

焦曲霉产木聚糖酶的研究*

朱 静 王 皓 梁改芹 严自正

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从 1144 株真菌中筛选到一株产木聚糖酶活力较高的焦曲霉(*Aspergillus ustus*)。该菌株适宜的产酶条件为在 4% 麸皮液中添加 0.5% 葡萄糖, 0.4% 硝酸钠及 0.1% 氯化钠, 30℃ 振荡培养 6d, 木聚糖酶活力可达 2176 u/mL。酶反应的最适温度为 55℃, 最适 pH 为 5.5, 在 pH5~8 酶活力稳定。45℃ 保温 1h, 酶活力剩余 35%。酶水解桦木木聚糖的 K_m 值为 4.3×10^{-3} g/mL, V_{max} 值为 4.9 mg/(mL·min)。酶解产物以木三糖和木四糖为主, 表明该酶是一种典型的内切糖苷酶。

关键词 焦曲霉, 木聚糖酶, 糖苷酶

分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0075-78

木聚糖酶(1,4- β -D-xylan xylanohydrolase EC 3.2.1.8)是一种内切酶, 它随机切割木聚糖中的木糖苷键, 生成木寡糖和 D-木糖。该酶具有极大的应用价值, 可用于纸浆的漂白以减少环境污染^[1], 也可将造纸工业及农业废料中的木聚糖转化为 D-木糖而加以利用^[2]。国外对木聚糖酶的研究已有不少报道^[3,4], 国内则较少。作者筛选到一株产木聚糖酶、其酶解产物以木三糖和木四糖为主、且国内外较少报道的焦曲霉。本文报道焦曲霉木聚糖酶的液体发酵条件和粗酶液的性质。

1 材料和方法

1.1 菌种

菌株从采自河南的土样中分离, 并由本所齐祖同教授鉴定定名为焦曲霉(*Aspergillus ustus*)。

1.2 化学试剂

燕麦木聚糖, 桦木木聚糖, 松木木聚糖和 D-木糖购自 Sigma 公司, 麸皮购自当地面粉厂。

1.3 培养基和培养方法

1.3.1 菌种分离及培养: 采用马丁及察氏斜面培养基, 30℃, 培养 7d。

1.3.2 液体培养: 基础培养基为 4g 麸皮加自来水 100mL, 自然 pH(一般为 6.5)。250mL 三角瓶装 50mL 基础培养基, 15 磅灭菌 30min, 接入察氏斜面上生长的菌种, 30℃ 振荡培养 5d。

* 国家“九·五”科技攻关计划项目(No. 96-C03-02-03)。

收稿日期: 1997-08-19, 修回日期: 1998-04-22。

1.4 分析方法

1.4.1 酶液的制备: 发酵终了时先用 pH 试纸测定发酵液的 pH, 然后将其过滤或离心, 上清液即为酶液。

1.4.2 木聚糖酶活力的测定: 取适当稀释的酶液 0.1mL, 加入用 0.2mol/L, pH4.5 的醋酸缓冲液配制的 1% 桦木木聚糖溶液 0.1mL, 50℃ 反应 15min。用 DNS 法^[5]测定还原糖(以木糖计)。在上述条件下, 每小时释放 1mg 木糖的酶量为 1 个酶活力单位。

1.4.3 薄层层析法: 展开剂: 正丁醇: 吡啶: 水 = 6:4:3, 显色剂: 2% 二苯胺丙酮溶液: 2% 苯胺丙酮溶液: 85% 磷酸 = 5:5:1, 80℃ 显色 10min。

2 结果和讨论

2.1 木聚糖酶产生菌的筛选

2.1.1 菌种分离: 用马丁培养基分离了采自北京、河南等地的土样 166 个, 共挑出单菌落 1144 个, 接入察氏斜面。

2.1.2 产木聚糖酶菌种的筛选: 将上述 1144 株菌分别接入基础培养基中。30℃ 振荡培养 5d, 测定木聚糖酶活力。共筛选出产酶活力高于 1000u/mL 的菌种 17 株。

2.1.3 菌种鉴定: 对选出的 17 株菌进行鉴定, 大部分为黑曲霉, 仅 1 株为焦曲霉。以下试验用焦曲霉进行。

2.2 产酶条件试验

2.2.1 不同浓度麸皮对产酶的影响: 以相对酶活力最高的为 100%, 结果(表 1)表明, 当麸皮浓度为 4% 时, 酶产量最高。

用此培养基进行以下各项试验以及用此培养基生成的酶液进行性质测定。

2.2.2 附加碳源的影响: 在基础培养基中加入 0.5% 的各种附加碳源进行试验, 结果(表 2)表明, 添加葡萄糖或糊精酶产量最高, 与对照相比酶活力提高了 22%。

表 1 不同浓度麸皮对产酶的影响

Wheat bran/%	Relative activity/%
1	48.5
2	47.7
3	64.6
4	100.0
5	93.8

表 2 附加碳源对产酶的影响

Carbon source	Final pH	Relative activity/%
Control	6.5	100
Glucose	7.0	122
Maltose	6.5	81
Lactose	6.5	73
Dextrin	6.0	122
Soluble starch	6.5	100
Potato starch	6.5	108
Corn starch	6.5	103

2.2.3 附加氮源的影响: 在基础培养基中加入 0.4% 的各种附加氮源进行试验, 结果(表 3)表明, 用玉米浆或 NaNO_3 为附加氮源时酶产量最高, 比对照提高了约 3 倍。

2.2.4 无机盐对产酶的影响: 在基础培养基中加入 0.1% 不同无机盐进行试验, 结果(表 4)表明, 添加 NaCl 时酶产量较高, 比对照提高了 20%。

表 3 氮源对产酶的影响

Table 3 Effect of nitrogen sources on xylanase production

Nitrogen source	Final pH	Relative activity/%
Control	6.6	100
NaNO ₃	6.5-7.0	313
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5	88
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.5	131
Yeast extract	7.5	44
Tryptone	7.5	163
Corn syrup	6.5	313

表 4 无机盐对产酶的影响

Table 4 Effect of salt on xylanase production

Salt	Final pH	Relative activity/%
Control	6.5	100
NaCl	6.0	120
CaCl ₂	7.0	28
MnSO ₄	6.0	108
ZnSO ₄	6.0	44

2.2.5 产酶时间曲线: 在基础培养基中添加 0.5% 葡萄糖, 0.4% NaNO₃ 及 0.1% NaCl, 接种后定时取样测定木聚糖酶活力。由图 1 可见, 产酶从第 3 天开始, 第 6 天达到最高(2170 u/mL), 之后开始下降。

2.3 木聚糖酶的性质

2.3.1 酶的最适温度和最适 pH: 分别在不同温度下按常规方法测定酶活力, 结果表明, 酶反应的最适温度为 55℃。用不同 pH 值的磷酸缓冲液配制底物, 按常规方法测定酶活力, 结果表明, 酶反应的最适 pH 为 5.5。

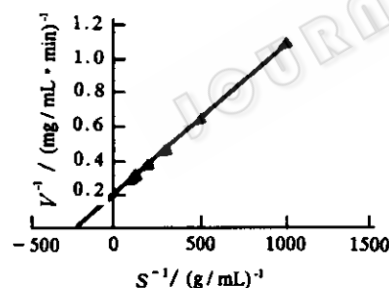


图 2 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.2 The curve of Lineweaver-Burk

2.3.2 酶的温度稳定性和 pH 稳定性: 将酶液在不同温度下保温不同时间, 按常规方法测定酶活力。以不保温的酶活力作为 100% 计算, 结果表明, 45℃ 保温 1h, 酶活力丧失 65%; 50℃ 保温 1h, 酶活力丧失 98%, 可见该酶的热稳定性较差。将酶液调至不同的 pH 值, 室温下放置 30min, 适当稀释后测剩余酶活力, 以不调 pH 值的酶液作对照, 结果酶液在 pH5.0~8.0 稳定。

2.3.3 K_m 值和 V_{max} 值: 木聚糖浓度分别为 1.5%, 1.0%, 0.8%, 0.5%, 0.4%, 0.2% 及 0.1%, 加入适量酶液(使反应保持在初速度)

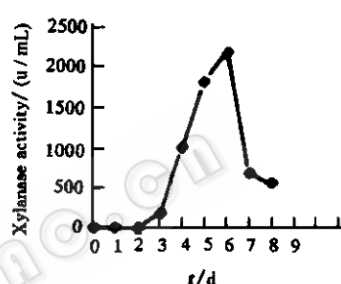


图 1 产酶时间曲线

Fig.1 Time course of xylanase production

2.3.2 酶的温度稳定性和 pH 稳定性: 将酶液在不同温度下保温不同时间, 按常规方法测定酶活力。以不保温的酶活力作为 100% 计算, 结果表明, 45℃ 保温 1h, 酶活力丧失 65%; 50℃ 保温 1h, 酶活力丧失 98%, 可见该酶的热稳定性较差。将酶液调至不同的 pH 值, 室温下放置 30min, 适当稀释后测剩余酶活力, 以不调 pH 值的酶液作对照, 结果酶液在 pH5.0~8.0 稳定。

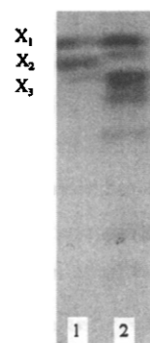


图 3 酶解产物分析

Fig.3 Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of birch wood xylan by xylanase

1. A mixture of authentic samples of xylose(X₁), xylobiose(X₂) and xylotetraose(X₃);
2. Hydrolysis products of birch xylan by xylanase.

50℃ 反应 10min。按 Lineweaver-Burk 双倒数法作图(图 2), 酶的 K_m 值为 4.3×10^{-3} g/mL, V_{max} 值为 4.9 mg/(mL·min)。

2.3.4 酶解产物分析: 将酶液与底物桦木木聚糖反应 24h 后, 煮沸灭活, 用薄层层析对酶解产物进行分析, 结果(图 3)表明, 终产物是以木三糖和木四糖为主的寡糖, 说明该酶是一种典型的内切糖苷酶, 并且不同于文献报道的其它木聚糖酶^[3,4,6]。

2.3.5 底物对酶活力的影响: 以不同来源的木聚糖为底物测定酶活力, 其相对水解速度为(%): 松木木聚糖(100) > 燕麦木聚糖(85) > 桦木木聚糖(39)。说明木聚糖来源不同, 其结构也就不同, 因而影响到酶的水解作用。

参 考 文 献

- [1] S.D. Mansfield, K.K.Y. Wong, E. de Jong *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1996, **46**:319~326.
- [2] P. Biely. *Trends in Biotechnology*, 1985, **3**:286~290.
- [3] Kotoyoshi Nakanishi, Hideto Arai, Tsunen Yasui. *J. Ferment. Technol.*, 1984, **62**(4):361~369.
- [4] Watanalai Panbangred, Atsuhiko Shinmyo, Shinichi Kinoshita *et al.* *Agric. Biol. Chem.*, 1983, **47**(5):957~963.
- [5] E. T. Reese, M. Mandels. In: R. L. Whistler Ed, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, 1963, **3**:141.
- [6] 曾宇成, 张树政. *微生物学报*, 1987, **27**(4):350~356.

Studies on Xylanase Produced by *Aspergillus ustus**

Zhu Jing Wang Hao Liang Gaiqin Yan Zizheng

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract *Aspergillus ustus* showing high xylanase activity was isolated from 1144 strains of fungi. The medium for the optimal xylanase production(4% wheat spelt, 0.5% glucose, 0.4% NaNO₃ and 0.1% NaCl) yielded 2176 u/mL within 6 days of cultivation at 30℃. The enzyme showed a temperature optimum of 55℃ and retained 35% of activity after incubation at 45℃ for 1 h. The enzyme also showed a pH optimum of 5.5 and was stable in the range of pH 5.0 to 8.0. The K_m value and V_{max} value calculated were 4.3×10^{-3} g/mL and 4.9 mg/(mL·min) for birchwood xylan, respectively. The hydrolysis products from birchwood xylan were xylotriase and xyloetraose. Thus, the enzyme is considered to be an endoglycosidase.

Key words *Aspergillus ustus*, xylanase, glycosidase

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