

研究报告

嗜热拟青霉固体发酵产木聚糖酶条件的优化*

杨绍青¹ 闫巧娟² 江正强^{1**} 李里特¹ 王有智³

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)¹

(中国农业大学工学院 北京 100083)² (中国科学院微生物所 北京 100080)³

摘要: 从土壤中筛选出一株高产木聚糖酶的嗜热真菌 J18, 经鉴定为一种新的拟青霉, 暂定为嗜热拟青霉。该菌能够利用几种天然纤维质材料固体发酵产木聚糖酶, 小麦秸秆为最佳碳源。单因素优化试验表明: 小麦秸秆粒度为 0.3 mm ~ 0.45 mm, 初始水分含量 83%, 初始 pH 7.0, 温度为 50℃ 为最佳产酶条件。在优化后的条件下, 培养 8 d 产木聚糖酶的水平高达 18,580 U/g 干基碳源。因此, 嗜热拟青霉固体发酵产木聚糖酶将具有很大的工业化应用前景。

关键词: 嗜热拟青霉, 木聚糖酶, 固体发酵, 小麦秸秆

中图分类号: Q93-939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0001-06

Optimization of Xylanase Production by *Paecilomyces thermophila* in Solid State Fermentation*

YANG Shao-Qing¹ YAN Qiao-Juan² JIANG Zheng-Qiang^{1**} LI Li-Te¹ WANG You-Zhi³

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)¹

(Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083)²

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)³

Abstract: A new thermophilic fungus J18 isolated from the soil samples was identified as *Paecilomyces thermophila*. This strain produced effectively xylanase utilizing several lignocellulosic materials in the solid-state fermentation (SSF), and wheat straw was the best carbon source. The results of single-factor-experiment showed that the wheat straw of particle size 0.3 mm ~ 0.45 mm, initial moisture content of 83%, initial pH of 7.0 and cultivation temperature of 50℃ were the optimal conditions for xylanase production. Under the optimized conditions, it produced 18 580 U/g dry substrate after 8 days of cultivation. Therefore, xylanase production by *Paecilomyces thermophila* in SSF possess great potential for commercial applications.

Key words: *Paecilomyces thermophila*, Xylanase, Solid state fermentation, Wheat straw

木聚糖酶 (xylanase, EC 3.2.1.8) 属于诱导酶, 主要利用微生物发酵生产, 发酵方法主要有液体发酵和固体发酵两种。液体发酵一般需要在培养基中加入价格昂贵的木聚糖才能高效产酶。固体发酵则能利用廉价的植物纤维质材料如秸秆、玉米芯、蔗渣、麸皮等作为碳源生产木聚糖酶。因此, 越来越受到科研工作者的关注^[1]。近年来国外对固体发酵生产木聚糖酶的研究报道逐渐增加, 固体发酵产木聚糖酶的水平也较

* 国家“863”项目部分内容 (No. 2003AA214020)

** 通讯作者 Tel: 010-62737689, E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-08-12, 修回日期: 2005-09-27

高。嗜热棉毛菌 (*Thermomyces lanuginosus*) D₂W₃ 以高粱杆为碳源进行固体发酵, 经过发酵条件的优化木聚糖酶的产量达 48,000 U/g 干基, 为迄今报道的最高值^[2]。国内虽有一些报道, 但菌株产酶水平普遍较低。本研究室研究嗜热棉毛菌 CBS 288.54 的固体发酵, 以麦麸和玉米芯粉 (8:2) 作为复合碳源进行培养条件优化, 50 °C 下培养 5 d, 木聚糖酶活力高达 15,023 U/g 干基^[3]。

木聚糖酶可以应用于食品、饲料、造纸等很多行业, 具有比较广阔的应用前景^[1]。耐热木聚糖酶在某些行业具有更大的应用前景和价值, 因此成为木聚糖酶的研究热点之一。嗜热真菌能产生耐热木聚糖酶, 而且较适合于酶制剂的工业化生产^[4]。国际上已筛选出 10 余种产耐热木聚糖酶的嗜热真菌, 其中一些嗜热真菌固体发酵产木聚糖酶的水平很高, 表现出很大的工业化应用前景, 如嗜热棉毛菌、耐热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)、*Talaromyces byssochlamydoides* 等^[5,6]。国内对嗜热真菌和拟青霉属木聚糖酶的研究较少, 尚未见到拟青霉属固体发酵产木聚糖酶的报道^[3,7]。本研究室从土壤中筛选出了一株高产木聚糖酶的嗜热拟青霉, 因此, 本文主要研究该菌固体发酵产木聚糖酶的条件, 为其潜在的工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

LRH-恒温恒湿培养箱 (广东省医疗器械厂); TU-1800PC 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器设备有限公司); Power Pac Basic™ 型电泳仪 (BIO-RAD); GL-20B 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

桦木木聚糖、木糖、低粘度羧甲基纤维素购于 Sigma 公司。低分子量蛋白样品购于 Amersham Biosciences 公司。酵母提取物购于英国 Oxoid 公司。玉米芯、玉米秸秆、甘蔗渣、小麦秸秆等植物纤维质材料经粉碎后过筛, 取 0.45 mm ~ 0.9 mm 备用。

1.2 嗜热拟青霉的分离与鉴定

将来自新疆、青海、云南、四川等地的 200 多个土样用无菌水稀释, 吸取 0.1 mL 涂布于土豆培养基 (PDA) 平板上, 然后将平板置于培养箱中 50 °C 恒温静置培养, 观察平板菌落长出情况, 挑选嗜热真菌划线纯化。将初筛出的菌株进行复筛, 确定一株 (J18) 能高效产木聚糖酶的嗜热真菌。菌种由中国科学院微生物研究所鉴定为嗜热拟青霉 (*Paecilomyces thermophila*)。

1.3 木聚糖酶的固体发酵和粗酶液的提取

固体发酵: 称取 5 g 碳源置于 250 mL 三角瓶中, 然后倒入含 0.2 g 酵母提取物的 20 mL 水溶液, 用玻璃棒将发酵底物搅拌均匀, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min, 冷却后接种 1 mL 孢子悬液 (10⁶ 个/mL), 混匀后置于培养箱中 50 °C 静置培养 7 d。粗酶液的提取: 每克固体发酵物加入 10 mL pH 6.2 的柠檬酸缓冲液, 室温下 200 r/min 震荡浸提 2 h, 10,000 g 冷冻离心 10 min, 上清液即为木聚糖酶的粗酶液。

1.4 固体发酵条件的优化

在 1.3 固体发酵培养条件下, 选取不同碳源 (小麦秸秆、麦麸、玉米秆、玉米芯、水稻秸秆、水稻糠和甘蔗渣) 考察对该菌产酶的影响。最佳碳源确定后, 改变碳源的粒度 (0.18 mm ~ 2.00 mm), 研究对该菌产酶的影响。再调节培养基的初始水分含量 (75% ~ 88%), 考查其对产酶的影响。在优化水分的基础上在 pH 4.0 ~ 9.0 范围内调节培养基的初始 pH, 培养 7 d 以确定最佳初始 pH 值。将菌株分别在 30 °C ~ 55 °C 下培

养 7 d, 确定最适产酶温度。单一因素优化的基础上, 采用最适培养条件培养 10 d 研究固体发酵产酶的历程。

1.5 酶活力和蛋白含量的测定

采用 DNS^[3] 法测定木聚糖酶的酶活力: 0.1 mL 适当稀释的酶液, 加入到 0.9 mL 用 0.05 mol/L、pH 6.5 的 MOPS 缓冲液配制的 1% 梓木木聚糖底物溶液中, 50℃ 反应 10 min, 用 DNS 法测定所释放的还原糖量。木聚糖酶的活力单位定义为: 在上述反应条件下, 每分钟生成 1 μmol 木糖所需要的酶量。纤维素酶活力的测定方法同上, 仅将其中的底物和标准分别换成羧甲基纤维素与葡萄糖。蛋白质含量的测定参照 Lowry 等的方法进行, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[8]。

1.6 木聚糖酶的温度稳定性

粗酶用 pH7.0 的缓冲液稀释, 在 60℃ 下处理不同的时间, 冰水浴冷却后测定残余酶活力, 确定该酶温度稳定性。

1.7 SDS-PAGE 和酶谱分析

SDS-PAGE 按照 Laemmli 的方法进行^[9]。分离胶 12.5%, 浓缩胶 4.5%, 考马斯亮兰 R-250 染色。酶谱分析参照李秀婷等^[10]的方法进行, 用 25% 的异丙醇溶液使蛋白变性, 40℃ 保温 20 min 后染色显现透明带。

2 结果与讨论

2.1 嗜热拟青霉的分离与鉴定

嗜热真菌 J18 是从新疆天池附近的土样中筛选得到的, 50℃ 下 PDA 培养基培养 4 d 的单菌落和孢子形态如图 1 所示。该菌由中国科学院微生物研究所鉴定, 与拟青霉属其它一些菌株的分析比较, 发现它与 *Paecilomyces javanicus* 有一些相似的特征^[11,12]。但是两者之间也存在着比较明显的差别, J18 属嗜热型真菌, 在 50℃ 生长良好, 而 *Paecilomyces javanicus* 却只能在 30℃ 下生长; J18 的分生孢子呈椭圆形 (2.5 μm ~ 6.5 μm $\times$ 2.4 μm ~ 3.2 μm) (图 1B), 比 *Paecilomyces javanicus* 的棒杆状孢子 (5 μm ~ 7.5 μm $\times$ 1.4 μm ~ 1.7 μm) 短而粗。由于新筛选出的 J18 的特征与其它拟青霉属的菌株相比都不尽相同。因此, 鉴定为拟青霉属的一个新种, 暂定为嗜热拟青霉 (*Paecilomyces thermophila* sp. nov.)。

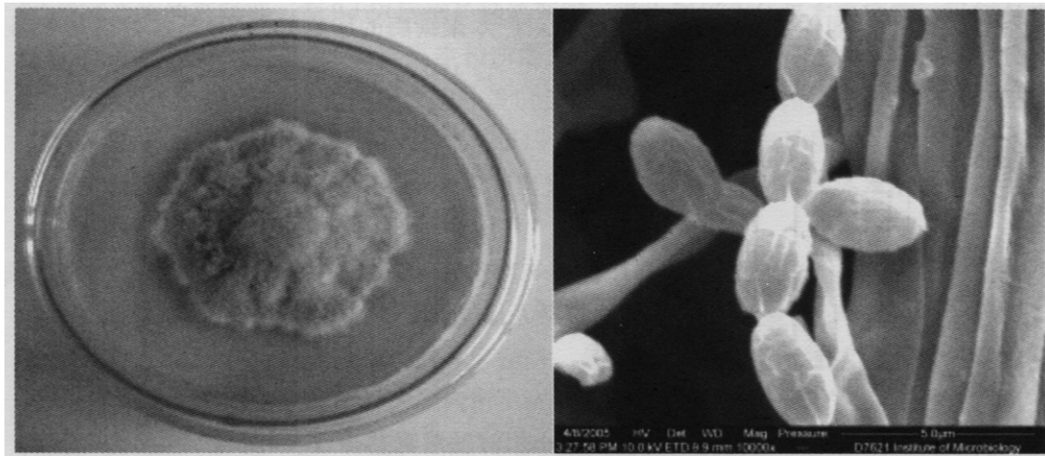


图 1 嗜热拟青霉 J18 在 50℃ 下 PDA 上培养 4 d 单菌落图 (A) 和孢子扫描电镜图 (B) ($\times 19,000$)

2.2 碳源的影响和木聚糖酶谱分析

采用小麦秸秆、麦麸、玉米秆、玉米芯、水稻秸秆、水稻糠和甘蔗渣作为单一碳源进行固体发酵产酶试验, 结果如表 1 所示。小麦秸秆作为碳源菌株发酵产酶量最高 (7,745 U/g), 麦麸次之 (4,517 U/g), 其它几种碳源如玉米秆、稻草秆、玉米芯等用作碳源时, 其所产木聚糖酶活力低于 600 U/g。因此, 确定小麦秸秆为最佳碳源。

小麦秸秆和麦麸固体发酵粗酶液的 SDS-PAGE 和木聚糖酶谱分析见图 2。结果表明, 胞外蛋白的主要蛋白带 (26 kD) 具有木聚糖酶活力, 而且仅有一条木聚糖酶活性带。在真菌产木聚糖酶的研究中, 产单一木聚糖酶的真菌比较少见, 大多数真菌产多组分木聚糖酶。嗜热真菌 *Melanocarpus albomyces*, *Humicola insolens*, *Myceliophthora* sp. 等所产的木聚糖酶均由 2 种或 2 种以上木聚糖酶构成。国内吴克等的研究中发现宛氏拟青霉产生 4 种木聚糖酶^[7]。而本研究的嗜热拟青霉产木聚糖酶的特性与嗜热棉毛菌类似, 固体发酵条件下主要产生单一木聚糖酶。

表 1 不同种类碳源对嗜热拟青霉产酶的影响

碳源	木聚糖酶活力 (U/g 干基碳源)
玉米芯	328 ± 12
玉米秸秆	280 ± 10
水稻秸秆	346 ± 12
水稻糠	580 ± 21
甘蔗渣	295 ± 12
麦麸	4,517 ± 120
小麦秸秆	7,745 ± 250

注: 3 次试验结果的平均值

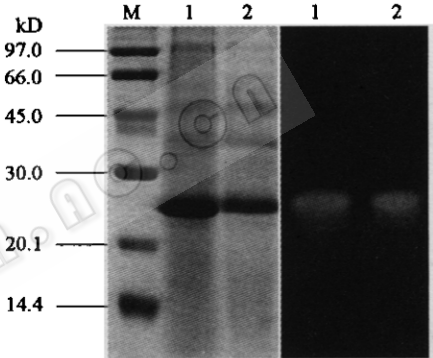


图 2 小麦秸秆和麦麸固体发酵粗酶液的 SDS-PAGE 和木聚糖酶谱分析

M 低分子量标准蛋白, 1 小麦秸秆的粗酶液, 2 麦麸的粗酶液

2.3 小麦秸秆粒度和初始水分含量的影响

固体发酵中小麦秸秆粒度对产木聚糖酶的影响如图 3A 所示。小麦秸秆粒度对产木聚糖酶有明显的影 响, 粒度为 0.3 mm ~ 0.45 mm 时, 木聚糖酶的产量最高 (达 9,868 U/g), 其它粒度下产木聚糖酶的水平明显降低。其他研究者的结论也表明固体发酵中碳源的粒度也是影响木聚糖酶产量的重要因素之一^[1], 但不同真菌固体发酵产酶对碳源粒度的嗜好不尽相同。固体发酵中初始水分含量对产木聚糖酶的影响如图 3B 所示。当培养基

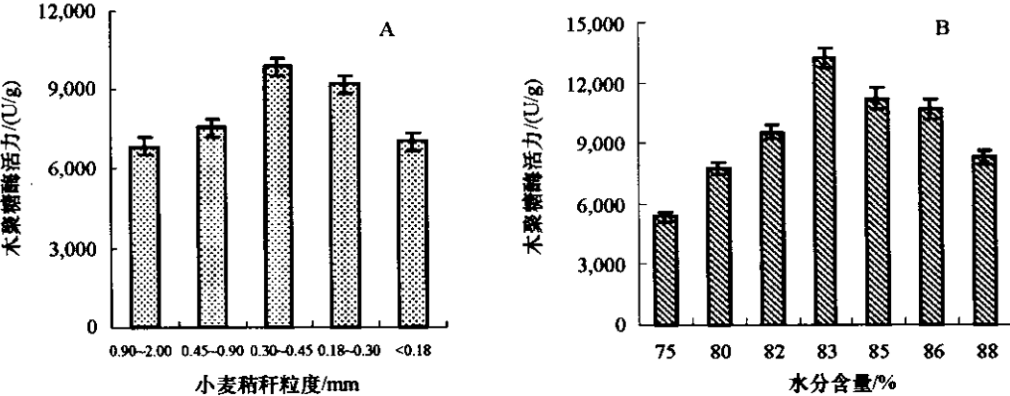


图 3 小麦秸秆粒度 (A) 和初始水分含量 (B) 对产木聚糖酶的影响

的初始水分含量为 83% 时, 木聚糖酶的产量最高 (13,230 U/g)。初始水分含量是影响固体发酵产木聚糖酶产量的重要因素。许多研究表明固体发酵条件下, 初始水分含量高适合大多真菌生长和产木聚糖酶^[1], 嗜热真菌 *Melanocarpus albomyces* II S-68 的最适初始水分含量高达 86%^[13]。

2.4 初始 pH 和培养温度的影响

初始 pH 和培养温度对固体发酵产木聚糖酶的影响见图 4。初始 pH 7.0 时, 木聚糖酶的产量最高 (15,574 U/g), pH 5.0~8.0 都能高效产木聚糖酶 (10,000 U/g 以上)。温度对发酵产木聚糖酶的影响也很大, 50℃ 下木聚糖酶的产量最大 (15,582 U/g), 55℃ 下明显降低, 是最高值的 72.5%。最适产酶温度为 50℃, 与一些嗜热真菌最适产酶温度类似^[5], 如嗜热棉毛菌、耐热子囊菌、*Melanocarpus albomyces*、*Sporotrichum thermophile* 等。这也进一步说明嗜热拟青霉的嗜热特性。

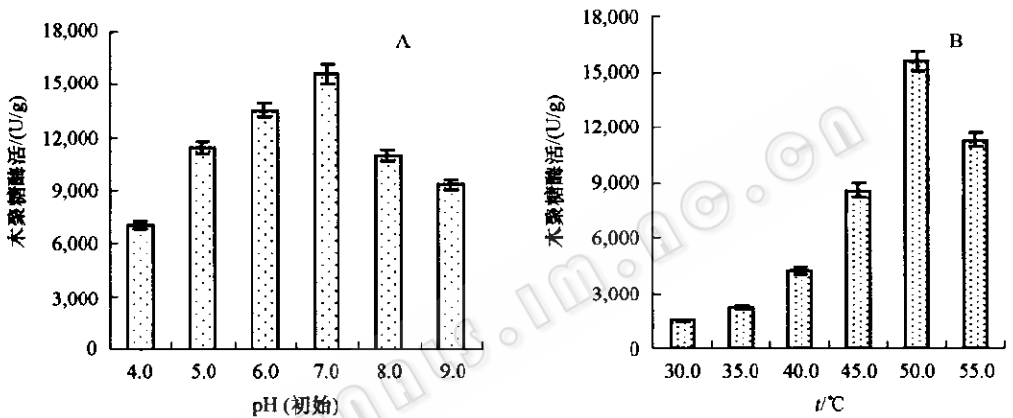


图 4 初始 pH (A) 和温度 (B) 对固体发酵产木聚糖酶的影响

2.5 固体发酵产木聚糖酶的历程

嗜热拟青霉菌固体发酵的产酶历程如图 5 所示, 第 8d 的产酶最高达 18,580 U/g 干基碳源。发酵第 1~2 d, 菌株分泌出的木聚糖酶很少, 从第 3d 开始分泌的酶量急剧增加, 到第 5 天时, 酶活力达到 9,602 U/g 干基碳源, 达到总产酶量的 50% 以上, 第 6~8d 是其产酶的高峰期, 第 9d 以后增长趋势变缓。微生物停止分泌木聚糖酶, 可能是由于发酵底物或者是其它一些拟青霉生长所需的生长素消耗尽, 不再适合其继续生长所致。与此同时, 在发酵过程中所产胞外蛋白含量的变化趋势和酶活力的变化趋势相近, 在第 9d 时达到最大 46.6 mg/g 干基 (图 5)。所产胞外蛋白的电泳图表明该株拟青霉所产的胞外蛋白主要为木聚糖酶 (结果未列出)。而且, 嗜热拟青霉固体发酵的粗酶液中没有检测到纤维素酶活性。

关于固体发酵产木聚糖酶的报道比较多, 但拟青霉固体发酵产木聚糖酶的研究尚未见报道。本研究的嗜热拟青霉 J18 能以天然的农业废弃物小麦秸秆为碳源固体发酵, 得到了高达 18,580 U/g 干基碳源的木聚糖酶, 是国际上为数不多报道产木聚糖酶水平超过 15,000 U/g 的高产真菌, 为国内所见固体发酵产木聚糖酶的最高值, 因此具有很大的工业化生产价值^[1,6]。有些真菌能利用小麦秸秆固体发酵产木聚糖酶, 但是这些报道的产酶水平都比较低。Kalogeris 等的研究表明, *Thermoascus aurantiacus* 以小麦秸秆为

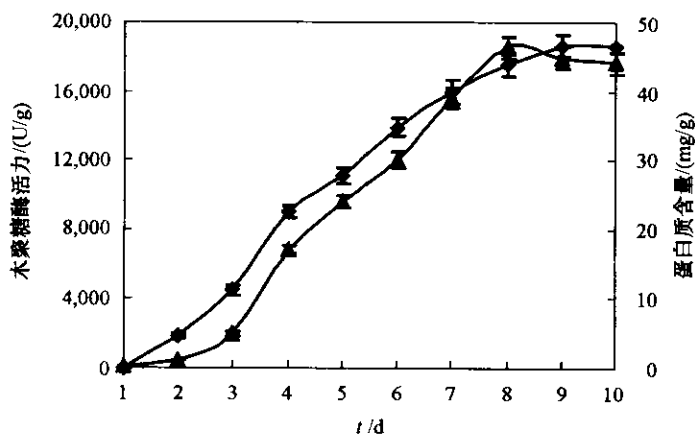


图5 固体发酵的产酶历程

—▲—木聚糖酶活力, —◆—蛋白质含量

碳源, 50℃下静置培养 5 d 产木聚糖酶的最高水平为 6,193 U/g 干基碳源^[13]。嗜热真菌 *Melanocarpus albomyces* II S-68 以小麦秸秆为碳源, 45℃下静置培养 4 d 产木聚糖酶的最高水平为 7,760 U/g 干基碳源^[14]。

通过温度稳定性的测定, 发现该酶在 60℃、pH7.0 下处理 24h 后酶活力仍保留在 80% 以上, 说明该酶具有比较好的温度稳定性 (数据没有列出), 适合于工业化应用。

3 结论

从土壤中筛选出一株新的高产木聚糖酶的嗜热拟青霉, 该菌株固体发酵产木聚糖酶的最适碳源为小麦秸秆。通过对发酵条件的优化, 产酶水平最高达 18,580 U/g 干基碳源, 具有很大的工业化应用前景。

参考文献

- [1] Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe K D, *et al.* Technol, 1996, **58**: 137 ~ 161.
- [2] Sonia K G, Chadha B S, Saini H S. Bioresour Technol, 2005, **96**: 1561 ~ 1569.
- [3] 李秀婷, 杨绍青, 江正强, 等. 工业微生物, 2004, **34** (4): 13 ~ 18.
- [4] 江正强, 李里特, 李 颖. 中国生物工程杂志, 2003, **23** (8): 47 ~ 51.
- [5] Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat M K. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, **64**: 461 ~ 488.
- [6] Polizeli M L T M, Rizzatti A C S, Monti R, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2005, **67**: 577 ~ 591.
- [7] 吴 克, 蔡敬民, 刘 斌, 等. 工业微生物, 1998, **28** (2): 31 ~ 34.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [9] Laemmli U K. Nature, 1970, **227**: 680 ~ 685.
- [10] 李秀婷, 李里特, 江正强. 微生物学通报, 2004, **31** (2): 49 ~ 54.
- [11] Brown A H S, Smith G. Transactions of the British Mycological Society, 1957, **40**: 17 ~ 89.
- [12] Samson R A. Stud Mycol, 1974, **6**: 1 ~ 119.
- [13] Narang S, Sahai V, Bisaria V S. J Biosci Bioeng, 2001, **92**: 425 ~ 427.