

## 棒曲霉 22 产木聚糖酶的研究

刘月英 郑忠辉 付欲晓\* 杨竞辉\*

(厦门大学生物学系, 厦门 361005)

**摘要** 从 105 株霉菌和酵母菌中筛选到一株木聚糖酶活力较高的棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*) 菌株 22。该菌株适宜的产酶培养基为 (g/l): 蔗渣半纤维素 30,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5, 酵母膏 5, 麸皮 10, 吐温 801 和少量无机盐, 初始 pH 5.5。最适的孢子接种量为  $4.9 \times 10^6$  个/ml。在上述培养基中 28℃ 振荡培养 72h, 木聚糖酶活力可达 335.9u/ml。酶反应的最适温度为 50℃; 最适 pH 为 4-8, 在 pH 6-11 酶活性稳定。50℃ 保温 1h, 酶活力剩余 72.6%; 在 8℃ 下放置 9 天, 剩余 90%。多种糖以及  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等离子可提高酶的水解活性, 而  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等离子则抑制酶的活性。

**关键词** 棒曲霉; 木聚糖酶

应用微生物来源的木聚糖酶降解半纤维素的主要组分木聚糖生产木糖, 或者以农作物残渣中的半纤维素为原料培养微生物生产经济价值较高的产品的研究具有重要意义。国外对木聚糖酶的研究已有不少报道<sup>[1-5]</sup>, 国内则较少。为了开发利用木聚糖酶, 我们筛选了一株木聚糖酶发酵周期短、酶特性良好、酶活力高的棒曲霉菌株 22。本文报告棒曲霉 22 木聚糖酶的液体发酵条件和粗酶液的性质。

### 材料和方法

#### (一) 菌种

棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*) 22 及其他供筛选的菌株均为本实验室保存的菌种。

#### (二) 半纤维素的制备

玉米芯半纤维素的制备按文献 [6]。稻草、麸皮和蔗渣半纤维素的制备, 除不用苯-乙醇混合液处理外, 其他步骤按文献 [6]。

#### (三) 培养基和培养方法

1. 斜面培养: 麸皮浸汁 10%, 琼脂 1.8%, 自然 pH, 28℃ 培养 72h。

2. 营养盐液: 除不含  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和尿素外, 其他成分同 Mandels 氏营养盐液<sup>[7]</sup>。

3. 产酶培养基 (%): (A) 在营养盐液中加

入碳源 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, 尿素 0.5, 蛋白胨 0.1, 麸皮 0.5, pH 5.5; (B) 在营养盐液中加入蔗渣半纤维素 3,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5, 酵母膏 0.5, 麸皮 1, pH 5.5。

50ml 凯氏管装培养液 15ml, 接孢子悬浮液于旋转式摇瓶机 (200r/min) 上 28℃ 培养 72h。

#### (四) 分析方法

1. 酶液的制备: 发酵液经过滤或离心得清液, 即为酶液。

2. 木聚糖酶活力<sup>[8]</sup>: 取适当稀释的酶液 0.5ml 加入用 0.2mol/L、pH 4.8 醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖 (oat spelt xylan, sigma) 溶液 0.5ml, 50℃ 酶解 15min。用 DNS 法测定还原糖 (以木糖计)。在上述条件下, 每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  木糖的酶量定义为 1 个酶活单位。

3. 蛋白质的测定: 采用 Folin 酚法。

### 结果

#### (一) 木聚糖酶产生菌的筛选

将菌种分别接入以玉米芯半纤维素为碳源的产酶培养基 A 中, 28℃ 振荡培养 72h, 测木聚糖酶活。从 105 株的曲霉、木霉、青霉和酵母中

\* 本系 92 届毕业生。

筛选出 11 株酶产量较高的菌株,其中棒曲霉 22 产量最高(表 1),为以下试验所选用。

表 1 菌种筛选结果

菌种	木聚糖酶活 (u/ml)
绿色木霉 547	95.6
绿色木霉 83421	120.0
黑曲霉 19-1	99.0
黑曲霉 3758	108.3
黑曲霉 119	122.6
黑曲霉 V-144	140.8
黑曲霉 12	137.5
黑曲霉 883	199.5
疏色曲霉	215.0
棒曲霉 39	260.2
棒曲霉 22	276.9

## (二) 产酶条件试验

1. 碳源的影响:在产酶培养基 A 中加入不同碳源进行产酶试验。结果(表 2)表明,以麸皮半纤维素为碳源酶产量最高,用蔗渣半纤维素为碳源的次之。鉴于蔗渣是糖厂的下脚料,来源丰富,本试验以蔗渣半纤维素为碳源。

表 2 碳源对棒曲霉 22 产酶的影响

碳源(2%)	木聚糖酶活 (u/ml)
甘露糖	13.0
葡萄糖	13.2
蔗糖	14.3
木糖	127.3
麸皮	163.6
稻草半纤维素	173.6
玉米芯半纤维素	235.7
甘蔗渣半纤维素	260.0
麸皮半纤维素	270.4
木聚糖	210.0

2. 蔗渣半纤维素浓度的影响:在不含麸皮

的产酶培养基 A 中添加蔗渣半纤维素 1、2、3、4、5 或 6% 时,木聚糖酶活分别为 92.8、213.2、248.3、322.1、394.9 和 340.2 u/ml。即当半纤维素浓度小于 5% 时,酶活力随碳源浓度的增加而提高,5% 时最高;浓度大于 5% 时酶活力下降。

3. 氮源的影响:在不含麸皮的产酶培养基 A 中添加蔗渣半纤维素和不同的氮源。结果(表 3)表明,用酵母膏 0.5% 与  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5% 混合作为氮源时酶产量最高。

表 3 氮源对产酶的影响

氮源	(%)	终 pH	木聚糖酶活 (u/ml)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1	2.8	110.6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	2.8	131.1
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1	6.0	246.6
尿素	1	7.8	83.8
玉米浆	1	6.5	139.9
黄豆粉	1	6.5	225.2
蛋白胨	1	7.0	278.8
酵母膏	1	7.0	319.7
蛋白胨	0.5+	7.0	295.0
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.5		
酵母膏	0.5+	7.0	321.7
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.5		

4. 麸皮添加量的影响:麸皮含有木糖苷类物质和微量生长因子,可促进木聚糖酶的合成。为了探讨麸皮的适宜添加量,在产酶培养基 B 中分别添加麸皮 0.5、1.0、1.5 和 2.0% (W/V),木聚糖酶活分别为 218.8、236.1、221.5 和 187.1 u/ml。即添加 1.0% 麸皮酶产量最高,比对照(无添加麸皮)提高 18.1%。添加量大于 1% 酶产量下降,说明蔗渣半纤维素 3% 加麸皮 1% 和酵母膏 0.5% 已可满足菌对碳源和生长因子的需要。

5. 培养基起始 pH 的影响:用不同起始 pH 的产酶培养基 B 进行试验。结果(表 4)表明,起始 pH 5.5 (终 pH 6.5) 酶产量最高。

6. 通气量的影响: 用 250ml 三角瓶分别装培养液 25、50、75ml 进行试验。结果表明, 装液量 25ml 时酶产量最低 (230u/ml), 装量 50 和 75ml 的酶产量分别为 273.5u/ml 和 289.5u/ml, 说明棒曲霉 22 产木聚糖酶对通气量要求不高。

表 4 培养基起始 pH 的影响

起始 pH	终 pH	木聚糖酶活 (u/ml)
4.0	3.4	74.6
5.0	6.2	263.8
5.5	6.5	292.5
6.0	7.2	244.4
7.0	8.1	212.5

7. 接种量的影响: 用产酶培养基 B 进行试验。结果 (表 5) 表明, 接种量对酶产量影响颇大。接种量为孢子浓度  $4.94 \times 10^6$  个/ml 时酶产量最高; 提高接种量, 酶产量则减少。

表 5 接种量对产酶的影响

孢子浓度 ( $\times 10^6$ 个/ml)	木聚糖酶活 (u/ml)
2.47	267.9
3.70	292.1
4.94	311.1
6.18	270.9

8. 表面活性剂的影响: 试验结果表明, 在产酶培养基 B 中添加吐温 80 0.1% 和 0.3%, 酶产量分别比对照的 (无表面活性剂) 提高 11.0% 和 12.5%; 添加十二烷基硫酸钠 (SDS) 0.02%, 酶产量比对照的降低 17.0%。

9. 产酶时间曲线: 用 250ml 三角瓶装 75ml 添加吐温 80 0.1% 的产酶培养基 B 进行试验, 定时取样测木聚糖酶活、胞外可溶蛋白质和 pH。从图 1 可见, 培养 3 天, 酶产量已达最高值 (335.9u/ml)。

### (三) 木聚糖酶的性质

1. 酶作用的最适 pH 和温度: 在不同 pH

下 50℃ 测定酶活力的结果表明, 酶作用的最适 pH 为 4.8,  $\text{pH} < 3.8$ , 酶活力显著下降。在不同温度下测定酶活力的结果表明, 酶作用的最适温度为 50℃。

2. 酶的 pH 和热稳定性: 将酶液调至不同的 pH 值, 8℃ 放置 24h。适当稀释后测剩余酶活力的结果表明, 在 pH 6—11 范围内酶活力仍可剩余 85% 以上。将酶液置于不同的温度下保温 1 h, 50℃ 测酶活力的结果表明, 酶液在 40、45、50、55 和 60℃ 水浴中处理 1 h, 酶活力分别剩余 98.8、90.2、72.6、50.0 和 29.8%。

3. 酶液的贮存稳定性: 将酶液 (自然 pH, 即 6.5) 于 8℃ 下放置一定时间, 取样测酶活力的结果表明, 贮存 9 天酶活力剩余 90%, 16 天还剩余 60%。

4. 添加物的影响: 在酶活力测定系统中分别加入浓度为 10mmol/L 的木糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和蔗糖, 测定酶活力。结果表明, 上述几种糖的存在均可使木聚糖酶的活性提高。其中蔗糖的作用最显著, 可比对照 (无添加糖) 提高 21%。

据报道<sup>[9]</sup>, 一些金属离子在一定的浓度下对木聚糖酶活性有抑制或激活作用。在酶反应系统中分别加入一定浓度的不同金属离子, 测定木聚糖酶活力, 结果列于表 6。

表 6 金属离子对木聚糖酶活力的影响

金属离子	浓度 (mmol/L)	相对活性 (%)
对照	0	100
$\text{Co}^{2+}$	1	75
$\text{Ag}^+$	1	98
$\text{Cu}^{2+}$	1	98
$\text{Cu}^{2+}$	5	16
$\text{Zn}^{2+}$	5	110
$\text{Mg}^{2+}$	10	99
$\text{Ca}^{2+}$	10	105
$\text{Na}^+$	10	112

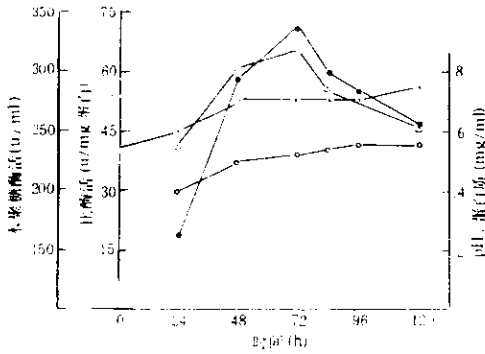


图1 棒曲霉22的产酶曲线

●---● 木聚糖酶活力; ×---× pH  
△---△ 木聚糖比酶活力; ○---○ 蛋白质

### 讨 论

棒曲霉22在葡萄糖、甘露糖和蔗糖等碳源中生长,木聚糖酶产量很低;而在木糖或者木聚糖、半纤维素和麸皮等含木糖苷类物质存在时,可合成大量的木聚糖酶。这表明,该菌的木聚糖酶属诱导酶。但该菌在葡萄糖中生长时,酶产量比许多木聚糖酶产生菌<sup>[1-5,10]</sup>高得多。这可能是由于该菌具有部分组成性的木聚糖酶,或该菌的木聚糖酶基础水平较高。棒曲霉22以半纤维素为碳源时酶产量比用纯木聚糖为碳源的高,在含蔗渣或蔗渣半纤维素加麸皮的培养基中生长还合成纤维素酶系(结果未列出)。这些特性表明,该菌具有利用含木糖苷类物质的工业下脚料或农副产品废渣作为碳源生产大量木聚糖酶和用于处理木质纤维材料的潜力。

棒曲霉22在以生理酸性,如(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl,或生理碱性,如尿素为氮源的培养基中生长时,发酵液的pH降至2.8或升至7.8,酶产量很低;而在NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>或有机氮源的培养基中生长时,发酵液的pH值为6-7,酶产量均较高。在发酵起始pH 5.5时,酶产量最高;高于或低于此值,酶产量明显下降;起始pH为4时,酶产量急剧下降(见表4)。从发酵过程(图1)来看,在发酵的前48h,发酵液的pH、胞外可溶蛋白量、木聚糖酶活力及其比活力均

随发酵时间的延长而迅速提高。48h后,在较长的一段时间内,pH稳定在7,然后升至7.5。当pH稳定在7时,酶的活力和比活力最高,然后下降。这些结果表明,棒曲霉22木聚糖酶的合成强烈地受pH影响;在pH接近于中性时该酶大量合成。这一特性与*Chaetomium cellulolyticum*相同<sup>[5]</sup>,而与*Aspergillus awamori*<sup>[5]</sup>和*Asp. niger An-76*<sup>[10]</sup>木聚糖酶的合成需维持在低的pH环境的特性不同。

从棒曲霉22木聚糖酶的性质来看,该酶具有较宽的pH稳定性和贮存(8℃)稳定性,特别是具有碱稳定性;该酶对木聚糖的水解活性不受其水解产物木糖等多种糖抑制,相反,可能由于糖的存在降低了介质的电介常数,而有利于酶的稳定而使酶的活性提高<sup>[9]</sup>;Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>等普遍存在于水中的金属离子对酶的活性有激活作用,低浓度的Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>对酶的活性无明显抑制作用。这些特性表明,该菌具有良好的应用前景。

一般野生型的木聚糖酶产生菌的酶产量均较低<sup>[1,2,4,5,10]</sup>,但棒曲霉22可达335.9u/ml。如果通过诱变选育,结合最优化的发酵条件,可望进一步提高其酶的合成水平。

### 参 考 文 献

1. Yasui T et al. ; *J. Ferment. Technol.* , **62** (4) : 353-359, 1984.
2. Mishra C et al. ; *Enzyme Microb. Technol.* , **7** : 295-299, 1985.
3. Royer J C et al. ; *Enzyme Microb. Technol.* , **11** : 405-410, 1989.
4. Murty M V S et al. ; *Enzyme Microb. Technol.* , **13** : 430-434, 1991.
5. Smith D C et al. ; *Biotechnol. Bioeng.* , **38** : 883-890, 1991.
6. 北京大学制药厂编: *微生物和酶学基本知识*, P. 201, 科学出版社, 北京, 1971.
7. Mandels M et al. ; *Adv. Chem. Ser.* , **95** : 391, 1969.
8. Khan A W ; *Enzyme Microb. Technol.* , **8** : 373-377, 1986.
9. Capalash N et al. ; *Lett. Appl. Microbiol.* , **12** : 31-33, 1991.
10. 陈惠忠等: *微生物学报* , **30** (5) : 351-357, 1990.

(1992-09-20 收稿)

## STUDIES ON XYLANASE PRODUCTION BY *ASPERGILLUS CLAVATUS* 22

Liu Yueying Zheng Zhonghui Fu Yuxiao Yang Jinghui

(Department of Biology, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005)

A high xylanase producing strain 22 of *Aspergillus clavatus* was screened from 105 strains of molds and yeasts. The suitable medium consisted of (g/L): bagasse hemicellulose 30,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5, yeast extract 5, wheat bran 10, Tween 80 1 and a small quantity of other minerals; initial pH 5.5. The optimal spore inoculum was  $4.9 \times 10^6$  spores/ml (final concentration). The activity of xylanase was as high as 335.9 U/ml in shake-flask experiment at 28°C for 72 h. The optimal temperature and pH for xylanase reaction were 50°C and pH 4.8. 72.6% of its original activity was remained after incubation at 50°C for 1 h, and 90% of the enzym activity was observed upon storage at 8°C for 9 days. Sugars,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  increased its activity whereas  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  inhibited it.

**Key words** *Aspergillus clavatus*; Xylanase