

黑曲霉 An-76 木聚糖酶系的酶学研究

陈惠忠 高培基 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南)

用分子筛和离子交换色谱分离技术, 由黑曲霉 An-76 的木聚糖酶系中分离纯化到一种 β -木糖苷酶 (β X) 和三种内切- β -木聚糖酶组分 (EX1, EX2, EX3)。这几种酶均达到凝胶电泳纯和聚焦电泳纯。用凝胶过滤方法测得 β X 的分子量为 147000, 用凝胶电泳法测得 EX1、EX2 和 EX3 的分子量分别为 23000、22000 和 41000; β X、EX1、EX2 和 EX3 的等电点分别为 4.6、5.9、4.1 和 3.9。本文还研究了各种酶的最适反应温度和 pH、酶的热稳定性和 pH 稳定性; 研究了金属离子和巯基试剂对酶活力的影响、动力学参数、氨基酸组成、底物特异性和反应产物等。各酶组份不具有分解纤维素的交叉活力。巯基试剂能完全抑制 β X 活力, 其活力丧失可被半胱氨酸恢复。

关键词 黑曲霉; 木聚糖酶; 木糖苷酶

木聚糖是由 D-吡喃木糖基通过 β -1, 4-糖苷键连接成的主链, 含有不同量 L-呋喃阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖和 D-吡喃半乳糖基及糖醛酸组成的侧链分枝^[1]。其结构和化学上的异质性, 决定它不能被任何单一酶组分有效地水解。木聚糖酶系主要包括三类: (1) 内切- β -木聚糖酶 (EC 3.2.1.8), 优先在不同位点上作用于木聚糖和长链木寡糖; (2) 外切- β -木聚糖酶 (EC 3.2.1.92), 作用于木聚糖和木寡糖的非还原端, 产生木糖; (3) β -木糖苷酶 (EC 3.2.1.37), 作用于短链木寡糖, 产生木糖^[2]。木聚糖酶系较复杂, 大部分微生物合成一种以上的酶。近几年已报道从曲霉 (*Aspergillus* sp.)^[3]、木霉 (*Trichoderma* sp.)^[4]、裂褶菌 (*Schizophyllum* sp.)^[5]、青霉 (*Penicillium* sp.)^[6]、链霉菌 (*Streptomyces* sp.)^[7]、海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*)^[8] 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)^[9] 等纯化到木聚糖酶。但对一株菌的全部木聚糖酶组分进行深入研究的报道并不多。我们选育到一株高产木聚糖酶的黑

曲霉突变株 An-76, 本文报道对此菌株的粗酶制剂进行系统分离纯化及各酶组分酶学性质的研究结果。

材料和方法

(一) 材料

1. 粗酶制剂: 将 An-76 培养液离心除菌体, 80% 饱和度硫酸铵沉淀, 离心收集沉淀物, 真空干燥成粗酶粉。

2. 色谱分离用凝胶和电泳用药品: Sepharose 6B、Sephadex G-100 均为瑞典 Pharmacia 公司产品; DEAE Bio-gel A 和 CM Bio-gel A 为 Bio-Rad Laboratory 产品; pH3.5—10 的 Ampholine 为瑞典 LKB 公司产品, 产物分析用燕麦木聚糖为 Sigma 公司产品。聚丙烯酰胺凝胶电泳使用的药品均为分析纯或重结晶制品。

(二) 酶的分离鉴定

1. Sephadex G-100 和 Sepharose 6B 凝胶过滤色谱均采用常规方法^[10]。使用

本文于 1988 年 12 月 9 日收到。

2.6×100cm 层析柱,用 pH6.8,10mmol/L 磷酸钠缓冲液洗脱,分部收集,测定 280nm 吸收度 A、木聚糖酶和木糖苷酶的相对酶活力。

2. DEAE Bio-gel A 和 CM Bio-gel A 离子交换:使用 2.6×20cm 层析柱,两种离子交换色谱分别用 0.05mol/L pH6.8 磷酸缓冲液和 pH3.8 醋酸缓冲液平衡、用 0—0.4mol/L 的氯化钠梯度洗脱,收集检测同 1。

3. 聚丙烯酰胺凝胶垂直板式不连续电泳、SDS-聚丙烯酰胺垂直板式不连续电泳和分析用聚丙烯酰胺等电聚焦电泳按文献[11]进行。等电聚焦使用 pH3.5—10 的 Ampholine 作两性载体。

(三) 分析测定方法

1. β -木聚糖酶和 β -木糖苷酶酶活测定按文献[12、13]进行。

2. 蛋白质测定:柱层析时测定各管的

吸光度 A_{280} ,一般分析采用 Lowry 法^[14]。

3. 酚-硫酸法测定酶蛋白中的总糖含量^[15]。

4. 水解产物薄层分析^[16]:采用 Merck 公司的薄层色谱用硅胶板,展开剂为正丁醇:乙醇:水(5:3:2),上行法展开两次后,以苯胺-二苯胺磷酸试剂喷雾显色。

5. 酶蛋白氨基酸组成分析依文献[17]进行。

结 果

(一) 酶组分的分离纯化

黑曲霉 An-76 菌株木聚糖酶系各组分的分离纯化过程见图 1。

在 Sephadex G-100 柱上由各组分分子量的差异区分含木糖苷酶活的 I 和含木聚糖酶活的 II 两部分。酶制剂中的小分子量杂蛋白和色素及部分大分子量杂蛋白可除去。将 I 和 II 分别上 Bio-gel A 阴

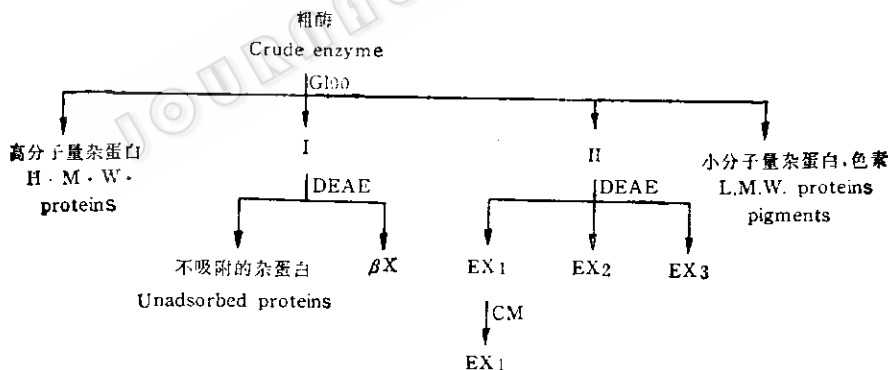


图 1 黑曲霉 An-76 木聚糖酶系组分的分离纯化过程简图

Fig.1 Summary of fractionation and purification scheme for the components of *Aspergillus niger* An-76 xylanases

G100: 葡聚糖凝胶过滤 Sephadex G-100; DEAE: 阴离子交换色谱 DEAE Bio-gel A; CM: 阳离子交换色谱 CM Bio-gel A; β X: β -木糖苷酶 β -xylosidase; EX1, EX2, EX3: 内切- β -木聚糖酶 Endo- β -xylanase

离子交换凝胶柱(图 2, 3),由 I 得一峰形对称,含有 β -木糖苷酶活的蛋白峰 β X。II 可区分成 EX1、EX2 和 EX3 三个 β -木聚糖酶活蛋白峰, EX1 组分不被吸附,随

杂蛋白穿过交换柱。将 EX1 组分再于 Bio-gel A 阳离子交换凝胶柱进一步分离可得纯组分(图 4)。提纯过程总结于表 1。

(二) 酶组分的纯度鉴定和分子量、等

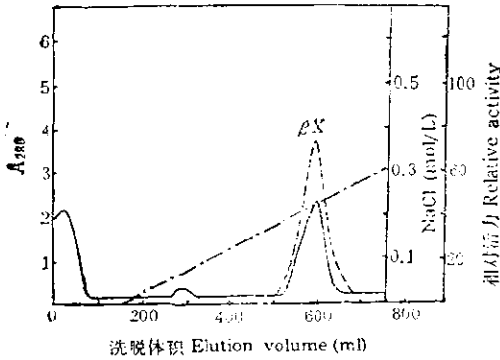


图2 β -木糖苷酶的 DEAE Bio-gel A 柱层析图
Fig. 2 Chromatography of β -xylosidase on DEAE Bio-gel A
— A_{280} ; ---- 相对酶活力 Relative activity;
..... NaCl (mol/L)

电点及含糖量的测定

经分离纯化得到的 4 个酶组分在聚丙烯酰胺凝胶和分析等电聚焦电泳上都表现为单一蛋白带。蛋白质含糖量测定表明,全部酶组分均为糖蛋白。用 Sepharose 6B 凝胶过滤法估算出 β -木糖苷酶分子量、用聚丙烯酰胺凝胶电泳推算三个内切- β -木聚糖酶组分分子量如表 2。

凝胶电泳所得到的分子量同根据酶组分在分子筛色谱中洗脱特性计算的分子量相近,说明它们都不含亚单位,由单一肽链组成。

(三) 各酶组分的酶学性质

1. 酶的最适 pH 和 pH 稳定性: 在不

表 1 An-76 β -木聚糖酶和 β -木糖苷酶的提纯
Table 1 Purification of β -xylanases and β -xylosidase from An-76

提纯步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)		总酶活 Total activity (IU)		比活 Specific activity (IU/mg)		提纯倍数 Purification factor		收率 Recovery (%)	
	EX	β X	EX	β X	EX	β X	EX	β X	EX	β X
粗酶液 Crude enzyme	15120.0	15120.0	750000.0	6975.0	49.6	0.46	1.0	1.0	100	100
硫酸铵沉淀 (NH_4) ₂ SO ₄ fractionation	11945.0	11945.0	690000.0	5928.4	57.8	0.50	1.2	1.1	92.0	85.0
Sephadex G-100	2254.0	84.6	251640.0	3675.9	111.6	43.4	2.25	94.3	33.6	52.7
DEAE Bio-gel A	EX1	455.5	95791.0		210.3		4.2		12.8	
	EX2	281.1	127394.5	2804.7	453.2	116.0	9.1	252.2	17.0	40.2
	EX3	232.6	13863.0		59.6		1.2		1.8	
CM Bio-gel A EX1	187.0		69927.4		373.5		7.6		9.3	

EX: 内切- β -木聚糖酶 Endo- β -xylanase
 β X: β -木糖苷酶 β -xylosidase

同 pH 的 0.2mol/L 缓冲液中 (pH2.2—3.6 甘氨酸-盐酸、pH4.8—5.8 醋酸-醋酸钠、pH8.4—9.2 硼酸-氧化钾-氢氧化钠) 分别测定 EX1、EX2、EX3 水解燕麦木聚糖、 β X 水解对硝基苯- β -木糖苷 (pNPX) 的活力^[12,13]。于 4℃ 不同 pH 缓冲液中放置 24

小时后测残余酶活力。结果表明, EX1 和 EX2 最适 pH 均为 5.0, EX3 为 3.0, 但 EX1 在 pH < 4 时完全失活。 β X 最适 pH 为 3.5—4.0, pH 稳定性范围也较宽, 2.0—8.4 之间基本上对酶活力的恢复无大影响。

2. 酶的最适温度及热稳定性: 分别在

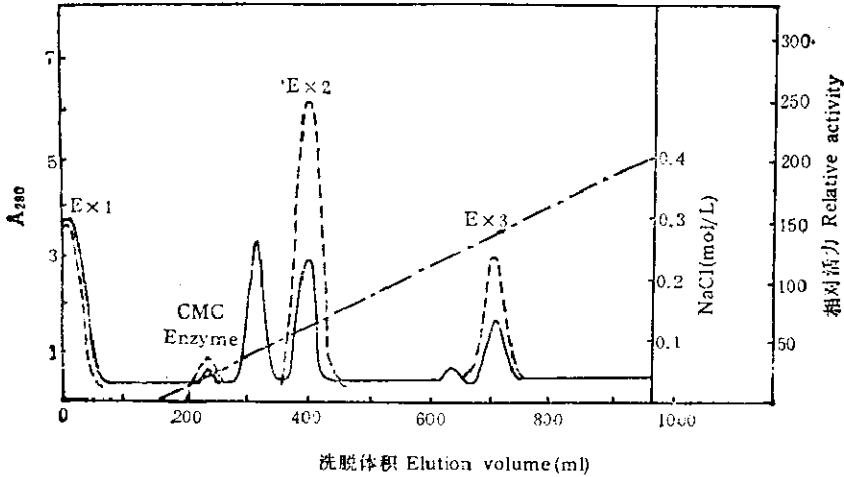


图3 β -木聚糖酶的 DEAE Bio-gel 柱层析图
Fig. 3 Chromatography of β -xylanases on DEAE Bio-gel A
—— A_{280} ; ----- 相对酶活力 Relative activity; - - - - - NaCl (mol/L)

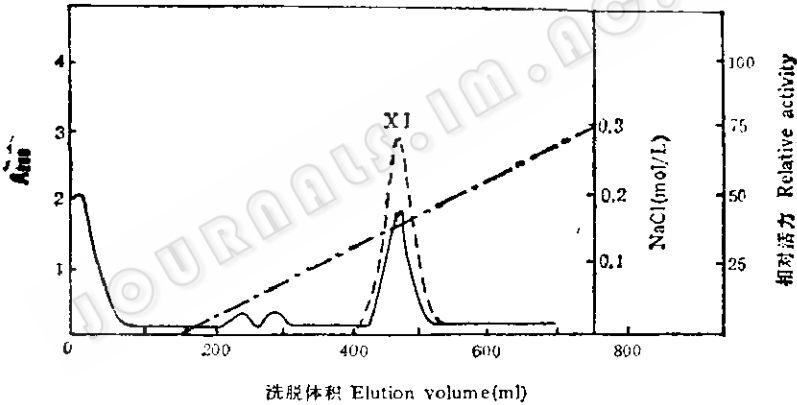


图4 β -木聚糖酶的 CM Bio-gel A 柱层析图
Fig. 4 Chromatography of β -xylanase on CM Bio-gel A
—— A_{280} ; ----- 相对酶活力 Relative activity; - - - - - NaCl (mol/L)

表2 酶组分的分子量、等电点和含糖量
Table 2 Molecular weight, isoelectric point and carbohydrate content of the enzyme components

组 分 Component	测定方法 Method	分 子 量 Molecular weight	等 电 点 Isoelectric point	含 糖 量 Carbohydrate content (%)
EX1	SDS-PAGE	23,000	5.9	12.5
EX2	SDS-PAGE	22,000	4.1	9.4
EX3	SDS-PAGE	41,000	3.9	17.8
β X	GF	147,000	4.6	4.3

SDS-PAGE: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
GF: Sepharose 6B Gel filtration

表3 各种化合物对 β -木聚糖酶和 β -木糖苷酶活力的影响Table 3 Effect of various chemicals on the activity of β -xylanase and β -xylosidase

试剂 Reagent (5mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)			
	EX1	EX2	EX3	β X
Control	100	100	100	100
FeCl ₃	14.1	60.2	37.0	20.9
HgCl ₂	0	0	0	0
CuCl ₂	62.4	52.2	39.5	40.1
BaCl ₂	88.1	101.2	93.9	88.3
CaCl ₂	106.2	101.3	91.2	79.3
MgCl ₂	99.5	106.7	100.7	81.2
MnCl ₂	41.0	57.9	49.4	25.1
NiCl ₂	108.4	104.0	98.8	101.0
SnCl ₂	13.8	98.6	43.0	34.6
ZnCl ₂	101.2	103.6	96.1	14.2
KCl	91.7	104.5	101.3	97.6
LiCl	91.7	104.7	103.3	98.4
KMnO ₄	0	0	0	0
EDTA	93.1	77.4	98.5	46.1
SDS	0	50.4	62.1	0
pCMB*	97.6	100.1	100.0	0

* pCMB: 对-氯汞苯甲酸 p-chloromercuribenzoic acid (0.1mmol/L)

28—85℃(间隔 5℃)下,用常规方法^[12,13]测定EX1、EX2 和 EX3 水解木聚糖、 β X 水解 pNPX 的活力。同时又在上述温度下将酶液预保温 60 分钟,冰浴冷却后,测定其残余活力。结果表明,EX1、EX2和 EX3 组分的最适温度均在 45—55℃, EX1 和 EX2 的热稳定性较差,50—55℃ 以上保温 60 分钟后,酶的催化能力大部分丧失,EX3 在<75℃ 时仍保留大部分酶活力。 β X 最适温度高达 70℃,与 β -木聚糖酶有显著差别,其热稳定性也较好,70℃ 以下基本不失活。

3. 金属离子对酶活力的影响: 在 5mmol/L 浓度下测定了 Hg²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺ 等多种金属离子对酶活力的影响。表 3 表明, Hg²⁺ 和 KMnO₄ 完全抑制各种酶组分的活性。Fe³⁺、Cu²⁺、Mn²⁺ 对各组分有较强烈的抑制, Sn²⁺ 对 EX1、EX3 和 β X 有较强烈的抑制,而对 EX2 无影响。Zn²⁺ 强

烈、抑制 β X 的活性,表明其活力的维持需要某种金属离子的存在。SDS 为变性剂,可使 EX1 和 β X 完全失活,对 EX2 和 EX3 也有一定的抑制作用。

4. 巯基与 β -木糖苷酶活性的关系: 巯基抑制剂对-氯汞苯甲酸(pCMB)对 β -木聚糖酶组分无任何抑制作用,但能完全抑制 β -木糖苷酶的活性(表 3)。加入 pCMB 30 分钟后再加入 8 倍摩尔数的半胱氨酸, β -木糖苷酶活力恢复 93%,证明巯基的存在对于 β -木糖苷酶活是必不可少的。而巯基对 β -木聚糖酶无影响,这是除分子量大小悬殊之外,两类酶的又一重大区别。

5. 酶组分的底物特异性和动力学特性: EX1、EX2 和 EX3 组分都不能作用于 CMC 和 pNPX,即使把酶浓度提高 10 倍,酶解时间延长到 2 小时以上时,也未能从 CMC 底物上检测出还原糖,证明 EX1、EX2 和 EX3 无内切葡聚糖酶交叉活力。

β X 组分除能水解 pNPX 之外,对木聚糖、水杨素和纤维二糖均无作用,全部酶组分都具有较强的底物特异性。

以 0.1—20mg/ml 的燕麦木聚糖为底物测定了木聚糖浓度对 EX1、EX2 和 EX3 组分酶活力的影响,以 0.5—20mmol/L 的 pNPX 测定其对 β X 组分酶活力的影响。以及木糖浓度对各酶组分的抑制作用。用 Lineweaver-Burk 作图法分别求出它们的动力学常数 K_m 和 V_{max} 值。用 Dixon 作用法求出木糖对 β X 的抑制常数 K_i 值。结果表明(表 4),木糖可抑制 β X 活性,但对 EX1、EX2 和 EX3 无抑制作用,甚至木糖浓度达 8mmol/L 时,对酶活力也无影响。EX1、EX2 和 EX3 虽具有相似的底物特异性,但它们的动力学特征常数却各不相同,表明它们是一类催化同一反应的同功酶。

6. β -木聚糖酶组分的水解产物:EX1、EX2 和 EX3 组分分别水解燕麦木聚糖。在 20mg/ml 木聚糖液中加入等体积(5IU/

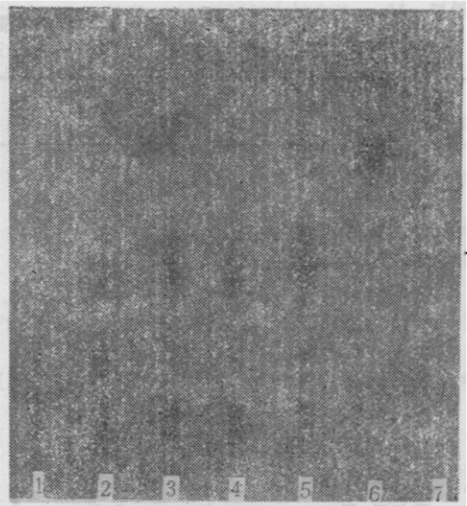


图 5 EX1 水解燕麦木聚糖产物的薄层析图
Fig. 5 Thin layer chromatogram of X1 hydrolyzed oat spelts xylan
水解时间 Hydrolyzing time from 1 to 5: 0.5, 1, 6, 12, 24h; 6. 标准糖: 自上至下为 D-木糖、D-葡萄糖 marker: D-xylose, D-glucose; 7. 标准糖: L-阿拉伯糖 marker: L-arabinose

ml)酶液,封闭下 50℃ 酶解不同时间后,加热灭活,用薄板层析法测定水解产物。结

表 4 β -木聚糖酶和 β -木糖苷酶的动力学常数
Table 4 Kinetic constants of β -xylanase and β -xylosidase

组 分 Component	K_m	V_{max}	K_i^b
X1	6.1mg/ml	2.2IU/ml	—
X2	10.3mg/ml	4.3IU/ml	—
X3	15.9mg/ml	4.2IU/ml	—
β X	1.3mmol/L	0.11IU/ml	11.0mmol/L

a: 对木聚糖 For xylan
b: 对木糖 For xylose

果表明(图5),水解开始至 1 小时以前,产物中检测不出木糖,只有木寡糖混合物随水解时间的延长,才可检测出少量木糖,说明此酶主要以随机方式作用底物内部的 β -1,4-木糖苷键,为内切酶。

7. 酶组分的氨基酸成份 分析和 β -木聚糖酶组分间的关系: 各组分的氨基酸组成见表 5 (表中的氨基酸组成数据为氨基酸残基数的相对百分比)。

根据 Cornish-Bowden^[28] 的通过氨基酸组成来分析蛋白质结构相关性的方法,估算 EX1、EX2 和 EX3 间一级结构的相关性。结果表明,EX1 和 EX2、EX1、EX3 之间无相关性,而 EX2 和 EX3 之间有一定的相关性(其 $S_{\Delta\Delta}$ 为 64.7,强相关性 $S_{\Delta\Delta}<60.1$,弱相关性 $S_{\Delta\Delta}<133.0$)。EX2 和 EX3 在等电点、最适反应温度、动力学常数、对化学试剂敏感性、水解产物、氨基

表5 An-76木聚糖酶各组分的氨基酸组成
Table 5 Amino acid composition of xylanase components from An-76

氨基酸 Amino acid	EX1	EX2	EX3	β X
门冬氨酸 Asp	11.2	12.7	12.5	11.1
苏氨酸 Thr	6.0	12.0	10.0	6.5
丝氨酸 Ser	9.5	10.8	13.5	7.5
谷氨酸 Glu	9.6	6.9	8.2	10.9
甘氨酸 Gly	11.1	15.4	10.2	10.8
丙氨酸 Ala	9.9	6.7	8.2	8.8
半胱氨酸 Cys	2.0	1.4	0.9	0
缬氨酸 Val	7.4	8.4	10.9	7.7
蛋氨酸 Met	4.7	1.1	0	1.0
异亮氨酸 ile	4.1	3.6	3.7	4.0
亮氨酸 Leu	4.9	2.3	3.6	7.4
酪氨酸 Tyr	2.1	5.8	5.2	2.9
苯丙氨酸 Phe	2.5	4.1	4.1	3.4
赖氨酸 Lys	6.9	2.6	1.1	3.9
组氨酸 His	0.7	1.4	0.8	2.4
精氨酸 Arg	4.6	2.5	3.1	6.0
脯氨酸 Pro	3.1	2.2	4.5	5.6
羟基氨基酸 Hydroxyl amino acid	15.5	22.8	23.5	14.1
酸性氨基酸 Acidic amino acid	20.8	19.6	20.7	22.0
碱性氨基酸 Basic amino acid	12.2	6.5	5.0	12.4

酸组成中的羟基类和酸性、碱性氨基酸比例都有一定的相似性,但它们的分子量、最适 pH、温度稳定性等方面都有相当大的差别。

讨 论

来源于真菌的 β -木糖苷酶分子量一般在 10 万道尔顿以上,甚至达 20 多万^[19],而内切- β -木聚糖酶分子量大都小于 6 万道尔顿。本文的结果也与之吻合。

内切 β -木聚糖酶 EX1 和 EX2 的最适温度、pH 及热稳定性与大部分微生物来源的木聚糖酶基本一致,但 EX3 的最适 pH 为 3.0,耐热性也好,其耐热性与最适温度相差较大,在 $>75^{\circ}\text{C}$ 时仍可保留大部分酶活力,这与绝大多数从黑曲霉分离到的酶

不一致,而与 β -木糖苷酶相似。这在木聚糖水解利用中很有价值。

不少微生物来源的内切木聚糖酶具水解 CMC 的交叉活性,既有两种酶活力位于同一蛋白的同一活性中心^[22],也有位于同一蛋白不同活性中心的报道^[23]。John, M. 等人^[24]从一株黑曲霉分离到五个内切- β -木聚糖酶,其中两个能降解微晶纤维素。Fournier, A. R. 等^[25]从另一株黑曲霉中分离到五个内切- β -木聚糖酶,其中四个具有内切- β -葡聚糖酶活。 β X 组分不具有 β -葡萄糖苷酶活和内切- β -木聚糖酶活,与大部分黑曲霉的 β -木糖苷酶底物特异性相似。EX1、EX2 和 EX3 不能水解 CMC, 与从短小芽孢杆菌 (*Bacillus punilus*)^[20] 和康氏木霉 (*Trichoderma koningii*)^[21] 分离到的内

切- β -木聚糖酶的底物特异性一致。从一株黑曲霉分离出的全部内切- β -木聚糖酶组分均无水解 CMC 的底物交叉活性,至今未见报道。

参 考 文 献

- [1] Wilkie, K. C. B.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **36**: 215—224, 1979.
- [2] Frederick, M. M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**: 525—532, 1985.
- [3] Michael, J. et al.: *Can. J. Biochem.*, **57**: 125—134, 1979.
- [4] Hashimoto, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**: 501—508, 1971.
- [5] Paice, M. G. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 802—808, 1978.
- [6] Takenish, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **51**: 458—463, 1973.
- [7] Marui, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 3399—3407, 1985.
- [8] 曾宇成等: 微生物学报, **27**(4): 343—349, 1987.
- [9] Horikoshi, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 2097—2103, 1973.
- [10] 陶慰孙等: 蛋白质分子基础, p. 43, 人民教育出版社, 北京, 1981.

- [11] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, p. 33, 科学出版社, 北京, 1975.
- [12] Khan, A. W. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 373—377, 1986.
- [13] Robert, F. H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 1127—1146, 1983.
- [14] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [15] Dubois, M. et al.: *Anal. Chem.*, **28**: 350, 1956.
- [16] Nakamura, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **61**: 379, 1983.
- [17] 陆音波等: 微生物学报, **28**(2): 121—130, 1988.
- [18] Cornish-Bowden, A.: *Methods in Enzymology*, **91**: 60, 1983.
- [19] Deleyn, F. et al.: *Can. J. Biochem.*, **56**: 43, 1978.
- [20] Parbangred, W. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**: 957, 1983.
- [21] Thomas, M. et al.: *Carbohydrate Research*, **148**: 321—330, 1986.
- [22] Kanda, T. et al.: *J. Biochem.*, **79**: 989, 1976.
- [23] Deshpande, V. et al.: *Biotech. Bioeng.*, **28**: 1832—1837, 1986.
- [24] John, M. et al.: *Can. J. Biochem.*, **57**: 125—134, 1979.
- [25] Fournier, A. R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**: 539—546, 1985.

STUDIES ON XYLANASE SYSTEM FROM *ASPERGILLUS NIGER* An-76

Chen Huizhong Gao Peiji, Wang Zunong

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan)

The components of *Aspergillus niger* An-76 xylanase system, a β -xylosidase (β X) and three endo- β -xylanases (X1, X2, X3), were purified by gel filtration and ion exchange. All of them showed homogeneity in the gel electrophoresis and polyacrylamide gel isoelectric focusing. The molecular weight of β X was 147000 as estimated by gel filtration, and X1, X2, X3 were 23000, 22000, 41000 respectively as estimated by SDS gel isoelectrophoresis. The isoelectric points of β X, X1, X2, and X3 were 4.6, 5.9, 4.1 and 3.9 as

estimated by disc gel isoelectric focusing. Properties of the purified enzymes and the hydrolysis products of xylan were intensively investigated. All of the components of xylanase can not degrade CMC. pCMB can inhibit β X activity, but addition of an excess of cysteine resulted in complete recovery of the lost activity.

Key words

Aspergillus niger; Xylanase; Xylosidase