

木聚糖降解菌的筛选和木聚糖酶性质的研究

周世宁 陆勇军 杜 扬

(中山大学生物化学系, 广州 510275)

摘 要 筛选两株生长快、产木聚糖酶活力高的菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*, AN01)、链霉菌 (*Streptomyces* sp. Str7B), 酶活力分别达 128mg/L·min 和 176 mg/L·min; 酶反应最适温度分别为 60℃ 与 50℃; 最适 pH 值为 5.0 和 6.0, 并分别在 pH2.2~5.0, 5.8~6.4 酶活性稳定; 在 60℃ 条件下保温 1.5 h, 酶活力分别剩余 20.5%, 88.5%, 其中 AN01 株原酶液在 90℃ 保温 10 min, 活力仍剩余 14.5%. Cu^{2+} 对酶活表现出极强抑制, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 等离子则有促进作用; 用纸层析法探讨了不同培养时间各种产物产生的情况.

关键词 木聚糖酶, 黑曲霉 AN01, 链霉菌 Str7B, 寡木糖

分类号 Q55

每年地球上植物光合作用产生的巨大资源中, 有 1/3 是半纤维素, 约占陆地植物干物质含量 15%~30%, 是一类可再生的重要潜在资源. 与纤维素相比, 半纤维素更易为微生物所降解和转化, 降解产物木糖在酶的作用下可转变为乙醇. 国外已有不少研究者对木聚糖酶进行了研究^[1], 有的已在探索运用基因工程手段将木聚糖酶基因转入大肠杆菌或酵母中^[2~4], 而国内目前对木聚糖酶的研究还较少, 且主要集中于外切酶的活性上^[5,6], 对内切木聚糖酶研究很少. 内切酶作用的产物为寡糖. 由于寡糖在饲料工业和食品保健方面有很大的应用前景而受到人们的重视. 用化学方法生产寡糖有副产物多、粘性大及成品不易提纯等缺点, 酶法生产则避免了上述的不足.

本研究筛选出了对木聚糖分解能力较强的黑曲霉 (*Aspergillus niger*, AN01) 和链霉菌 (*Streptomyces* sp. Str7B) 两个菌株, 研究了它们粗酶液的一些特性, 并初步分析了其粗酶液中所含内切酶的比例.

1 材料和方法

1.1 菌 种

链霉菌 (Str7B), 土壤分离; 黑曲霉 AN01 株, 本实验室保存菌种.

1.2 木聚糖的制备

干蔗渣加 0.5% 的草酸铵 (以湿润蔗渣为准), 85℃ 水浴保温 90 min, 抽滤 (用草酸

铵连续处理 3 次), 弃上清液. 沉淀物在 60℃ 烘干后, 用 4% 的氢氧化钠浮泡(氢氧化钠用量以浸没沉淀为度), 40℃ 保温 16 h 后抽滤, 取滤液, 用 99% 乙酸调 pH 至 5.5, 然后加入 95% 乙醇(用量为氢氧化钠用量的一半), 立即出现木聚糖沉淀. 将木聚糖的乙醇液放入冰箱中冷却 2.5 h, 离心, 并用 95% 乙醇洗沉淀物两次, 离心后烘干得到深棕色固体, 产率约为 10%.

1.3 培养基

(1) 保藏培养基. PDA 培养基.

(2) 选择培养基. 木聚糖 1%; NaNO_3 0.3%; K_2HPO_4 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; KCl 0.05%; FeSO_4 0.001%; 琼脂 1.5%.

(3) 营养盐液. 除不含 CoCl_2 外, 其它成分同 Mandels 氏营养盐液.

(4) 液体发酵培养基. 在营养盐液中加入 0.5% 的半纤维素, 2% 的麸皮, pH 约为 5.5.

1.4 方法

1.4.1 木聚糖降解菌的筛选方法 用以上选择培养基进行筛选. 将不同地点采集来的土样约 1 g, 用无菌水稀释 10 万倍, 涂于选择性培养基上, 置 28℃ 培养箱中培养, 纯化.

1.4.2 摇床培养方法 直接将斜面菌种接入培养液中, 500 mL 三角瓶装量为 125 mL, 在 30℃, 150 r/min 条件下振荡培养.

1.4.3 粗酶液的制备 直接取发酵液, 离心后(3 000 r/min, 20 min) 取上清液即为粗酶液.

1.4.4 测定方法

(1) 木糖量测定. 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法(DNS 法) 测定还原糖.

(2) 木聚糖酶活力测定. 取粗酶液 0.5 mL 加入 1% 木聚糖溶液 0.5 mL, 混匀, 60℃ 水浴酶解 20 min, 将反应体系置于 100℃ 沸水灭活 10 min, 用 DNS 法测定其中还原糖量.

空白对照. 取粗酶液 0.5 mL 于沸水浴灭活 10 min, 再加入木聚糖溶液 0.5 mL, 60℃ 保温反应 20 min, 其余同上法.

计算每 mL 酶液反应每 min 释放 1 μg 木糖的量为 1 个酶活单位.

(3) 用上行纸层析法, 定性测定酶解产物. 展开剂为正丁醇: 吡啶: 水(6:4:3); 显色剂为苯胺-二苯胺显色剂.

2 结果

2.1 木聚糖酶产生菌的筛选

将纯化的菌株和黑曲霉 01 株(AN01) 分别接入液体发酵培养基中, 30℃, 150 r/min 摇瓶培养 72 h, 提取粗酶液 0.5 mL 与木聚糖溶液(1%) 0.5 mL 混合, 50℃ 反应 20 min, 点样进行纸层析; 另取酶液进行酶活力测定. 结果除黑曲霉 AN01 外, 尚有一株 Str7B 的酶活力较高且酶解产物中有寡糖产生, 经鉴定 Str7B 株为链霉菌属.

2.2 培养时间对木聚糖酶活性的影响

取两菌种用产酶培养基进行摇瓶培养 6 d, 每隔一定时间取样, 测定酶活性, 结果如

图 1 所示。

由图 1 可见，AN01 株在前 24 h，产酶量迅速增加，到 24 h，酶活力达到最高，之后酶活慢慢下降。Str7B 株在前 24 h 产酶量增加较慢，到第 3 d 才达到最高酶活，之后又缓慢下降，最后，酶活稳定在一个较高的水平。

2.3 培养时间对内切酶与外切酶产生的影响

将两菌株培养 72h 的原酶液分别与木聚糖溶液反应，将反应液点样进行纸层析，结果如图 2-a。培养 6 d 后，再分别取酶液如上反应及层析，结果如图 2-b。

2.4 AN01 和 Str7B 所产木聚糖酶特性

用来自 AN01 (摇瓶培养 24 h) 及 Str7B (摇瓶培养 72 h) 培养液的粗酶液与标准木聚糖底物在各种条件下反应，结果如下。

用 HCl 和 NaOH (0.1 mol/L) 分别调节酶促反应时的 pH 值，60 C 反应 20 min，测酶活，结果如图 3-a，得 AN01 及 Str7B 木聚糖酶反应最适 pH 分别为 5.0 及 6.0。

用 HCl 和 NaOH (0.1mol/L) 将反应液调至不同的 pH 值，放入 60 C 水浴锅内保温 1 h，然后再将 pH 值调回其最适 pH 值，测定酶活力。结果见图 3-b，得 AN01 木聚糖酶在 pH2.2~5.0 范围内较稳定，Str7B 则在 pH5.8~6.4 范围内稳定。在不同温度条件下，分别进行酶促反应，结果如图 4-a，得 AN01 及 Str7B 木聚糖酶活的最适温度分别为 60 C 和 50 C。

将 0.5 mL 酶液分别置于不同温度下保温不同时间，然后再加入 0.5 mL 木聚糖溶液 (1%)，置 60 C 水浴锅中，按常规方法测酶活力，未保温的酶活力为 100%，结果如图 4。得两菌株的木聚糖酶在 40 C 都较稳定，但在 60 C 下，AN01 酶极不稳定，而 Str7B 却较稳定。

将培养基用 HCl 或 NaOH (0.1 mol/L) 调不同的 pH 值，培养至 24 h (AN01) 及 72 h (Str7B)，然后测定其终 pH 值及酶活。结果如表 1。

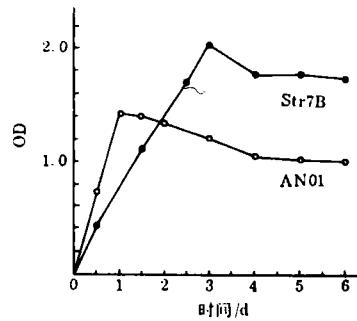


图 1 AN01 及 Str7B 产木聚糖酶时间曲线

Fig. 1 The xylanase production of AN01 and Str7B in different times

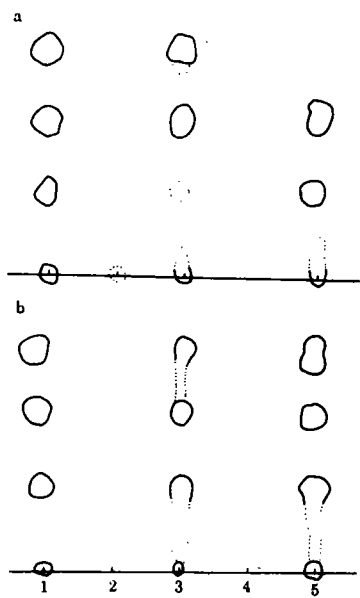


图 2 摇瓶培养 72 h (a) 和 6d (b) 后两种木聚糖酶反应层析图

Fig. 2 The paper chromatography pattern shown the products of xylanase reaction at 30 C for 72 h (a) and 6d (b) with shaking

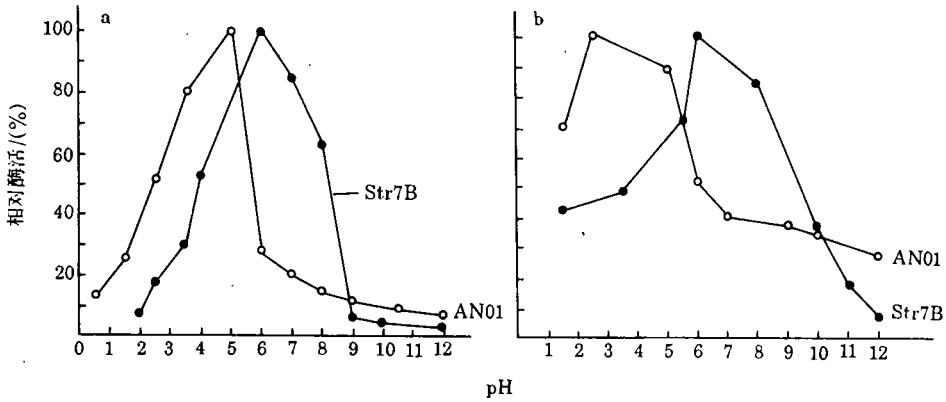


图 3 pH 值对木聚糖酶活性 (a) 和酶稳定性 (b) 的影响

Fig. 3 The effect of pH on the activity (a) and the stability (b) of xylanase produced by AN01 and Str7B

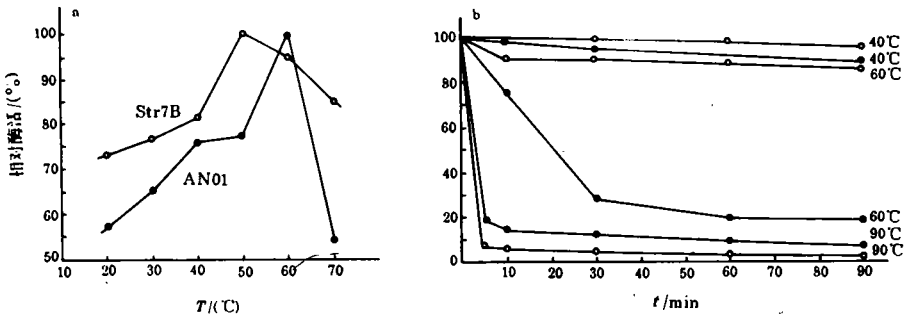


图 4 温度对木聚糖酶活性 (a) 和稳定性 (b) 的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the activity (a) and thermo-stable (b) of xylanase produced by AN01 and Str7B.

表 1 不同起始 pH 值对产酶的影响

Tab. 1 The effect of original pH values of the media on the enzyme activity

起始 pH (灭菌前)		3	4	5	5.5	6	7	8
终 pH	AN01	4.0	4.4	4.4	3.5	5.4	6.4	7.6
	Str7B	5.0	5.4	6.4	6.7	6.7	7.2	8.0
酶活/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	AN01	29.0	30.5	44.0	49.5	47.5	37.0	16.0
	Str7B	0	17.0	28.0	46.0	45.0	42.5	29.0

在酶促反应液中加入不同金属离子 (使金属离子的终浓度达到 0.02 mol/L), 测定不同金属离子对两种木聚糖酶活力的影响, 结果见表 2.

表 2 金属离子对木聚糖酶活力的影响

Tab. 2 The effect of metal ions on the activity of xylanase produced by AN01 and Str7B

金属离子	对照	Na ⁺	K ⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺	
酶活力/g · L ⁻¹ · min ⁻¹	AN01	57.2	54	51	98	153	68	122	5
	Str7B	110	114	107	77	141	111	121	3

3 讨 论

利用微生物酶降解木聚糖生成寡糖, 国内外均有研究. 在木聚糖来源方面, 国外有用经济性硬木^[7], 白桦、麦草、白杨、落叶松木及玉米棒子^[1]等来制取木聚糖, 再用化学法或微生物酶降解, 将单糖除去后, 得到从木二糖到木六糖的一系列寡糖. 作者则利用华南地区蔗渣资源丰富的特点, 由蔗渣提取木聚糖. 将得到的木聚糖酶解后, 产物用纸层析显示, 得到了从单糖到三糖以上的寡糖(图 2-a), 由图 2-a 可看出, Str7B 酶作用的酶解产物中, 单糖很少, 三糖及二糖含量较高, 说明该株所产木聚糖酶中, 内切酶活性高, 比例大, 外切酶则相反. 但 AN01 则不同, 其单糖和寡糖产物相去不远, 说明内切酶与外切酶比例大致相当. 而从图 2-b 可看到, 培养 6 d 后, Str7B 株酶解反应产物中又出现了大量单糖, 单糖与寡糖的产量基本持平, 即其所产木聚糖酶中内切酶与外切酶比例相当. 而培养 6 d 的 AN01 株酶解反应产物的层析结果与培养 72 h 的结果相似.

产木聚糖酶的微生物种类方面, 以放线菌属、芽孢杆菌属、黑曲霉及木霉属^[1]居多. 这些菌株都产生内切及外切两种酶. 筛选的 AN01 株具有生长快速的特点, 30℃, 24 h 已使培养基因长满菌丝球而粘稠, 且酶活达到最高 (128 mg/L · min) (图 1), Str7B 株虽然生长较慢, 但酶活力较高, 3 d 最高酶活达 176mg/L · min. 进一步研究培养条件以提高菌株生长速度及内切酶比例, 是努力的方向.

由图 3-a 可见, 不论是 AN01 或 Str7B, pH 值对酶活性的影响是很显著的. 在最适 pH 之外, 酶活迅速下降, 但 AN01 株对 pH 值的变化比 Str7B 有较好的稳定性(图 3-b), 在 pH2.5~5.5 的范围内酶活变化不大. 由表 1 还可看出, 一般情况下, 不论起始 pH 值如何, 在发酵后其 pH 值都会向产酶的最适 pH 值方向移动, 特别是 Str7B, 其酸性 pH 值升高得非常显著, 在最适 pH 值附近, 其酶活也是最高的. 温度也是影响酶活力的主要因子(图 4-a), 在最适温度以外, 酶活都迅速下降, 但 AN01 的酶在其最适温度 (60℃) 却不稳定, 保持 30min, 酶活只剩 28.5%, 而 Str7B 在 40~60℃ 范围内却有较好的稳定性, 保温 90min, 仍有 88.5%~98% 的酶活. 两者比较, Str7B 的酶热稳定性是较为理想的, 因为在其酶活的最适温度下, 其稳定性也最高, 对酶促反应非常有利.

由表 2 可看出, Fe²⁺ 对两菌株均有较好的提高酶活的作用, 尤其值得一提的是 Cu²⁺ 对两菌株的木聚糖酶活都有极强的抑制作用, 几乎使酶活降到零.

参 考 文 献

- 1 Wood W A. Methods in Enzymology. 1988, 160 (Part A): 528

- 2 Fukusaki E, Panbangred W. The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (xynA) of *Bacillus pumilus*. *Febs Letters*, 1984, 171 (2): 197~201
- 3 Moriyama H, Fukusaki E. Structure and expression of genes coding for xylan-degrading enzymes of *Bacillus pumilus*, *Eur J Biochem*, 1987, 166 (3): 539~545
- 4 Panbangred W, Kondo T. Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus pumilus* and their expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1983, 192 (3): 335~341
- 5 吴东儒主编. 糖类的生物化学. 广州: 广东高等教育出版社, 1987
- 6 陈惠忠. 产木聚糖酶菌株的选育及其液体发酵条件. *微生物学报*, 1990, 30 (5): 351~357
- 7 Kusakabe I, Yasui T. A new method for preparation of xylobise, eliminating xylose from enzymatic xylan hydrolyzate by yeast. *Agr Biol Chem*, 1975, 39 (7): 1355~1362

A Comparative Study on Xylanase Produced by *Aspergillus niger* and *Streptomyces* sp.

Zhou Shining* Lu Yongjun Du Yang

Abstract Two strains of *Aspergillus niger* (AN01) and *Streptomyces* sp. (Str7B) with fast growing and high xylanase activity were isolated from soil samples. The enzyme activity of AN01 was 128 mg/L · min, at 30°C for 72h. with shaking and that of Str7B was 176mg/L · min, at 50°C for 72h. The optimal temperature and pH for xylanase reaction were 60°C and 5.0 for AN01 and 50°C, 6.0 for Str7B. The enzyme activity of AN01 was stable within pH2.2~5.0 and that of Str7B was pH5.8~6.4. The remaining activity of AN01 and Str7B xylanase were 20.5% and 88.5% after incubation at 60°C for 1.5h, Fe²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ increased both of the activities whereas Cu²⁺ inhibited them strongly. The products of enzyme hydrolysis in different culture times shown by means of paper chromatography were also discussed.

Keywords *Aspergillus niger*, *Streptomyces* sp., xylanase, xylooligosaccharides

* Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275