

一株产木聚糖酶链霉菌的鉴定及发酵产酶*

李里特¹ 丁长河¹ 江正强^{1**} 石波²

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)¹

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)²

摘要:以木聚糖为唯一碳源,筛选出一株高产木聚糖酶生产菌株。该菌株经形态特征、培养特征、生理生化及细胞壁组分分析等实验,鉴定为卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus*)。摇瓶发酵产酶实验表明:培养基最佳初始pH值为6.0;玉米芯水不溶木聚糖和蛋白胨分别是最佳的碳源和氮源;添加0.5%吐温80使得木聚糖酶活力提高到原来的2.5倍,发酵液最高酶活达到623 u/mL。

关键词:链霉菌, 鉴定, 木聚糖酶, 发酵条件

中图分类号: Q93-939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0059-06

IDENTIFICATION OF A XYLANASE PRODUCING STRAIN OF *STREPTOMYCES* SP. AND OPTIMIZATION OF CONDITIONS ON ITS ENZYME PRODUCTION

LI Li-Te¹ DING Chang-He¹ JIANG Zheng-Qiang¹ SHI Bo²

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

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)²

Abstract: A xylanase producing strain was screened with xylan as the only carbon source. The strain was identified as *Streptomyces cirratus*. The effects of different factors on the enzyme production were studied. Corncoobs xylan (water insoluble) and tryptone were the best C and N sources, respectively. The enzyme activity was increased to about 2.5 times by addition of 0.5% Tween 80 in the medium. The highest xylanase activity was up to 623u/mL.

Key words: *Streptomyces cirratus*, Identification, Xylanase, Production

木聚糖作为自然界第二大可再生资源半纤维素的主要成分,其主链以由木糖残基以 β -1,4键连接而成。由于来源不同,木聚糖一般还含有少量其它种类的糖或其它基团形成的侧链或简单的交叉结构。木聚糖水解酶系包括一系列的木聚糖酶和木糖芽确定。其中 β -1,4-内切木聚糖酶(EC.3.2.1.8)能够以内切方式作用于木聚糖主链产生不同聚合度的木寡糖和少量木糖,是木聚糖降解酶中最关键的酶。木聚糖酶具有广阔的应用前景,如用于纸浆生物漂白、食品业的功能性低聚木糖制造、面团改良剂,还可用于饲料添加剂等^[1]。

在自然界中,很多微生物如细菌,真菌和放线菌都产生木聚糖酶^[2]。真菌来源的木聚糖酶因常含有较高的纤维素酶活力,应用范围受到限制。如纤维素酶活高,不适用于纸浆生物漂白和低聚木糖生产等。放线菌木聚糖酶纤维素酶活力较低,有较高的潜在工业应用价值^[3,4]。

国内有关研究主要集中在真菌所产木聚糖酶,杨瑞金等^[6]报道顶青霉产木聚糖酶酶活达到289.3 u/mL;陈红歌等^[7]曾报道黑曲霉产木聚糖酶酶活达到375.2 u/mL。国外已

* 国家“十五”科技攻关计划项目(No.2001BA708B04-06)

** 联系人 E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2003-01-20, 修回日期: 2003-03-30

经有大量有关放线菌生产的木聚糖酶的研究报道,其中大部分为链霉菌产的木聚糖酶^[2,5]。但国内尚未见到筛选产木聚糖酶链霉菌的报道。本研究筛选出一株产木聚糖酶活力较高的链霉菌菌株,对该菌进行了鉴定,并研究了该菌的发酵产酶条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

采样及筛选:从木糖醇厂玉米芯堆积物、啤酒厂糖化糟堆积处、原始森林、农家堆肥等处采集富含腐败木质纤维材料的土样若干,将土样经无菌生理盐水适当稀释后,涂布于平板筛选培养基,30℃培养3d,根据透明圈大小挑选菌株。再进行液体摇瓶发酵复筛

平板筛选培养基:玉米芯木聚糖 10g,酵母提取物(Oxiod) 2g,蛋白胨 2g,琼脂 15g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g,定容至 1L。

1.2 发酵产酶

1.2.1 菌种保藏斜面培养基:玉米芯木聚糖 10g,土豆 200g,琼脂 15g,定容至 1L。

1.2.2 培养基:玉米芯木聚糖 15g,酵母提取物(Oxiod) 3g,蛋白胨 10g, KH_2PO_4 10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Tween 80 5g,定容至 1L。

1.2.3 摇瓶培养条件:250 mL三角瓶装液量 50 mL,接入 0.5 cm^2 平板培养基上生长 5~6d 的孢子,旋转式摇床 140 r/min 32℃培养 7d, $5,000 \times g$ 离心 6 min,取上清液待用。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 培养特征:在高氏合成一号琼脂、无机盐淀粉琼脂、苹果酸钙琼脂、甘油硝酸盐琼脂、燕麦粉琼脂、营养琼脂、土豆浸汁琼脂和葡萄糖天门冬素琼脂 8 种培养基上 28℃培养 10~15d 后观察。

1.3.2 胞壁化学组分分析:按 Hasegawa^[8,9]改进的快速薄板层析法对菌株进行全细胞水解液氨基酸和糖型分析。

1.3.3 生理生化:参照文献[10]的内容对菌株进行生理生化鉴定。

1.4 酶活力测定方法

木聚糖酶活力的测定参照文献[11](DNS法)。以 1%桦木木聚糖(Sigma)溶液为底物(0.05 mol/L pH 5.3 柠檬酸钠缓冲液溶解)。酶液也用 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.3)适当稀释。0.9 mL 底物溶液加 0.1 mL 稀释过的酶溶液在 55℃反应 5 min,添加 1 mL DNS 试剂终止反应,沸水中煮沸 15 min 再加 1 mL 40% (m/v) 四水合酒石酸钾钠溶液,流动水冷却 15 min,540 nm 测吸光度。测定过程以木糖作标准。在以上条件下,每分钟产生相当于 $1 \mu\text{mol}$ 木糖的还原糖所需的酶量为一个酶活单位(u)。本文酶活力数据均为两次以上实验结果平均值。纤维素酶活力:方法同上,仅将底物和标准物分别换成低粘度羧甲基纤维素(Sigma)和葡萄糖。

1.5 酶解产物分析方法

酶解条件:2%桦木木聚糖(Sigma)或玉米芯木聚糖溶液(0.05 mol/L pH 5.3 柠檬酸钠缓冲液溶解)加入酶液使得酶活力达到 100 u/mL,55℃保温 12h,每 2h 震荡混匀 1 次。酶解产物分析方法:薄层层析法:参考文献[12]。低聚木糖标准由日本筑波大学日下部教授赠送。

1.6 其它化学试剂

玉米芯木聚糖、棉子壳木聚糖、甘蔗渣木聚糖等制造方法参考文献 [13], 大豆蛋白胨、牛肉蛋白胨购自北京双旋培养基制造厂, 其他试剂分析纯。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶产生菌的筛选

从木糖醇厂玉米芯堆积物、啤酒厂糖化糟堆积处、原始森林、农家堆肥等处采集富含腐败木质纤维材料的 80 个土样, 用木聚糖为唯一碳源的筛选平板分离, 分离得到 50 株在该平板上生长良好且透明圈较大的菌株。将以上初筛菌株进行摇瓶培养复筛, 2、4、6d 取样测酶活, 得到 4 株酶活超过 100 u/mL 的菌株, 其中以 D-10 菌株发酵液酶活最稳定。用该酶液水解桦木木聚糖和玉米芯木聚糖, 结果如图 1 所示。桦木木聚糖为底物的酶解产物以木二糖为主, 但还有一些聚合度大于 5 的多糖。玉米芯木聚糖为底物的酶解产物中以木二糖为主, 还有少量的木糖和极少量的木三糖、木四糖、木五糖等。

2.2 菌种的鉴定^[14]

2.2.1 形态特征: 在高氏合成一号琼脂和葡萄糖天门冬素琼脂上 28℃ 培养 7~12d 后, D-10 菌株基丝无横隔, 不断裂; 气丝分枝较多; 孢子丝圈卷, 并形成几圈螺旋形; 孢子椭圆形, 表面光滑 (见图 2、3)。

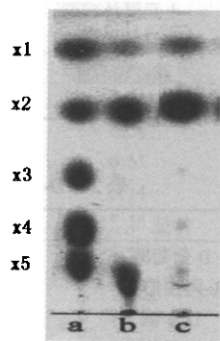


图 1 酶解木聚糖产物薄层层析色谱图 (TLC)

a 标准低聚糖 x1、x2、x3、x4、x5 分别为木糖、木二糖、木三糖、木四糖、木五糖, b 桦木木聚糖为底物, c 玉米芯木聚糖为底物

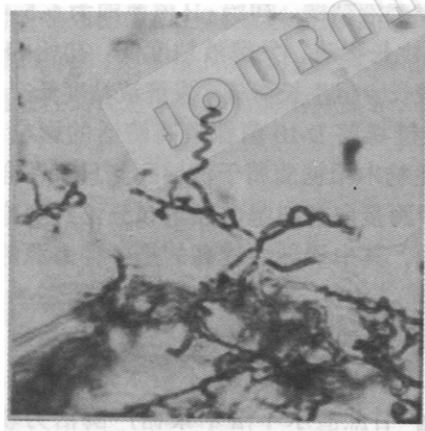


图 2 D-10 菌株的菌丝体形态 (×800)

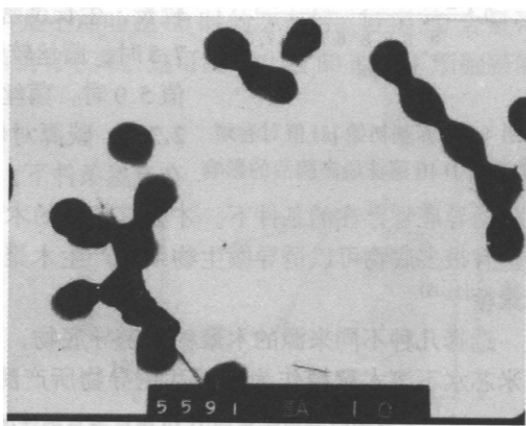


图 3 D-10 菌株的孢子扫描电镜图 (×10,000)

2.2.2 培养特征: 菌株在 8 种培养基上生长结果见表 1。

2.2.3 化学分类: 细胞壁化学组分分析显示, D-10 菌株含 LL-二氨基庚二酸 (LL-DAP, Diaminopimelic acid), 甘氨酸; 无特征性糖 (糖型 C)。细胞壁属于 I 型。

2.2.4 生理生化特征: 见表 2。

表1 D-10菌株在8种培养基的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶色素
高氏合成一号琼脂	淡灰色	淡黄	无
葡萄糖天门冬素琼脂	灰白色	浅黄	无
甘油硝酸盐琼脂	浅黄色	桔杆黄	无
无机盐淀粉琼脂	浅黄灰	褐黄	无
土豆浸汁琼脂	浅黄灰	污浅褐	无
苹果酸钙琼脂	污白色	无色	无
燕麦粉琼脂	浅黄灰	浅黄褐	无
营养琼脂	灰白色	浅黄	无

表2 D-10菌株的生理生化特征

特征	结果	特征	结果	特征	结果
D-葡萄糖	+	棉子糖	-	淀粉水解	+
L-阿拉伯糖	+	D-半乳糖	+	硝酸盐还原	+
D-木糖	+	D-麦芽糖	+	纤维素上生长	-
D-果糖	+	肌醇	-	H ₂ S产生	-
蔗糖	-	明胶液化	+	酪氨酸酶产生	-
L-鼠李糖	-	牛奶凝固	-	类黑色素产生	-
D-甘露糖	-	牛奶胨化	+		

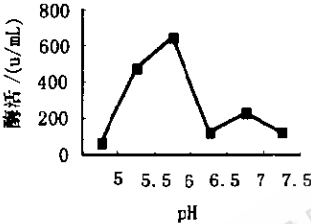


图4 培养基初始pH值对卷须链霉菌D-10菌株最高酶活的影响

对卷须链霉菌D-10菌株产酶活的影响很大。该菌株最适初始pH值为6.0。培养基的初始pH值影响了菌丝的生长,菌丝的生长状态又与菌丝产酶密切相关。在显微镜下也可以看出,初始pH值范围为5.5~6.0时,菌丝较长,生长茂密,发酵液粘稠。初始pH值范围为6.5~7.5时,菌丝较短,生长稀疏,发酵液粘度低。初始pH值5.0时,菌丝虽较长,但生长稀疏,发酵液粘度低。

2.3.2 碳源对卷须链霉菌D-10菌株最高酶活的影响:

在自然条件下,微生物木聚糖酶属于诱导酶。只有在合适的诱导底物存在的条件下,才会有较多的木聚糖酶蛋白在细胞内表达和分泌到细胞外。有很多底物可以诱导微生物细胞产生木聚糖酶,其中诱导性较高的是各种来源的木聚糖^[13,15]。

选择几种不同来源的木聚糖为诱导底物,产酶结果如表3。从表3结果可以看出,玉米芯水不溶木聚糖作为碳源和诱导物所产酶活力最高,棉子壳水不溶木聚糖次之。

表3 不同木聚糖对卷须链霉菌D-10菌株最高酶活的影响

木聚糖类型	木聚糖酶活(u/mL)	菌丝生长情况
桦木木聚糖(Sigma)	204	菌丝较长,茂密
桦木木聚糖(Sigma)	279	菌丝较长,茂密
棉子壳水不溶木聚糖	344	菌丝较长,茂密
棉子壳水溶木聚糖	274	菌丝较长,茂密
玉米芯水不溶木聚糖	516	菌丝较长,茂密
玉米芯水溶木聚糖	310	菌丝较长,茂密
甘蔗渣水不溶木聚糖	83	菌丝较短,稀疏

* 木聚糖含量1.5%,其它同上

2.2.5 菌种鉴定结果:根据形态特征与细胞壁化学组分定属的原则,D-10菌株基内菌丝无横隔、不断裂、不生子孢;气生菌丝体多分枝;孢子丝圈卷至螺旋形。细胞壁化学组分I型,糖型C,属于链霉菌属(*Streptomyces*)。根据培养特征和生化特征定种的原则,D-10菌株气生菌丝淡黄灰色、灰白色调,基内菌丝黄色调,属于金色类群[Aureus]。综合生理生化特征与卷须链霉菌十分相似,故D-10菌株可定名为卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus*)。

2.3 发酵产酶

2.3.1 产酶最适初始pH值的确定:以

0.1mol/L柠檬酸或氨水调节培养基的初始pH值,培养7d最高酶活如图4。从图4中可以看出,培养基的初始pH值

甘蔗渣水不溶木聚糖产酶活力较低,不适用于卷须链霉菌D-10菌株生产木聚糖酶。Sigma来源的桦木木聚糖和桦木木聚糖能使得该菌迅速生长,产酶却较低。虽然卷须链霉菌D-10菌株在玉米芯水溶木聚糖和棉子壳水溶木聚糖条件下生长也很好,但其酶活与各自的水不溶木聚糖相比较低。这可

能是因为水溶木聚糖作为碳源易溶于水，液体发酵时菌丝分解利用太容易，所以作为诱导物产酶就较低。而水不溶木聚糖大部分以颗粒形式悬浮在发酵液中，菌丝要充分分解和利用颗粒形式的木聚糖，就必须分泌更多的酶，因而其发酵过程产酶就较多。这和木聚糖酶的诱导机理相一致^[15]。

2.3.3 不同氮源对卷须链霉菌 D-10 菌株最高酶活的影响：从表 4 中可以看出，不同氮源对卷须链霉菌 D-10 菌株产酶影响很大。3 种蛋白胨为氮源时，所产木聚糖酶活力都很高，其中以 Tryptone 为氮源时最高；无机氮源产酶活力较低；尿素产酶活力居中。

表 4 不同氮源对卷须链霉菌 D-10 菌株最高酶活和发酵液终 pH 值的影响^{*}

氮源	木聚糖酶活 (u/mL)	发酵液终 pH 值
Tryptone (Oxiod)	623	7.14
大豆蛋白胨	605	6.54
牛肉蛋白胨	619	6.61
(NH ₄) CL	257	5.14
(NH ₄) ₂ SO ₄	264	5.15
尿素	349	8.73
柠檬酸二铵	281	5.04
NH ₄ NO ₃	50	5.47
Tryptone + (NH ₄) ₂ SO ₄ (各 0.5%)	162	5.85

^{*} 氮源含量 1.0%，初始 pH 值 6.0，玉米芯木聚糖为碳源，两次实验结果平均值。

这和发酵液终 pH 值相一致，有机氮源被分解利用可使发酵液 pH 升高，铵盐被分解利用则使发酵液 pH 下降。但两者同时加入 (Tryptone、(NH₄)₂SO₄ 各 0.5%) 时，虽然发酵液 pH 值可基本保持不变，但产酶活力却很低。

2.3.4 吐温 80 对卷须链霉菌 D-10 菌株最高酶活的影响：有文献报道^[16,17]，吐温 80 作为表面活性剂可以促进微生物木聚糖酶的产生。如图 5 所示，当吐温 80 含量为 0.5% 时，卷须链霉菌 D-10 菌株产酶活力最高，是不加吐温 80 时的 2.5 倍。吐温 80 含量再增加时到 1.0% 和 1.5% 时，最高酶活反而稍有下降。这可能是吐温 80 改变了细胞膜的通透性而促进了木聚糖酶的分泌^[5]。

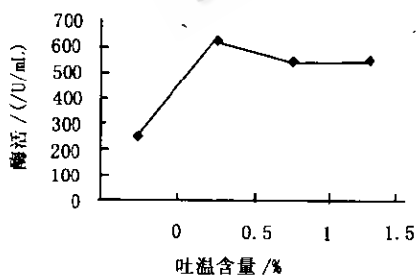


图 5 吐温 80 对卷须链霉菌 D-10 菌株最高产酶的影响

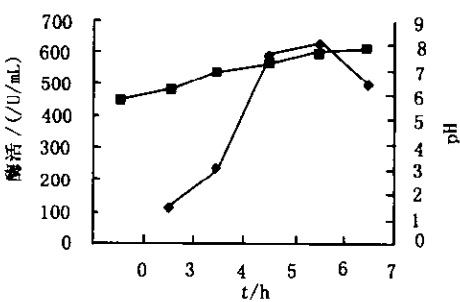


图 6 卷须链霉菌 D-10 菌株产酶曲线
—◆— 酶活，—■— pH 值

2.3.5 卷须链霉菌 D-10 菌株产酶曲线：图 6 是卷须链霉菌 D-10 菌株在摇床培养条件下的产酶曲线。在培养的前 3d，菌丝已基本完成生长，但酶活仍很低 (106 u/mL)。第 3d 开始迅速升高，第 6d 达到最大 (623 u/mL)，然后酶活开始下降。有此可以认为，卷须链霉菌 D-10 菌株的木聚糖酶产生是滞后于菌丝生长的。pH 值也随着发酵过程进行从 5.8 升高到 7.9。同时测定纤维素酶活，其数值都很低，最高 0.24 u/mL。

3 结语

从富含腐败木质纤维的土样中筛选出一株木聚糖酶产生菌,该菌株产酶活较高,酶解梓木木聚糖产物以木二糖为主,是理想的低聚木糖生产用菌株。依据形态特征与细胞壁化学组分分析,D-10菌株属于链霉菌;根据培养特征和生化特征结果,该菌株鉴定为卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus*)。国内尚未见到筛选链霉菌作为木聚糖酶产生菌的报道。摇床产酶实验显示,该菌株最适初始pH值为6.0,玉米芯水不溶木聚糖是最好的碳源和诱导物,蛋白胨为氮源产木聚糖酶活力最高。添加0.5%吐温80可以使木聚糖酶活力提高到原来的2.5倍。发酵液最高单位木聚糖酶酶活达到623 u/mL,是国内已报道的液体发酵最高木聚糖酶酶活^[6,7],具有较高的潜在工业应用价值。卷须链霉菌D-10菌株产生的木聚糖酶的纯化和酶性质有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wong K K Y, Tan L U L, Saddler J N. Microbiological Reviews, 1988, **52**: 305 ~ 317.
- [2] Sunna A, Antranikian G. Crit Rev Biotechnol, 1997, **17**: 39 ~ 67.
- [3] Kohli U, Nigam P, Singh D, et al. Enzyme Microb Technol, 2001, **28**: 606 ~ 610.
- [4] Kusakabe I, Kawaguchi M, Yasui T, et al. J Agr Chem Soc Japan, 1977, **51**: 429 ~ 437.
- [5] Bertrand J L, Morosoli R, Shareck F, et al. Biotechnol Bioeng, 1989, **33**: 791 ~ 794.
- [6] 杨瑞金, 许时婴, 王 璋. 工业微生物, 2001, **31** (1): 23 ~ 26.
- [7] 陈红歌, 朱 静, 梁改芹, 等. 微生物学报, 1999, **39**: 89 ~ 93.
- [8] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. J Gen Appl Microbiol, 1983, **29**: 319 ~ 322.
- [9] 王 平. 微生物学通报, 1986, **13**: 226 ~ 231.
- [10] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339^{AL}. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 4, pp. 2452 ~ 2492. Edited by Williams S T, Sharpe M E, Holt J G. Baltimore: Williams & Wilkins.
- [11] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J Biotechnol, 1992, **23**: 257 ~ 270.
- [12] Jiang Z Q, Kobayashi A, Ahsan M M, et al. J Biosci Bioeng, 2001, **92**: 423 ~ 428.
- [13] Kusakabe I, Yasui T, Kobayashi T. J Agr Chem Soc Japan, 1976, **50**: 199 ~ 208.
- [14] Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology Baltimore, Williams & Wilkins, c1984 ~ c1986.
- [15] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. FEMS Microbiology Reviews, 1999, **23**: 411 ~ 456.
- [16] Liu W, Zhu W, Lu Y, et al. Process Biochemistry, 1998, **33** (3): 331 ~ 336.
- [17] Goes A P. dissertation, 1999, McGill University