

## 酸性木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件\*

陈红歌<sup>1</sup> 朱 静 梁改芹 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 从 150 株真菌中筛选到 8 株产木聚糖酶活力在 100U/mL 以上的菌株,其中活力最高的为黑曲霉(编号 149)(*Aspergillus niger*)。该菌株产酶较适培养基为:麸皮半纤维素 4%, NaNO<sub>3</sub> 1%, 麸皮 1%, 用不加(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和尿素的 Mandels 氏营养盐液配制。28℃~30℃ 振荡培养 60h, 酶活力最高可达 375.2 U/mL。该酶最适作用 pH 为 4.6, 在 pH3~11 之间基本稳定。该菌株发酵液中含有木聚糖酶(相对活力 100)外还有淀粉酶(1.8), 甘露聚糖酶(0.98), β-木糖苷酶(0.94)和纤维素酶(0.17)。

**关键词** 黑曲霉, 木聚糖酶, 发酵条件

**分类号** Q55 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0350-54

木聚糖酶(1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC. 3.2.1.8)以内切方式水解木聚糖分子中的 β-1,4-木糖苷键,其水解产物主要是木二糖和木寡糖,也有少量木糖和阿拉伯糖。该酶具有广泛的应用前景,如用于纸浆生物漂白,减少环境污染,还可加入饲料中,改善其营养价值。

国外已有不少研究者对黑曲霉<sup>[1]</sup>、木霉(*Trichoderma* sp.)<sup>[2]</sup>等真菌及短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)<sup>[3]</sup>、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)<sup>[4]</sup>等细菌的木聚糖酶进行了研究,国内也有这方面的研究报道<sup>[5,6]</sup>。作者以将木聚糖酶用于纸浆生物漂白为目的,筛选了产酸性木聚糖酶活力较高、基本不产纤维素酶的菌株,并对该菌的产酶条件进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

本实验室收集保藏及从土壤中分离的菌种。

### 1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基:查氏琼脂培养基。

1.2.2 初筛培养基:4%麸皮培养液。

1.2.3 产酶基础培养基:2%麸皮半纤维素,0.2%硫酸铵和 0.05%尿素, Mandels 氏营养盐液<sup>[7]</sup>(不加硫酸铵和尿素),麸皮 1%。

1.2.4 培养条件:100 mL 三角瓶装液量 17.5 mL,接入一环孢子,置于旋转式摇床(转速为 220r/min)上,28℃~30℃ 培养 72h。

\* 国家“九五”科技攻关项目(No. 96-C03-02-03)

1 在本实验室学习的河南农业大学生物工程学院教师

收稿日期:1998-04-01,修回日期:1999-02-09

### 1.3 酶活力测定方法

**1.3.1 木聚糖酶活力:**发酵液经过滤得清液,即为酶液。取 0.1 mL 适当稀释的酶液,加入到 0.1 mL 用 0.2mol/L、pH4.6 醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖(Birchwood xylan)溶液中,50℃ 反应 15 min, DNS 法测定还原糖(以木糖为标准)。在上述条件下,每分钟产生的还原糖相当于 1  $\mu\text{mol}$  木糖的所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

**1.3.2 淀粉酶活力、纤维素酶活力和甘露聚糖酶活力:**方法同上,只是将底物分别换成可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠(CMC)和甘露聚糖。酶活力单位定义均同上。

**1.3.3 糖苷酶活力:**取 100 $\mu\text{L}$  2mmol/L 不同对硝基酚糖苷底物,加入 0.2mol/L、pH4.6 醋酸缓冲液 50 $\mu\text{L}$ ,再加入一定浓度的酶液 50 $\mu\text{L}$ ,于 50℃ 保温 10min 后加入 3mL 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应,测定 400nm 的光吸收。对硝基酚摩尔吸收系数为  $1.74 \times 10^4 \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。在上述条件下,每分钟释放 1 $\mu\text{mol}$  对硝基酚所需的酶量为一个活力单位(U)。

### 1.4 主要化学试剂及仪器

稻草半纤维素和麸皮半纤维素为自制,方法参照文献[8]。

木聚糖(Birchwood xylan 及 Oat spelts xylan)、对硝基酚- $\alpha$ -葡萄糖苷、对硝基酚- $\beta$ -葡萄糖苷、对硝基酚- $\beta$ -甘露糖苷、对硝基酚- $\beta$ -木糖苷及对硝基酚- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷均为 Sigma 产品。

721 分光光度计为上海第三分析仪器厂出品,pH 计为 Cole-Parmer 产品。

## 2 结果

### 2.1 木聚糖酶产生菌的筛选

用初筛培养基对 150 株真菌产木聚糖酶及纤维素酶的能力进行测定,其中有 121 株真菌产木聚糖酶。活力在 100 U/mL 以上的有 8 株,其中编号为 149 的产酶活力最高,达 162 U/mL,而纤维素酶活力极低。根据对编号 149 菌株的初步观察,该菌为黑曲霉。以下试验均以该菌株进行。

### 2.2 产酶条件

由于初筛麸皮培养液成分复杂,因此改用合成的产酶基础培养基来研究产酶条件。

**2.2.1 碳源的影响:**在产酶基础培养基中,试验了 4 种碳源,浓度为 2%。结果(表 1)表明,以木聚糖为碳源时,菌株 149 产酶活力最高,其次为麸皮半纤维素,木糖对产酶有抑制作用。由于木聚糖系统试剂,价格较高,因此以下试验均用自制的麸皮半纤维素作为碳源。

**2.2.2 氮源的影响:**在基础培养基中,以 2% 麸皮半纤维素为碳源,将其中的 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.05\%$  尿素换成其它氮源,pH 为 6.0,进行试验,结果见表 2。以  $\text{NaNO}_3$  为氮源酶活力最高,其余酶活力稍低,彼此之间差别不大。

**2.2.3 生长因子的影响:**在基础培养基中,以 2% 麸皮半纤维素为碳源,1%  $\text{NaNO}_3$  为氮源,将其中的麸皮分别换成玉米浆和酵母膏进行试验。结果表明,加入麸皮时酶活力最高,加入玉米浆和酵母膏时酶活力分别是麸皮的 48.2% 和 85.7%。

表 1 碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on xylanase production

碳源 Carbon source	木聚糖酶活力 Xylanase activity (U/mL)
木糖 Xylose	40.5
木聚糖 Oat spelts xylan	283.4
麸皮半纤维素 Wheat bran hemicellulose	251.7
稻草半纤维素 Rice straw hemicellulose	177.5

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on xylanase production

氮源 Nitrogen source	浓度 Concentration /%	木聚糖酶活力 Xylanase activity (U/mL)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	220.0
$\text{NaNO}_3$	1.0	280.8
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.0	230.1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	239.4
Tryptone	1.0	244.5
Tryptone + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 + 0.5	250.6
Tryptone + $\text{NaNO}_3$	0.5 + 0.5	247.3

2.2.4 碳源、氮源和生长因子的合适浓度:在基础培养基中,用麸皮半纤维素、 $\text{NaNO}_3$  和麸皮进行正交试验( $L_93^3$ ),以求得三者较适浓度(表 3)。

表 3 正交试验  $L_93^3$ 

Table 3 Experiment of straight-cross

处理组号 Number of treatment	麸皮半纤维素 Wheat bran hemicellulose/%	$\text{NaNO}_3$ /%	麸皮 Wheat bran/%	木聚糖酶活力 Xylanase activity/(U/mL)
1	2	0.5	0.5	225.3
2	2	0.7	1.0	233.4
3	2	1.0	1.5	259.8
4	3	0.5	1.0	317.1
5	3	0.7	1.5	329.4
6	3	1.0	0.5	337.2
7	4	0.5	1.5	338.7
8	4	0.7	0.5	344.1
9	4	1.0	1.0	354.9

对以上试验结果进行分析可知:(1)第 9 个处理组合为最优组合,即在基础培养基中,以 4% 麸皮半纤维素为碳源,1%  $\text{NaNO}_3$  为氮源、1% 麸皮为生长因子时酶活力最高,可达 354.9 U/mL。(2)三个因子中,麸皮半纤维素对产酶影响最大,其次是  $\text{NaNO}_3$ , 麸皮的影响最小。

2.2.5 通气量对产酶的影响:在 250mL 三角瓶中装入 25mL、50mL 和 75mL 上述优化的产酶培养基,结果酶活力分别为 367.9 U/mL、351.7 U/mL 和 250.6 U/mL。可见,菌株 149 产木聚糖酶需要有足够的通气量。

2.2.6 产酶时程:从培养 24 h 开始测定酶活力,以后每隔 12 h 测定一次,直到 120 h,结果如图 1 所示。该菌 24 h 即开始产酶,培养 60 h 酶活力已达高峰(375.2 U/mL),以后缓慢下降。

### 2.3 最适作用 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 值的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液中测定酶活力,该酶的最适作用 pH 为 4.6。将酶液调至不同的 pH 值,45℃ 下放置 0.5 h,适当稀释后按常规方法测定酶活力,以不调 pH 值的酶液作对照,结果(图 2)表明,该酶在 pH3~11 之间基本稳定,45℃ 放置 0.5 h 后

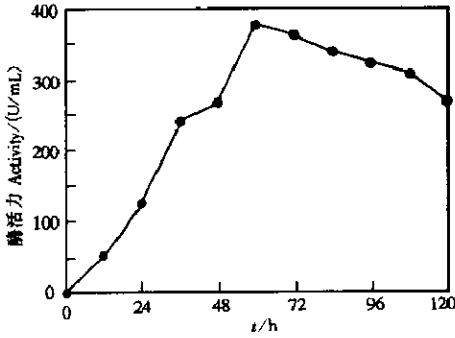


图1 黑曲霉 149 产酶曲线

Fig. 1 Course of enzyme production from strain 149

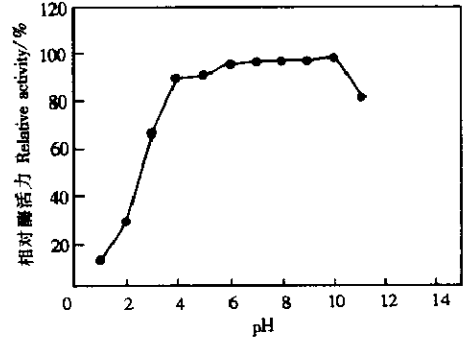


图2 木聚糖酶的 pH 稳定性

Fig. 2 pH stability of xylanase

剩余酶活力均在 80% 以上;在 pH 4~8 之间剩余酶活力均在 95.5% 以上;在 pH 2 时尚有 30% 酶活力。

#### 2.4 储存稳定性

在粗酶液中加入 2mmol/L  $\text{NaN}_3$ , 然后置于 4℃ 冰箱储存。15 d 后, 酶活力保留 96.9%, 75 d 后, 酶活力仍保留 77.1%, 说明该酶比较稳定。

#### 2.5 黑曲霉 149 发酵液中糖苷酶活力的测定

用初筛培养基制得发酵液, 测定其中各种糖苷酶活力, 结果见表 4。其中主要为木聚糖酶, 达 165.8 U/mL; 其它如淀粉酶、甘露聚糖酶及  $\beta$ -木糖苷酶的活力都很低, 纤维素酶仅 0.29 U/mL。

表 4 发酵液中糖苷酶的活力

Table 4 Glycosidases activity of culture filtrate

糖苷酶 Glycosidases	底物 Substrates	酶活力 Enzyme activity/(U/mL)
木聚糖酶 Xylanase	木聚糖 Xylan	165.80
$\beta$ -木糖苷酶 $\beta$ -Xylosidase	对硝基酚- $\beta$ -木糖苷 pNP- $\beta$ -xyl	1.56
淀粉酶 Amylase	可溶性淀粉 Soluble starch	3.04
$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase	对硝基酚- $\alpha$ -葡萄糖苷 pNP- $\alpha$ -glc	0.04
纤维素酶 Cellulase	CMC	0.29
$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -Glucosidase	对硝基酚- $\beta$ -葡萄糖苷 pNP- $\beta$ -glc	0.84
甘露聚糖酶 Mannanase	甘露聚糖 Mannan	1.63
$\beta$ -甘露糖苷酶 $\beta$ -Mannosidase	对硝基酚- $\beta$ -甘露糖苷 pNP- $\beta$ -man	0.10
$\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	对硝基酚- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷 pNP- $\beta$ -glcNAc	1.35

### 3 讨论

黑曲霉 149 在以木糖为碳源时所产木聚糖酶活力较低, 而在以木聚糖、半纤维素为碳源时酶活力则很高, 说明木聚糖酶属于诱导酶。从该菌的生长时间与产酶关系看, 木聚糖酶在菌的生长前期即大量产生, 表明该酶可能涉及到为菌丝的生长提供营养物质。

该菌所产木聚糖酶的最适作用 pH 为 4.6, 在 pH3~11 之间基本稳定, pH2 还有活力, 因此, 作者认为该酶为酸性酶, 具有较好的 pH 稳定性。

在已报道的木聚糖酶产生菌中, 大部分菌同时都产生较多纤维素酶, 如绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*)<sup>[9]</sup>, 奇异长喙菌 (*Ceratocystis paradoxa*)<sup>[10]</sup>, 脱叶链霉菌 (*Streptomyces exfoliatus*)<sup>[11]</sup> 等。而菌株 149 酶系中以木聚糖酶为主, 几乎不产纤维素酶, 此特性以及所产木聚糖酶具有较好的 pH 稳定性和储存稳定性, 为其应用于纸浆生物漂白提供了极大的可能。

### 参 考 文 献

- [1] Gokhale D V. *Biotechnol Lett*, 1986, 8:137~138.
- [2] Royer J C, Nakas J P. *Abstract Annu Meet Am Soc Microbial*, 1985, 85 Meet, 236.
- [3] Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S et al. *Enzyme Microb Technol*, 1985, 7:295~299.
- [4] Esteban R, Villanueva J R, Villa T G. *Can J Microbial*, 1982, 28:733~739.
- [5] 陈惠忠, 高培基, 王祖农. 微生物学报, 1990, 30(5):351~357.
- [6] 刘月英, 郑忠辉, 付欲晓等. 微生物学通报, 1993, 20(6):331~335.
- [7] 曲音波, 高培基, 王祖农. 真菌学报, 1984, 3(4):238~243.
- [8] 北京大学制药厂编. 微生物和酶学基本知识. 北京: 科学出版社, 1971. 201.
- [9] Mishra C, Seeta R, Rao M. *Enzyme Microb Technol*, 1985, 7:295~299.
- [10] Dekker R F H, Richard G N. *Carbohydr Res*, 1975, 39:97~114.
- [11] Sreenath H K, Joseph R. *Folia Microbiol*, 1982, 27:107~115.

## SCREENING OF ACIDIC XYLANASE PRODUCING STRAIN AND STUDIES ON ITS ENZYME PRODUCTION CONDITIONS\*

Chen Hongge Zhu Jing Liang Gaiqin Yan Zizheng Zhang Shuzheng  
(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

**Abstract** From 150 fungal strains, the authors found 8 strains contained mainly of xylanase activity over 100 U/mL in which the No. 149 strain was the highest xylanase producer. Which tentatively identified as *Aspergillus niger*. The appropriate medium composition was as follows: wheat bran hemicellulose 4%; NaNO<sub>3</sub> 1%; wheat bran 1% prepared in Mandels nutritional solution without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and urea. After cultivated in shake-flask at 28°C~32°C for 60h, the activity reached the highest value of 357.2 U/mL. The optimum pH of xylanase was 4.6 and it was stable at pH3~11. The fermented broth of strain 149 contained in addition to xylanase (relative activity 100) also included amylase(1.8), mannanase(0.98), β-xylosidase(0.94) and cellulase(0.17).

**Key words** *Aspergillus niger*, Xylanase, Fermentation conditions

\* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No.96-C03-02-03)