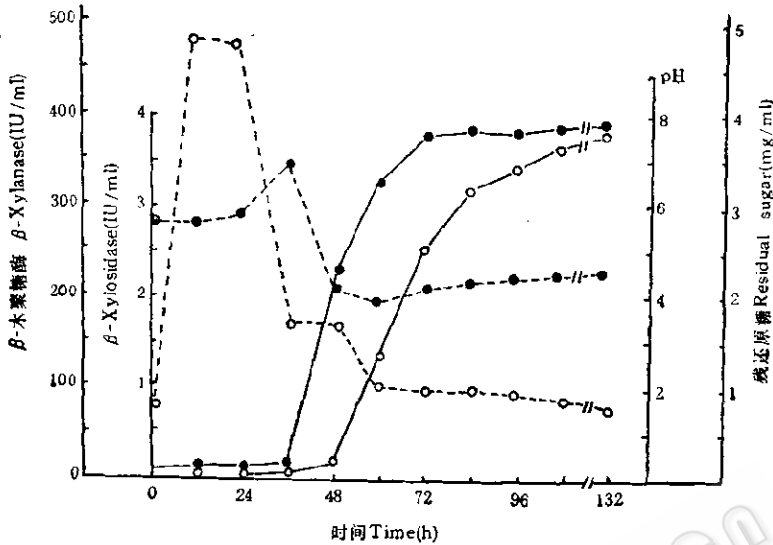


图3 An-76 菌株的产酶曲线

Fig. 3 Course of enzyme production from An-76

●—● β -木聚糖酶活力 β -Xylanase activity; ○—○ β -木糖苷酶活力 β -Xylosidase activity; ●---● pH; ○---○ 残还原糖 Residual reducing sugar

表2 碳源对 An-76 产酶的影响

Table 2 Effect of carbon sources on β -xylanase and β -xylosidase production by An-76

| 碳源 Carbon source (%) | β -木聚糖酶活力 β -Xylanase activity (IU/ml) | β -木糖苷酶活力 β -Xylosidase activity (IU/ml) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 葡萄糖 Glucose | 0.38 | UD* |
| 木糖 Xylose | 20.0 | 0.38 |
| 果糖 Fructose | 0.84 | UD |
| 甘油 Glycerol | 0.20 | UD |
| 甘露糖 Mannose | 0.67 | UD |
| 蔗糖 Sacrose | 0.28 | UD |
| 纤维素 Cellulose | 6.67 | UD |
| 纤维二糖 Cellobiose | 0.37 | UD |
| 淀粉 Starch | 0.33 | UD |
| 半纤维素 Hemicellulose | 170.0 | 0.43 |
| 麸皮 Wheat bran | 144.3 | 0.72 |
| 木聚糖 Xylan | 210.8 | 0.55 |

* UD: 未检出 Undetectable

葡萄糖等碳源中，也可检测到很低水平的胞外酶活，而只有在木聚糖、木糖和麸皮这类含木糖苷类的诱导物中培养，才大量合成胞外酶。

2. 半纤维素浓度的影响：以 Mandels 氏无氮营养盐添加硫酸铵为氮源，研究半纤维素浓度与产酶量的关系。两类酶活在低浓度范围内，随半纤维素浓度的升高呈

近似直线上升。当浓度超过 4%，酶活趋缓至下降，表现出高浓度下的“阻遏”作用。浓度 $\leq 4\%$ ，培养液中并无残糖的累积，在 5% 和 6% 时，残糖量分别为 0.11mg/ml 和 0.39mg/ml。

3. 麸皮的影响：加入不同量的麸皮到含 2% 半纤维素的产酶培养基中，结果表明，木聚糖酶和 β -木糖苷酶分别增加 1.9 和 7.3 倍（麸皮添加量 0.5%）。当添加量 $> 2\%$ 时，虽然菌体生长量增加，而酶量却有下降的趋势。这种“阻遏”作用与半纤

维素浓度的影响相似。麸皮量 $< 0.5\%$ 时，酶活增长速率几乎成直线，尔后减缓，可能原因是麸皮内含两类刺激酶产生的因子，一类是微量生长因子，0.5% 麸皮即可满足需要，另一类为所含的木聚糖等碳源，酶活增加缓慢，反映了后一因子的作用。

4. 氮源的影响：在含 2% 半纤维素的培养基中，分别添加不同氮源，进行产酶试验（表 3）。氮源以硫酸铵、硝酸钠或蛋白胨为佳，尿素抑制菌体生长和酶的形成。

5. 培养基起始 pH 对产酶的影响：试

表 3 氮源对 An-76 生长产酶及培养液 pH 的影响

Table 3 Effect of nitrogen sources on the growth, pH of the culture and enzyme production of An-76

| 培养时间 Time(h) | 48 | | | 72 | | | 96 | | |
|--------------------------------------------------|-----|---------------|------------------------------------------|-----|--------------|------------------------------------------|-----|--------------|------------------------------------------|
| | pH | 生长 Growth* | 木聚糖酶活 Xylanase activity (IU/ml) | pH | 生长 Growth | 木聚糖酶活 Xylanase activity (IU/ml) | pH | 生长 Growth | 木聚糖酶活 Xylanase activity (IU/ml) |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 6.2 | + | 24.8 | 3.3 | ++ | 255.5 | 3.6 | +++ | 267.3 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 6.5 | + | 39.2 | 3.2 | ++ | 229.5 | 3.3 | +++ | 218.9 |
| NH ₄ NO ₃ | 5.7 | + | 9.9 | 3.2 | ++ | 212.1 | 3.2 | +++ | 200.8 |
| NaNO ₃ | 7.5 | + | 6.4 | 4.7 | + | 301.3 | 4.3 | ++ | 317.9 |
| 牛肉膏 Beef extract | 6.0 | + | 16.4 | 3.6 | ++ | 34.2 | 3.8 | +++ | 46.7 |
| 蛋白胨 Peptone | 5.6 | + | 8.4 | 3.3 | ++ | 255.5 | 3.3 | +++ | 228.6 |
| 酵母膏 Yeast extract | 5.6 | + | 9.0 | 3.3 | ++ | 194.1 | 3.6 | +++ | 204.5 |
| 尿素 Urea | 8.5 | - | 7.2 | 8.3 | - | 17.6 | 7.3 | - | 23.9 |

* +: 少量 Small; ++: 中等 Middle; +++: 大量 Large; -: 未见生长 Unvisible

验结果表明，起始 pH5.5—6.5，产酶率最高，生长也旺盛。

6. 最适产酶温度：用产酶培养基，不同温度下进行产酶试验。25℃ 菌体生长缓慢，产酶量低。30℃ 以上，菌体虽生长旺盛，但产酶量低。28℃，产酶量最高。

(五) An-76 木聚糖酶的性质

1. 温度对木聚糖酶活力的影响和酶的热稳定性：酶的最适作用温度为 50—55℃。在 pH4.8，不同温度下预保温 1 小时，50℃ 测定残余酶活力。结果表明，酶的热稳定性较差，超过 50℃，活力丧失严重，

55℃ 时，失活率近 60%。

2. pH 对木聚糖酶活力的影响和酶的 pH 稳定性：在不同 pH 下，50℃ 测定酶活力，酶的最适作用 pH 为 4.8。pH 稳定性试验表明，在 4℃ 冰箱中酶液静置 24h，在 pH1.2—11.4 范围内，酶基本稳定，均保留 80% 以上的活力。

讨 论

筛选高活力木聚糖酶产生菌时，以半纤维素、木聚糖等为唯一碳源制成的双层平板，在菌落周围不能形成清晰的溶解圈，

而难于直接筛出高产突变株, 仍需以摇瓶结果来确定菌株的产酶能力, 工作量相当大。我们利用自己设计制造的一次可放置 200 支“L”形管的培养装置^[7], 可减少试验误差, 提高工作效率, 为高产菌株选育提供了方便条件。

An-76 空长期间, 从 36 小时到 60 小时, 培养液的 pH 由 5.7 降到 3.8, 而此阶段则是酶大量合成的时期。这与纤维素酶的合成过程相类似, 维持一个低的 pH 环境, 是酶大量合成的必需条件之一。

An-76 木聚糖酶的合成调控机制属诱导阻遏型, 只有在木糖类诱导物的存在下, 才大量合成和分泌胞外酶。但当浓度超过一定限度后, 即使是高效的诱导物, 尽管生长加快, 但酶的合成量却迅速下降, 发酵液有还原糖累积。凡在能提高木聚糖酶活力的情况下, β -木糖苷酶活力也相应增加, 暗示了对木聚糖完全降解所必需的这两类酶的合成可能存在相同的调控机制。关于木聚糖酶类生化的机制仍不太清楚。我们关于木糖苷酶的研究结果表明^[13], 其合成与产能代谢有关, 所有有利于产能代谢, 支持快速生长的条件, 包括易利用的碳源, 最适

生长温度, 高浓度的半纤维素等皆抑制酶的产率。诱变得到的高产突变株 An-76, 其菌丝体和孢子形成能力均减弱, 很可能亦为产能代谢途径受限所致。

参 考 文 献

- [1] Gokhale, D. V.: *Biotechnol. Lett.*, **8**: 137—138, 1986.
- [2] Royce, J. C. et al.: *Abstract Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 85 Meet., 236, 1985.
- [3] Mishra, C. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **7**: 295—299, 1985.
- [4] Shamada, T. R. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 178—182, 1986.
- [5] Whistler, R. L. et al.: *Methods in Carbohydrate Chemistry.*, (ed. Whistler, R. L. & Bemiller, J. N.), Academic Press, New York, p. 114—115, 1965.
- [6] 曲音波等: *真菌学报*, **3**(4): 238—243, 1984.
- [7] 高培基等: *工业微生物*, **3**: 32—36, 1989.
- [8] 章名春: *工业微生物诱变育种*, 科学出版社, 北京, P. 125, 1984.
- [9] Khan, A. W. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 373—377, 1986.
- [10] Robert, F. H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 1127—1146, 1983.
- [11] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [12] McCarthy, A. J. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 238—244, 1985.
- [13] 陈惠忠等: *生物工程学报*, **6**(1): 73—75, 1990.

SCREENING OF HIGH YIELD XYLANASE PRODUCING STRAIN AND STUDIES ON ITS SUBMERGED FERMENTATION CONDITIONS

Chen Huizhong Gao Peiji Wang Zunong

(*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan*)

A rapid growing and high xylanase producing fungus *Aspergillus niger* C-2 was isolated from the soil. After combination treatment with UV and EMS, a mutant An-76 which grew slowly and produced small colonies was obtained. The β -xylanase and β -xylosidase activities of culture filtrate of An-76 were 353.6 IU/ml, and 4.5 IU/ml, respectively. Course of the enzyme production and effects of wheat bran, nitrogen and carbon sources, concentration of hemicellulose on enzyme productions were investigated. The optimal culture conditions are following: initial pH 6.0, temperature 28°C, and cultiva-

tion time 96 h. The optimal pH and temperature for xylanase reaction were pH 4.8 and 50—55°C. Xylanase was stable in the pH range 1.2—11.4, but had a weak thermal stability. Having incubated the enzyme at 55°C for 1 h, 40% of enzyme activity remaining. Significant amount of the enzyme was produced only by xylosic materials.

Key words

Aspergillus niger; Xylanase; Mutation