

嗜热拟青霉产胞外木糖苷酶发酵条件的优化<sup>\*</sup>王 岚<sup>1</sup> 江正强<sup>1\* \* \*</sup> 杨绍青<sup>1</sup>

( 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083 )

**摘要** 嗜热拟青霉 J18 是由本实验室筛选并保存的拟青霉新种。该菌能够利用玉米芯为碳源、尿素为氮源液体发酵高产胞外  $\beta$ -木糖苷酶。单因素优化试验表明 5% 的粒度为 0.45mm ~ 0.9mm 的玉米芯、1% 尿素、初始 pH 6.5、温度为 45℃ 是最佳产酶培养条件。在优化后的条件下, 培养 5d 产  $\beta$ -木糖苷酶的活力最高达 3.15U/mL 比酶活为 2.43U/mg。该菌所产的木聚糖酶和木糖苷酶协同作用可将桦木木聚糖完全降解成木糖, 水解 24h 后, 其水解液中还原糖含量比只加入电泳纯木聚糖酶的水解液提高了 64%。

**关键词** 拟青霉  $\beta$ -木糖苷酶 液体发酵 玉米芯 尿素

中图分类号: Q93-939 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0519-05

# Optimization of $\beta$ -xylosidase Production by *Paecilomyces thermophila* J18 in Liquid State Fermentation<sup>\*</sup>

WANG Lan<sup>1</sup> JIANG Zheng-Qiang<sup>1\* \* \*</sup> YANG Shao-Qing<sup>1</sup>

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

**Abstract** : *Paecilomyces thermophila* J18 was a novel fungus isolated from soil and preserved in our lab. This strain produced a high-level extracellular  $\beta$ -xylosidase utilizing corncob as carbon source and urea as nitrogen source in the liquid-state fermentation. The result of single-factor-experiment revealed that 5% corncob of particle size 0.45mm ~ 0.9mm, 1% urea, initial pH 6.5 and cultivation temperature of 45℃ were the optimal conditions for  $\beta$ -xylosidase production.  $\beta$ -xylosidase activity and specific activity were 3.15U/mL and 2.43U/mg respectively, after 5 days of cultivation in the optimized conditions. The birchwood xylan were degraded into xylose completely as the result of the synergistic action of xylanase and xylosidase from *Paecilomyces thermophila* J18, and the combination of xylanase and xylosidase enhance the reducing sugar yield by 64% comparing the xylanase single action after 24 h hydrolysis.

**Key words** : *Paecilomyces thermophila*,  $\beta$ -Xylosidase, Liquid-state fermentation, Corncob, Urea

木聚糖降解酶系主要包括  $\beta$ -D-1, 4-木聚糖酶 ( $\beta$ -D-1, 4-xylanase, EC 3.2.1.8) 和  $\beta$ -木糖苷酶 ( $\beta$ -1, 4-xylosidase, EC 3.2.1.37)。  $\beta$ -D-1, 4-木聚糖酶随机作用于木聚糖主链内部的木糖苷键, 将其分解成低聚木糖。而  $\beta$ -木糖苷酶则主要作用于低聚木糖的末端, 催化水解  $\beta$ -木糖苷键, 从而将木寡糖彻底分解为木糖<sup>[1]</sup>。木聚糖降解酶系在能源、造纸和医药等行业有广泛的应用前景。在能源产业中, 农业废弃物中的木聚糖经木聚糖酶降解后生成寡糖, 再由木糖苷酶完全降解, 产生的木糖可以被细菌及真菌转换成酒精等燃料。在制浆造纸工业中, 木糖苷酶与

木聚糖酶协同作用可以提高麦草浆的漂白性能和纸张性能<sup>[2]</sup>。在医药工业中, 木糖苷酶水解特定的底物可以生成抗肿瘤新药紫杉醇的前体物质<sup>[3]</sup>。

目前, 国内外有关木聚糖降解酶系的研究主要集中在  $\beta$ -1, 4-木聚糖酶, 而对  $\beta$ -木糖苷酶的研究相对较少。木糖苷酶可以由细菌、真菌(包括酵母)等微生物和高等植物产生。微生物  $\beta$ -木糖苷酶大部分为胞内酶<sup>[1]</sup>, 少数真菌能产胞外  $\beta$ -木糖苷酶。国际上报道产胞外  $\beta$ -木糖苷酶的真菌有 *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium proliferatum*<sup>[2, 4, 5]</sup>。嗜热真菌中产  $\beta$ -木糖苷酶の有

<sup>\*</sup> 教育部“新世纪优秀人才支持计划”部分内容(No. NCET-05-0130)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 Tel: 010-62737689, E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2006-09-04, 修回日期: 2006-10-18

*Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Sporotrichum thermophile*<sup>[6,7]</sup>。国内 $\beta$ -木糖苷酶的报道很少,仅有曲霉(*Aspergillus*) $\beta$ -木糖苷酶的纯化, $\beta$ -木糖苷酶的克隆表达和纯化以及草菇中木糖苷酶的分离纯化。本实验室从土壤中筛选出的嗜热拟青霉 J18 为拟青霉的一个新种,能高产木聚糖酶<sup>[8]</sup>,在发酵过程中还发现有胞外 $\beta$ -木糖苷酶产生。迄今为止,国内外尚未见拟青霉属微生物产 $\beta$ -木糖苷酶的相关报道。因此,本文研究嗜热拟青霉 J18 产胞外 $\beta$ -木糖苷酶液体发酵条件的优化,分析与内源木聚糖酶一起水解木聚糖的协同作用,为今后研究该酶的纯化和性质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和试剂

嗜热拟青霉(*Paecilomyces thermophila*) J18 菌株由本实验室从土壤中筛选并保存。胰蛋白胨、酵母提取物为英国 Oxoid 公司产品。对-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷(pNP-X, *p*NP- $\beta$ -D-xylocopyranoside), 梓木木聚糖为美国 Sigma 公司产品。尿素为北京北化精细化学品有限责任公司产品。玉米芯、玉米皮、玉米杆、麸皮、甘蔗渣经粉碎后过筛备用。硅胶板 Merck Silica Gel 254 为德国 Merck 公司产品。

### 1.2 培养基组成和培养条件

种子培养基:马铃薯葡萄糖培养基。

发酵产酶培养基:玉米芯 40g, 酵母提取物 5g, 胰蛋白胨 5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{FeSO}_4$  0.3g,  $\text{CaCl}_2$  0.3g, 定容至 1L, 调 pH 至 6.5, 于 250mL 三角瓶中装入 50mL 培养基,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。

培养条件:50℃, 160r/min 培养 5d。

### 1.3 发酵产酶条件的优化

采用单因素试验优化发酵条件,即在上述培养条件下,首先考察不同的碳源种类对该菌产酶的影响。最佳碳源确定后,改变碳源添加量(2%~6%)和碳源的粒度(0.125mm~0.9mm),研究对该菌产酶的影响。接着改变氮源种类和氮源的添加量(0.5%~2.5%),研究其对该菌产酶的影响。在优化碳源和氮源的基础上,在 pH 5.0~9.0 范围内调节培养基的初始 pH,以确定最佳初始 pH 值。最后将菌株分别在 40℃、45℃、50℃和 55℃下培养以确定最适

产酶温度。单一因素优化的基础上,采用最适培养条件培养 7 d 研究液体发酵的产酶历程。

### 1.4 酶活力和蛋白含量的测定

$\beta$ -木糖苷酶酶活力的测定参照 Lacke 法<sup>[9]</sup>: 0.05mL 适当稀释的酶液加入到 0.2mL(0.05mol/mL pH 6.5 磷酸缓冲溶液配制)0.005mol/mL *p*NP-X 底物溶液中,50℃下反应 10min 后,加入 0.75mL 2mol/mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应,在 410nm 处测定吸光值。木糖苷酶活力单位(U)定义为:在上述条件下,每分钟生成 1 $\mu$ mol *p*NP 所需要的酶量。蛋白质含量的测定采用 Lowry 法,以牛血清蛋白为标准。实验结果均为 3 次平行实验的平均值。

### 1.5 水解特性

内源电泳纯木聚糖酶的制备参照本研究室的 Li 等<sup>[10]</sup>的方法。采用最适培养条件制备酶液,9000g 冷冻离心 10min。所得上清液经 45%~60% 的硫酸铵沉淀主要含有木聚糖酶和木糖苷酶。以 1%的梓木木聚糖为底物,分别加入嗜热拟青霉产的木聚糖酶(0.5U/mL,电泳纯)和硫酸铵沉淀的粗酶(其中含 0.5U/mL 木聚糖酶和 0.025U/mL 木糖苷酶),置于 50℃、160r/min 的水浴摇床水解。分别在 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h 和 24h 时取样,采用 Fernell 法测定总糖和 Somogyi 法测定还原糖。取 0h, 1h, 2h, 4h 的水解样品进行 TLC 分析。硅胶板 Merck Silica Gel 254, 展层剂为乙腈:水 = 85:15(V/V), 展层 3 次,显色液为 5%的硫酸甲醇溶液,100℃烘烤 5min。标准糖为木寡糖的混合物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳源对产酶的影响

一些单糖(木糖、葡萄糖和果糖)、二糖(蔗糖、麦芽糖和纤维二糖)和多糖(微晶纤维素和淀粉)以及麸皮作为碳源的发酵液中均未检测到 $\beta$ -木糖苷酶酶活。其它碳源如木聚糖、玉米杆、玉米皮、甘蔗渣只能产生少量的胞外 $\beta$ -木糖苷酶(低于 0.02U/mg)。研究发现玉米芯作为碳源时,菌株发酵产胞外 $\beta$ -木糖苷酶活力最高。图 1 是玉米芯的浓度和粒度对产酶的影响。当玉米芯浓度为 5%,颗粒度为 0.45mm~0.9mm, $\beta$ -木糖苷酶的酶活最高为 2.05U/mL,比酶活为 1.29U/mg。因此,该菌产胞外 $\beta$ -木糖苷酶的理想碳源是颗粒度为 0.45mm~0.9mm 的

5%的玉米芯。目前大多数报道中木聚糖作碳源能高产  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[5 6]</sup>,而木聚糖价格昂贵,嗜热拟青

霉 J18 能够利用天然玉米芯发酵高产胞外  $\beta$ -木糖苷酶,可大大降低生产成本。

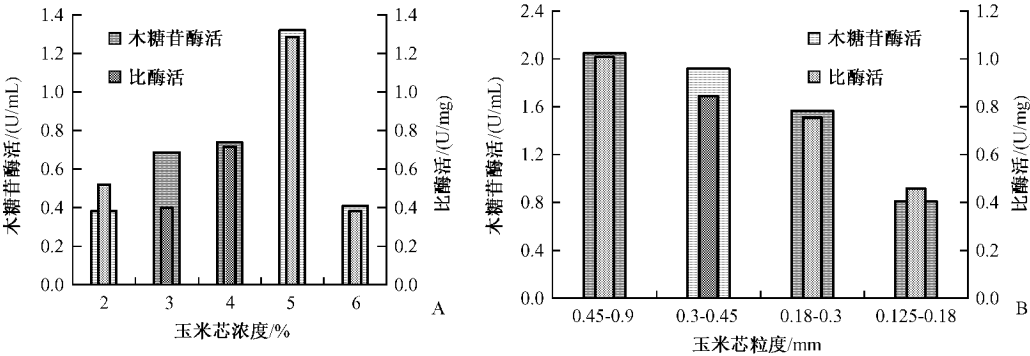


图 1 玉米芯添加量(A)和玉米芯粒度(B)对产酶的影响

2.2 氮源对产酶的影响

不同氮源对嗜热拟青霉产胞外  $\beta$ -木糖苷酶的影响见表 1。各种氮源中以牛肉蛋白胨产胞外  $\beta$ -木糖苷酶酶活最高(1.87U/mL),尿素次之(1.77U/mL),而尿素作氮源得到的  $\beta$ -木糖苷酶比酶活最高(1.28U/mg)。酪蛋白、麦芽汁提取物和其它无机氮源  $KNO_3$ 、 $NaNO_3$ 、 $NH_4NO_3$ 、 $(NH_4)_2SO_4$  得到的胞外  $\beta$ -木糖苷酶活力较低(低于  $0.126U/mL \pm 0.003U/mL$ )。4 种不同氮源发酵液的电泳图(图 2)显示:该菌主要产生 26.0kD 的木聚糖酶,以牛肉蛋白胨和尿素为氮源时,50kD 的  $\beta$ -木糖苷酶清晰可见,并且尿素发酵液中杂蛋白量较少。图 3 为尿素的添加量对产酶的影响。实验表明,以 1%的尿素为氮源时产生的胞外  $\beta$ -木糖苷酶活力最高,达 2.30U/mL,比酶活为 1.52U/mg。国际上常见报道是有机氮源或有机和无机复合氮源作为最适产酶氮源<sup>[5 6]</sup>,而嗜热拟青霉则可以利用廉价的无机氮源尿素产生较高酶活的  $\beta$ -木糖苷酶。

表 1 氮源种类对产酶的影响

氮源种类	木糖苷酶活 ( U/mL )	蛋白含量 ( U/mg )	比酶活 ( U/mg )
胰蛋白胨	1.339 $\pm$ 0.026	2.271 $\pm$ 0.045	0.590 $\pm$ 0.013
酵母提取物	0.401 $\pm$ 0.008	1.795 $\pm$ 0.036	0.223 $\pm$ 0.005
牛肉蛋白胨	1.869 $\pm$ 0.037	2.270 $\pm$ 0.048	0.823 $\pm$ 0.017
尿素	1.767 $\pm$ 0.035	1.380 $\pm$ 0.025	1.281 $\pm$ 0.024

2.3 其它液体发酵条件的优化及  $\beta$ -木糖苷酶的产酶历程

当液体培养基初始 pH 为 6.5 时,嗜热拟青霉 J18 产  $\beta$ -木糖苷酶酶活和比酶活最高。培养基初始

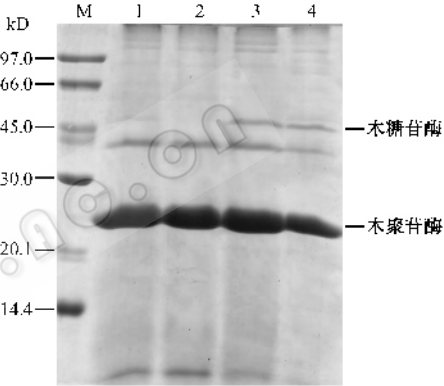


图 2 4 种不同氮源培养的 SDS-PAGE 图

M 低分子量标准蛋白,1 胰蛋白胨,2 酵母提取物,3 牛肉蛋白胨,4 尿素 1、2、3、4 列上样量均为 30 $\mu$ g

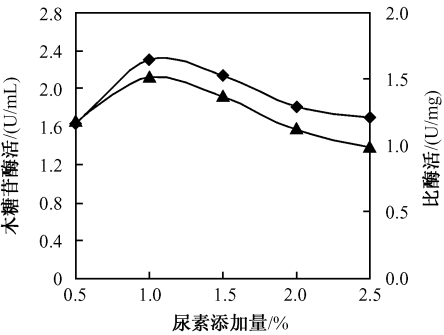


图 3 不同尿素浓度对产酶的影响

—◆— 木糖苷酶, —▲— 比酶活

pH 6.0 ~ 8.0,  $\beta$ -木糖苷酶的酶活在 1.5U/mL 以上,比酶活在 1.2U/mg 以上(数据未列出)。大多数产木糖苷酶的真菌产酶最适初始 pH 为 5.0 ~ 6.0<sup>[2 5 6]</sup>,而嗜热拟青霉 J18 在初始 pH 6.0 ~ 8.0 的中性偏碱性条件下也可以产生较高的酶活。培养温度为 45 $^{\circ}$ C 时测得该菌产胞外  $\beta$ -木糖苷酶酶活最高,在

40℃和50℃下产生的 $\beta$ -木糖苷酶酶活也较高(数据未列出)。已报道的大多数真菌产 $\beta$ -木糖苷酶的最适培养温度在30℃左右<sup>[4,5]</sup>,嗜热拟青霉J18是少数可以在45℃以上培养产木糖苷酶的嗜热真菌<sup>[6,7]</sup>。

根据以上优化的条件,嗜热拟青霉J18的产酶历程见图4。在整个发酵过程中,发酵液中蛋白浓度逐渐升高, $\beta$ -木糖苷酶的酶活力在发酵第3d到第5d时显著升高,随后则慢慢降低。发酵第5d, $\beta$ -木糖苷酶的活力最高达3.15U/mL,此时发酵液中 $\beta$ -木糖苷酶的比酶活为2.43U/mg。不同培养时间的发

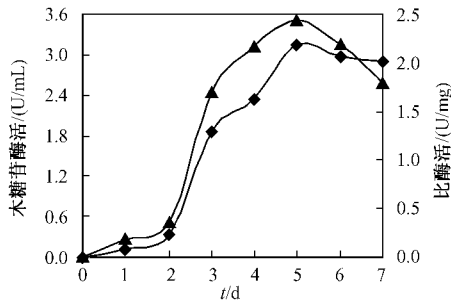


图4  $\beta$ -木糖苷酶的产酶历程

—◆— 木糖苷酶, —▲— 比酶活

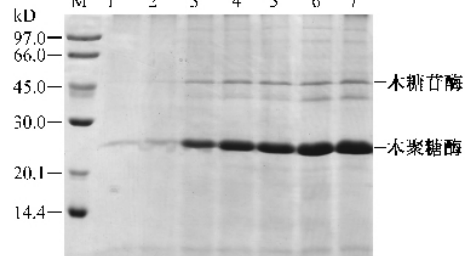
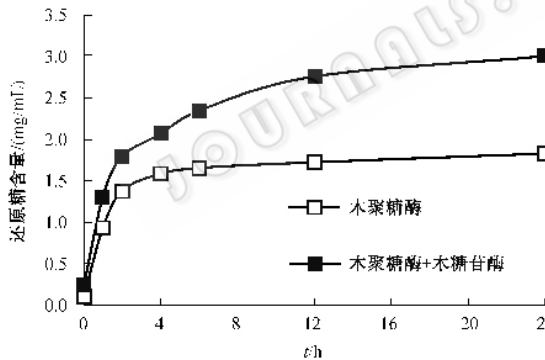


图5 不同培养时间的发酵液 SDS-PAGE 图

M 低分子量标准蛋白, 1~7 培养时间(d) 1~7 上样量为30 $\mu$ L 发酵液

## 2.4 水解产物分析

嗜热拟青霉J18产的木聚糖酶(0.5U/mL,电泳纯)和45%~60%硫酸铵沉淀的粗酶(含0.5U/mL木聚糖酶和0.025U/mL木糖苷酶)分别水解桦木木聚糖,两者的水解效果见图6。

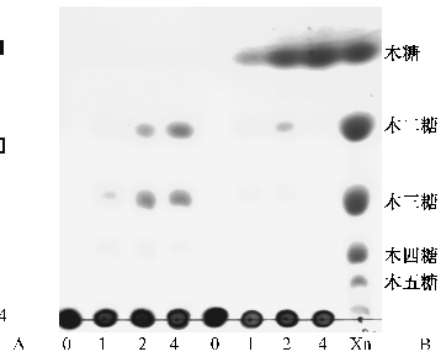


图6 桦木木聚糖经木聚糖酶和粗酶水解后的还原糖变化曲线(A)及所得产物的薄层层析图(B)

列Xn为木糖至木五糖标准,列0~4为反应时间(h)

随着时间的延长,水解液中总糖和还原糖含量都随之增加。在相同的水解时间内,木聚糖酶的水解液与粗酶的水解液的总糖含量基本相同(数据未列),说明桦木木聚糖的降解主要是由木聚糖酶引起的。但是,粗酶水解液中还原糖的含量高于木聚糖酶水解液(图6A),水解24h后,其水解液中还原糖的含量比木聚糖酶水解液的高出64%,说明木聚糖酶和木糖苷酶协同作用可以提高桦木木聚糖的水解效率。0h、1h、2h、4h水解样品的TLC(图6B)显示,嗜热拟青霉所产的木聚糖酶只能将桦木木聚糖

水解为木二糖和木三糖,而在木糖苷酶的协助下,可将桦木木聚糖彻底水解成木糖。Lenartovicz等<sup>[2]</sup>和Tunce等<sup>[11]</sup>分别水解纸浆和燕麦木聚糖时也发现,木聚糖酶和木糖苷酶共同作用可提高水解效率,释放出更多的木糖。

## 3 结论

嗜热拟青霉J18能够利用天然玉米芯和尿素高效产胞外 $\beta$ -木糖苷酶。通过发酵条件的优化,该菌产胞外 $\beta$ -木糖苷酶水平达到3.15U/mL,比酶活为

2.43U/mg,为国内迄今报道的最高值。该菌所产的木聚糖酶和  $\beta$ -木糖苷酶协同作用可提高桦木木聚糖水解液中还原糖的含量,并将桦木木聚糖彻底降解成单糖。可见,嗜热拟青霉 J18 在木聚糖的生物转化等方面有很大的应用前景。

### 参考文献

- [ 1 ] Polizeli M L T M , Rizzatti A C , Monti R , *et al.* Appl Microbiol Biotechnol 2005 **67** :577 ~ 591.
- [ 2 ] Lenartovicz V , de Souza C G M , Moreira F G , *et al.* Process Biochem 2003 **38** :1775 ~ 1780.
- [ 3 ] 郑 莉 ,杨金玲 ,朱 平 ,等. 浙江林业科技 2005 **25**( 1 ) :59 ~ 64.
- [ 4 ] Kiss T , Kiss L. World J Microbiol Biotechnol 2000 **16** :465 ~ 470.
- [ 5 ] Saha B C. Bioresour Technol 2003 **90** :33 ~ 38.
- [ 6 ] Almeida E M ,Polizeli M L T M , Terenzi H F , *et al.* FEMS Microbiol Lett ,1995 **130** :171 ~ 176.
- [ 7 ] Katapodis P ,Nerinckx W ,Claeyssens M ,*et al.* Process Biochem , 2006 ,in press.
- [ 8 ] 杨绍青 ,闫巧娟 ,江正强 ,等. 微生物学通报 2006 **33** :1 ~ 6.
- [ 9 ] Lacke A H. Methods Enzymol ,1988 **160** :679 ~ 684.
- [ 10 ] Li L T , Tian H M , Cheng Y Q , *et al.* Enzyme Microbiol Technol 2006 ,**38** :780 ~ 787.
- [ 11 ] Tunce M , Ball A S. J Appl Microbiol 2003 **94** :1030 ~ 1035.