

黑曲霉 A3 菌株木聚糖酶粗酶制剂的制备和性质

吴 克 蔡敬民 潘仁瑞

(合肥联合大学生物工程教研室 230022)

摘要 本文研究了黑曲霉 (*Aspergillus niger* A3) 菌株固体发酵培养的产酶过程, 发酵 3d 产木聚糖酶活最高, 固体曲最适浸提比为 1:7 (w / v), 通过 60%~65% 饱和度的硫酸铵盐析, 获得的木聚糖酶活力最高。冻干酶粉活力为 15400u / g, 得率为 71%, 40℃ 烘干酶粉活力为 15395u / g, 得率为 51%, 酶反应最适温度 55℃, 最适 pH4.6, 保温 1h 半失活温度 ($t_{1/2}$) 为 54℃, 酶对四种不同底物半纤维素水解作用的亲合性为麸皮最强, 稻草最弱。

关键词 黑曲霉, 木聚糖酶, 粗酶制剂制备

木聚糖酶 (xylanase, EC3.2.1.8) 可水解植物材料中的半纤维素, 它是一种重要的木糖苷内切水解酶。近年来, 由于木聚糖酶及其水解产品在造纸^[1]、饲料及发酵工业中的潜在价值, 受到国内外的重视。黑曲霉木聚糖酶的固体发

酵及其粗酶制剂的制备在中小型企业中易于推广应用。但国内外有关固体发酵法制备木聚糖

安徽省自然科学基金资助项目 (95-生-09)

1996-10-10 收稿

酶制剂的报道较少。黑曲霉 A3 菌株是本课题组分离筛选的产木聚糖酶活较高的菌株,它在固体培养基中的产酶活力比 Deschamp^[2]报道的产量高 180%,具有工业生产前景。本文研究了黑曲霉 A3 菌株木聚糖酶的固体发酵、提取与分离过程和相关性质。

1 材料与方法

1.1 菌株

黑曲霉 A3 菌株由本课题组分离纯化。

1.2 材料

蔗渣,稻草,麸皮和玉米蕊半纤维素均由本室制备。

1.3 培养条件

1.3.1 培养基:斜面培养基(g/L):麸皮 5,蛋白胨 1,琼脂 20,用 Mandels 盐溶液配制。

固体发酵培养基:在 250ml 三角瓶中加入 4.5g 蔗渣粉和 3g 麸皮,用 1.5 倍(w/v)改良 Mandels 盐(在 Mandels 盐中加入 4.0g/L NaNO_3)及适量水配制。

1.3.2 接种和培养:制备孢子悬液,每瓶固体培养基接种 1ml(4×10^7 个孢子)孢子悬液,搅拌均匀后,于 28℃ 培养 3d。

1.4 分析测试方法

1.4.1 木聚糖酶活力测定:DNS 法,参照文献[3]。以木糖为标准,每 min 形成 1umol 还原糖定义为 1 个酶活力单位(u/ml)。

1.4.2 羧甲基纤维素酶活力测定按文献[3]的方法。

1.4.3 蛋白质含量的测定:采用 Bradford 比色测定法^[4]。

2 结果和讨论

2.1 固体发酵时间对 A3 菌株产酶活力影响

A3 菌株在麸皮、蔗渣固体培养基中可产生高活力的木聚糖酶,同时产生的内切葡聚糖酶活力则较低。在培养 3d 后,木聚糖酶活力达最大值(表 1),此时,木聚糖酶与内切葡聚糖酶活力的比值为 119.7。

2.2 固液浸提比对木聚糖酶活力的影响

使用 0.05mol/L pH4.6 醋酸缓冲液浸提固体 2.5h,固液浸提比(w/v)不同,所得酶活力也不同(表 2)。从单位酶活力来看,酶活大小分别为 1:3 > 1:5 > 1:7 > 1:9,但从酶总活力比较,则为 1:7 > 1:5 > 1:9 > 1:3。由此得出使用 1:7 浸提比萃取 A3 菌株的固体曲中木聚糖酶较合理。固体曲浸提后经过滤即得粗酶液。

2.3 木聚糖酶硫酸铵盐析分离

2.3.1 不同饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析木聚糖酶:取粗酶液各 5ml,分别用不同饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析沉淀 1h,冷冻离心(湘仪厂产 GL-20 高速冷冻离心机)3500r/min 离心 15min,收集沉淀并用 0.05mol/L pH4.6 醋酸缓冲液 5ml 溶解,分别测定沉淀液中的木聚糖酶和内切葡聚糖酶活力以及蛋白质沉淀量。结果见图 1。

结果表明: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度增加,粗酶液中木聚糖酶和内切葡聚糖酶沉淀量也增加较

表 1 发酵时间对 A3 菌株产酶活力影响

时间 (d)	1	2	3	4	5	6
木聚糖酶活力 (u/g)	207.8	3028.8	4369.5	3400.0	1194.0	1172.0
纤维素酶活力 (u/g)	9.6	32.7	36.5	39.0	40.0	40.2

表 2 固液浸提比对酶活的影响

浸提比	固体曲 (g)	粗酶液 (ml)	酶活力 (u/ml)		酶总活力 (u)		木聚糖酶相对得率
			木聚糖酶	纤维素酶	木聚糖酶	纤维素酶	
1:3	10.0	12.8	71.93	2.40	920.70	30.72	60.7
1:5	10.1	28.8	49.96	1.34	1438.85	38.59	94.8
1:7	8.0	33.0	45.96	1.21	1516.68	39.60	100.0
1:9	7.7	45.0	23.58	0.42	1061.10	18.90	70.0

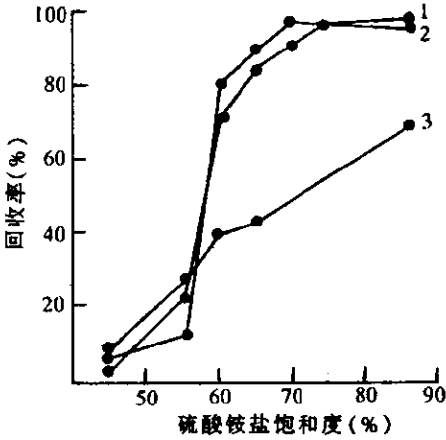


图1 不同饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的盐析效果

1.纤维素酶, 2.木聚糖酶, 3.蛋白质

快,蛋白质沉淀量则增加缓慢,从木聚糖酶活,内切葡聚糖酶活和蛋白质质量的三者综合分析得出 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度在60%~65%时,木聚糖酶活得率为80%~90%,内切葡聚糖酶活得率为70%左右,粗酶液中总蛋白沉淀量为60%以下。它可有效地去除部分纤维素酶和杂蛋白,获得较高得率的木聚糖酶。由此可见,采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐一步沉淀法分离A3菌株的木聚糖酶效果较好。这比多级沉淀法分离木聚糖酶^[5]在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐的使用剂量和操作时间及过程都有所减少。为该酶在今后工业化生产中提出一定参考依据。

同时选取60%、65%两种饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,比较沉淀时间为1h和15h,结果表明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 65%饱和度盐析后两种酶得率均高于60%的饱和度;同时时间延长,沉淀中内切葡聚糖酶活和总蛋白质有所降低,它可以去除部分杂蛋白质相应地提高木聚糖酶的纯度。

2.3.2 A3菌株木聚糖酶粗酶制剂及其性质。

综合上述各种因素,对A3菌株进行固体发

酵培养,经过浸提,并用65%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,通过冷冻离心,收集沉淀物,再分别用真空干燥仪(Flexi-Dry,美国产)冷冻干燥和真空加热干燥箱(上海产)40℃加热干燥获得粗酶粉,结果见表3。其最适反应pH、温度分别为4.6和55℃,酶的半失活温度为54℃。

将获得的粗酶制剂配成溶液,分别对稻草、麸皮、蔗渣及玉米蕊这四种不同底物进行水解,测定溶液中还原糖释放量,采用Lineweaver-Burk作图,求得 $K_m(\text{mg/ml})$ 值分别为稻草62.82、麸皮18.73、蔗渣52.25、玉米蕊为53.04。该酶与底物的亲和性顺序为:麸皮>蔗渣>玉米蕊>稻草。这可能与A3菌株的筛选和培养条件有关。由于木聚糖酶属于诱导酶,选择不同底物的培养基,可能会对该酶亲合性具有影响,所以在应用木聚糖酶制剂时应对其培养底物加以注意。

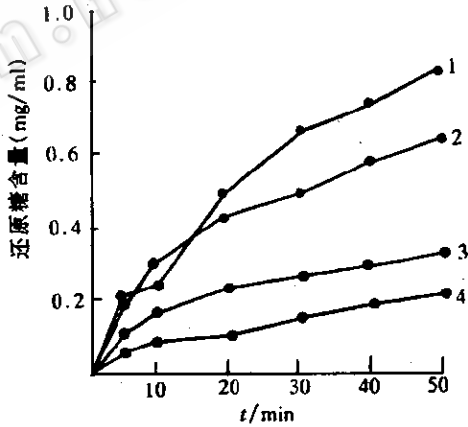


图2 木聚糖粗酶水解底物的还原糖释放量图

1.麸皮; 2.蔗渣; 3.稻草; 4.玉米蕊

将粗酶制剂配制成0.874u/ml溶液,分别在50℃恒温水浴中振荡降解含有1ml 2%稻草、蔗渣、玉米蕊、麸皮的半纤维素溶液,定时测定

表3 粗酶制剂的活力得率

	状态	总量	单位酶活	总酶活	得率(%)
冷冻干燥	粗酶液	400ml	130u/ml	52000u	100
	酶粉	2.402g	15400u/g	36990.8u	71
40℃干燥	粗酶液	250ml	117u/ml	29250u	100
	酶粉	0.969g	15395u/g	14917.8u	51

反应液中的还原糖生成量。结果如图 2 所示。

酶水解物 50min 后, 反应液中的还原糖浓度分别为: 稻草 0.301mg / ml, 玉米蕊 0.197mg / ml, 蔗渣 0.496mg / ml, 麸皮 0.816mg / ml。

参 考 文 献

[1] Viikari L, Ranua M, Kantelinen A *et al.*

Proceedings Third Int Biotechnol. pulp paper Industry, stockholm, 1986, 67~69.

[2] Deschamps F, Huet C. Appl Microbiol Biotechnol, 1985, 22: 177~180.

[3] Bailey M J, Biely Pand Poutanen K. J. Biotechnol, 1992, 23: 257~270.

[4] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.

[5] 曾宇成, 张树政. 微生物学报, 1987, 27(4): 343~356.

XYLANASE PREPARATION AND PROPERTIES FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Wu Ke Cai Jingmin Pan Renrui

(Hefei Union University, Hefei 230022)

Abstract The production process of xylanase of solid-state fermentation from *Aspergillus niger* was studied. The maximum enzyme activity can be obtained when the fungus was cultured for 3 days. The ratio between the solid culture and the extracting agent was about 1:7(w / v). The saturation condition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is the range from 60%~65%. Two kinds of xylanase enzyme powder were obtained by both freezer drying and at 40℃ heating drying, and the rate of recovery 71% and 51% were respectively. The highest xylanase activity has about 15400u / g by freezer drying, 15395u / g by heating drying. The related properties of enzyme were analysed. the optimal temperature is 55℃ and pH is 4.6. The temperature for loss half activity($t_{1/2}$) in a hour is 54℃. Among the four kinds of hemicellulose, the strongest and the weakest hydrolytic affinity of xylanase are wheat bran and rice straw respectively.

Key words *Aspersillus niger*, Xylanase, Xylanase preparation