

黑曲霉An-76 β -木聚糖酶的诱导合成

陈惠忠 高培基 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南)

木聚糖是植物半纤维素的主要成分。产生降解木聚糖酶类的微生物分布非常广泛^[1, 2]。木聚糖酶类主要包括: (1) 内切 β -木聚糖酶 (2) 外切 β -木聚糖酶 (3) β -木糖苷酶^[3]。关于木聚糖酶是组成性还是诱导性酶的争论甚多。已知人工合成诱导物 β -甲基木糖苷是丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*)^[4]、黄隐球酵母 (*Cryptococcus flavus*)^[5]、链霉菌 (*Streptomyces* sp)^[6] 和木素木霉 (*Trichoderma lignorum*)^[7] 的非代谢高效诱导物。本文报道一株高活力木聚糖酶产生菌黑曲霉 (*Aspergillus niger*) An-76 的木聚糖酶诱导合成的研究结果。

材料和方法

(一) 菌种

黑曲霉An-76由济南郊区土壤分离的出发株C-2经紫外线、甲基磺酸乙酯交替诱变而得到。

(二) 培养基和木聚糖酶的诱导生成

1. 斜面培养基(%)：麸皮浸汁 10, 琼脂 1.6, pH6.0。

2. Mandels氏营养盐液: 见文献[8]。

3. 洗涤菌丝体的制备: 孢子悬液接种于含1%葡萄糖的Mandels氏营养盐液, 28℃, 180 rpm摇瓶振荡培养40h, 收集指数生长期菌丝体, 离心, 生理盐水洗涤3次。

4. 不同碳源对木聚糖酶合成的作用: 以Mandels氏营养盐液配制(1%, w/v)。28℃, 180rpm, 摇瓶振荡培养96h, 离心, 上清液测酶活。

5. 洗涤菌丝体木聚糖酶的诱导: 洗涤菌丝体重新悬浮于无机营养盐液中, 加入诱导物。菌丝体浓度为5mg/ml, 28℃, 180rpm摇瓶振荡培

养, 定时取样测酶活。

(三) 分析测定方法

1. β -木聚糖酶活的测定^[9]: 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%木聚糖溶液, 50℃酶解30min, 用DNS法测还原糖(以木糖计)。

2. 胞外 β -甲基木糖苷(β -MX)浓度以地衣酚法测定^[10]。

结果与讨论

(一) 碳源对木聚糖酶合成的影响

结果见表1。An-76培养于木糖或富含木糖苷类的半纤维素、麸皮和木聚糖中时, 才大量合成胞外木聚糖酶。在以葡萄糖为碳源时, 只有添加 β -MX后, 才可见酶的大量合成。

表1 不同碳源对An-76 β -木聚糖酶合成的影响

碳源	β -木聚糖酶活 (IU/ml)	碳源	β -木聚糖酶活 (IU/ml)
葡萄糖	0.38	纤维二糖	0.37
木糖	20.0	淀粉	0.33
果糖	0.84	半纤维素	170.0
甘油	0.20	麦麸	144.3
蔗糖	0.28	木聚糖	210.8
甘露糖	0.67	葡萄糖 + β -MX*	156.0
纤维素	0.67		

* β -MX为0.5mg/ml

(二) β -MX浓度对木聚糖酶合成的影响

以葡萄糖为碳源, 添加不同浓度的 β -MX, 培养4天。图1结果表明, β -MX浓度需大于0.1mg/ml时, 才可测出酶的合成, 在0.1—0.6

本文1988年12月9日收到。

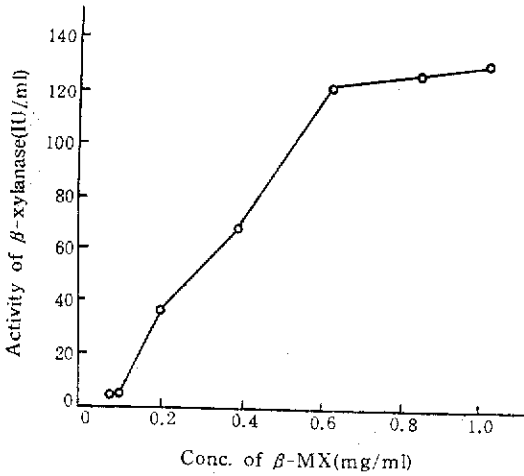


图 1 β -MX对木聚糖酶合成的影响

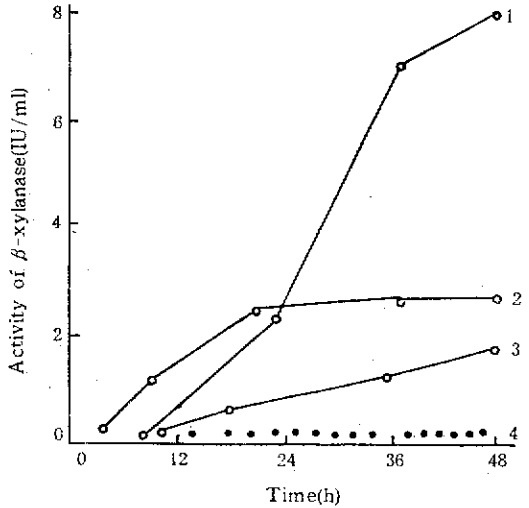


图 2 能量化合物对木聚糖酶诱导生成的影响

1. β -MX + 甘油 2. β -MX + ATP
 3. β -MX + 葡萄糖 4. β -MX
 MX: 0.5mg/ml, ATP: 3mg/ml, 甘油和葡萄糖: 2mg/ml

(四) 抑制剂对酶诱导的抑制作用

图 3 表明, 蛋白质合成抑制剂环己亚胺完全抑制了木聚糖对酶的诱导作用, 核酸合成抑制剂 5-氟尿嘧啶也较强烈抑制酶的诱导, 只是随着时间的延长, 抑制作用才部分解除。呼吸抑制剂 2,4-二硝基苯酚(DNP), 叠氮化钠 NaN_3 , 碘乙酸和丙二酸完全抑制酶的合成, 氟化钠(NaF)也有一定的抑制作用。可见, 在 An-76 中, 木聚糖酶的合成也是经历了酶蛋白质的重新合成的全过程。

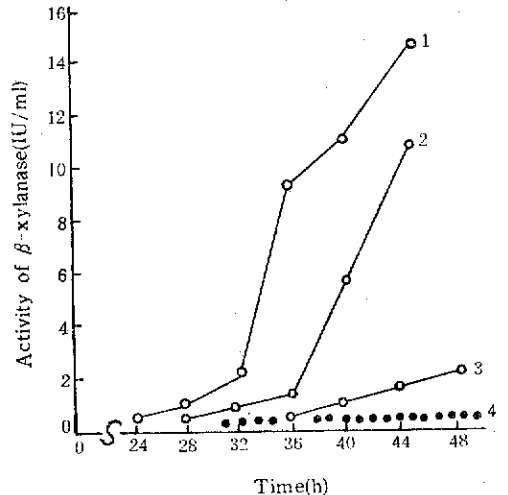


图 3 蛋白质核酸抑制剂对木聚糖酶合成的影响

1. 对照 2. 氟化钠 (0.5mg/ml)
 3. 5-氟尿嘧啶 (50 μ g/ml) 4. 其他抑制剂

mg/ml之间, 酶的合成量与诱导物浓度呈线性相关, 但继续增加诱导物浓度, 酶的合成量则不再增加。依照“诱导-阻遏”学说^[11], 它说明了当阻遏蛋白被饱和后, 即使有过量诱导物的存在, 酶的合成量不再增加。

(三) ATP、甘油、葡萄糖对 β -MX诱导作用的影响

β -MX、甘油和葡萄糖分别加入时, 并不能诱导产生胞外 β -木聚糖酶, 而且 β -MX也不被菌丝体吸收。加入诱导物 β -MX的同时, 添加ATP、甘油、葡萄糖等能源性物质时, 便能诱导酶的合成和分泌(图 2)。胞外 β -MX浓度测定, 显示已有部分诱导物进入细胞。酶的诱导迟缓期以ATP最短, 甘油次之, 葡萄糖最长。其原因可能是ATP作为直接能源性物质, 能迅速提供诱导物穿膜输送的能量, 甘油、葡萄糖经氧化代谢产能的途径较长, 故迟缓期也相对延长。

Maheshwari 和 Kamalam^[12]报道木糖和木聚糖能诱导一株嗜热真菌 (*Melanocarpus albomyces*) 生长于葡萄糖的洗涤菌丝体, 产生木聚糖酶, 但 β -MX对洗涤菌丝体无诱导作用。未见 β -MX对丝状真菌洗涤菌丝体诱导产木聚糖酶的报道。我们的结果表明, 这可能与丝状真菌 β -MX的穿膜输送是一需能的主动运输过程有关, 在未同时提供能源物质时, 其不能表达出所应有的诱导反应。

参 考 文 献

- [1] Dekker, R.F.H. et al.; *Carbohydr. Res.*, 43:335—344, 1975.
[2] Rikard, P.A.D.; *Biotechnol. Letter.*, 3:39—44, 1981.
[3] Frederick, M.M. et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, 27:525—532, 1985.
[4] Hrmova, M. et al.; *Arch. Microbiol.*, 138:371—376, 1984.
[5] Yasui, T. et al.; *J. Ferment. Technol.*, 62:353—359, 1984.
[6] Nakanishi, K. et al.; *J. Ferment. Technol.*, 54:801, 1976.
[7] Defeye, J. et al.; *Carbohydr. Res.*, 139:123—132, 1985.
[8] 曲音波等; 真菌学报, 3(4):238—243, 1984.
[9] Khan, A.W. et al.; *Enzyme Microb. Technol.*, 8:373—377, 1986.
[10] 中山大学生化微生物教研室编; 生化技术导论, 人民教育出版社, 北京, p.31, 1978年。
[11] Jaob, F and Monod, J.; *J. Mol. Biol.*, 3:318—358, 1961.
[12] Maheshwari, R and Kamalam, P.T.; *J. General. Microbiol.*, 131:3017—3027, 1985.

SYNTHESIS OF β -XYLANASE INDUCED BY β -METHYLXYLOSIDE IN *ASPERGILLUS NIGER* AN-76

Chen Huizhong Gao Peiji Wang Zunong
(*Institute of Microbiology Shandong University, Jinan*)

The strain of *Aspergillus niger* An-76 is a high producer of β -xylanase and the amount of enzyme accumulated in the presence of xylose and xylan substrates. When glucose as carbon source, the formation of β -xylanase was markedly simulated by methylxyloside(β -MX), the concentration of β -MX needed for accumulation of β -xylanase is about 0.1mg/ml. The washed mycelium of this strain does not synthesize β -xylanase in the absence of energy compounds, even though β -MX was in presence. A considerable accumulation of β -xylanase was observed as ATP, glycerol, and glucose was applied with β -MX in the mean time. Inhibitors which is involved in the synthesis of nucleic acid and protein can strongly effect the synthesis of β -xylanase.

Key words

Xylose; xylan; β -xylanase; *Aspegellus niger*