

常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌筛选 木聚糖酶高产菌株及其酶学性质研究

杨颖¹ 玉王宁¹ 金一¹ 刘伟娜¹ 王晓宇¹ 郑菲¹ 邢新会² 谢响明^{1*}

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院 北京 100083)

(2. 清华大学 化学工程系 北京 100084)

摘要:【目的】利用常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌, 筛选耐热耐碱木聚糖酶高产菌株, 并对其进行酶学性质分析, 确保其适用于生物制浆漂白工艺。【方法】采用刚果红平板水解圈法结合摇瓶发酵胞外酶测定法进行菌株筛选, 并通过 DNS 木聚糖酶活性测定等方法对来源于不同突变株的木聚糖酶进行酶学性质分析对比。【结果】筛选出遗传稳定性良好的两株木聚糖酶高产菌株 AT24 和 AT22-2, 以麦草浆为诱导底物的粗酶液中, 突变株 AT24 及 AT22-2 所产的木聚糖酶活性分别为 512.74、552.70 U/mL, 分别为原始菌株 *S. v* 的 16 和 17 倍的。来源于突变株 AT22-2 的木聚糖酶的最适反应 pH 为 9.5, 最适反应温度为 90 °C, 在 50 °C–90 °C 温度范围内具有良好的热稳定性, 在 100 °C 条件下处理 30 min 剩余酶活仍为 68%; 突变株 AT24 所产木聚糖酶的最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 10.0, 在 60 °C–80 °C 的高温环境下, 突变株 AT24 所产的木聚糖酶具有良好的热稳定性。【结论】突变株 AT22-2 所产具有耐碱耐高温性质的木聚糖酶, 在应用领域尤其在纸浆造纸行业具有较大的潜在应用价值。

关键词: 常压室温等离子体诱变, 木聚糖酶, 耐热耐碱, 绿色糖单孢菌, 酶学性质分析

基金项目: 北京林业大学青年科技启动基金项目(No. BLX006); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. TD2012-03); 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(No. 201103027)

*通讯作者: Tel: 86-10-62336074; 信箱: xxm1005@126.com

收稿日期: 2012-11-27; 接受日期: 2013-02-01

Screening of mutants of xylanase high-producing strain of *Saccharomonospora viridis* by atmospheric and room temperature plasmas and its enzyme characterization

YANG Ying¹ YU Wang-Ning¹ JIN-Yi¹ LIU Wei-Na¹ WANG Xiao-Yu¹
ZHENG Fei¹ XING Xin-Hui² XIE Xiang-Ming^{1*}

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)
(2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: [Objective] In order to obtain an industrial strain with higher xylanase production, the original strain of *Saccharomonospora viridis* was mutated by atmospheric and room temperature plasmas. [Methods] The methods used to screen the mutant strain with higher xylanase production included transparent loop diameter measurement of selective medium with 2% beech-wood xylan and shaking flask fermentation. [Results] It has been demonstrated that both mutants AT22-2 and AT24 maintain good genetic stability. The enzyme activity in the fermentation liquor of AT22-2 and AT24 at 7 d reached 552.70 U/mL and 512.74 U/mL, which were 17 and 16 times higher than that of the original strain, respectively. Furthermore, the optimum pH and temperature values for xylanase activity of AT22-2 were pH 9.5 and 90 °C, respectively, being stable within a temperature range of 50 °C–90 °C, and showing high thermostability at 100 °C for the duration of 30 min. In addition, for another mutant AT24, the optimum pH and temperature values for xylanase activity were pH 10.0 and 60 °C, with a stability within a temperature range of 60 °C–80 °C. [Conclusion] The xylanase with thermostability and alkali-tolerance of mutant AT22-2 is a potential candidate for future use in biotechnological applications particularly in the pulp and paper industry.

Keywords: Atmospheric and room temperature plasmas (ARTP), Xylanase, Thermostability and alkali-tolerance, *Saccharomonospora viridis*, Enzyme characterization

纤维素类物质是自然界中最为丰富的一种可再生资源，其中半纤维素约占总纤维素的15%–30%，其主要成分为木聚糖。木聚糖作为植物半纤维素的重要组分，是自然界中继纤维素之后蕴藏量第二丰富的可再生资源^[1-2]。木聚糖酶(EC3.2.1.8)是一类以内切方式降解木聚糖分子中 β -1,4-糖苷键的水解酶类^[3]，其中包括内切 β -木聚糖酶和外切 β -木聚糖酶，分别可以切割主

链内部的糖苷键或从非还原端逐一切割单糖最终将木聚糖水解，降解产物分别为低聚木糖或木糖。关于木聚糖酶的研究起始于20世纪60年代，现在已知能够产生木聚糖酶的菌种包括细菌、真菌等^[4]，不同来源的木聚糖酶其酶学性质也大不相同，可以应用于造纸工业、食品工业、饲料工业、制药工业等众多领域。

在生物制浆漂白领域，碱性木聚糖酶可以作

为生物漂白剂应用于造纸工业, 利用其对富含半纤维素的纸浆进行预处理, 可以减少传统漂白工艺中有害化学用品的用量, 降低排放负荷, 有利于环境保护, 而且可以提高纸浆的漂白度, 降低纸张的脆性, 使纸张不易返黄^[5]。为了适应生物漂白实际应用中的高温碱性环境条件, 开发新一代耐热耐碱性好的木聚糖酶制品是当前主要的研究趋势^[6]。总的来说, 真菌分泌的木聚糖酶通常伴随着纤维素酶的产生, 会导致纤维素的降解, 不利于制浆造纸; 而且其所产木聚糖酶多为酸性低温酶(pH 4.0–6.0, 55 °C), 制浆漂白时必须调节浆料 pH 值和温度, 给操作带来不便, 并导致成本的提高^[7]。

目前有报道指出放线菌某些属的菌株所分泌的胞外酶中含有耐碱性及热稳定性都较好的木聚糖酶, 而且几乎没有纤维素酶的伴随产生^[8–11], 但国内对于这方面的报道极为少见。本研究以绿色糖单孢菌(*Saccharomonospora viridis*)为实验材料, 该菌分泌的木聚糖酶最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 值为 7.0, 且无纤维素酶的伴随产生, 能够无需提纯而直接应用于工业纸浆漂白^[6], 但其酶活性相对偏低。在此基础上, 本研究利用常压室温等离子体对绿色糖单孢菌进行快速诱变, 旨在筛选得到一株遗传性质稳定的木聚糖酶高产菌, 且其分泌的木聚糖酶耐碱耐高温, 能够适应生物制浆漂白实际应用中的高温碱性环境条件, 使其与原始菌株相比具有更大优势及更为广泛的实际应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

绿色糖单孢菌 [*Saccharomonospora viridis* (Schuurmans et al) Nonmura&Ohara 4.1089]购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心; 榉木木聚糖(Beech xylan)购于德国 Sigma 公司。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 酵母粉 2, 酶水解酵素 2, NaCl 6, 葡萄糖 10; pH 7.8–8.0。固体培养基在种子培养基的基础上加 1.5% 琼脂粉。

筛选培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 酵母粉 2, 酶水解酪蛋白 2, NaCl 6, 木聚糖 2, 琼脂粉 1.5%, 刚果红(0.01 g/L) 0.5%; pH 7.8–8.0。

产孢培养基(g/L): 葡萄糖 5, 酶水解酪蛋白 0.25, 牛肉膏 3, 琼脂粉 1.5%; pH 7.8–8.0。

麦草浆发酵培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 酵母粉 2, 酶水解酵素 2, NaCl 6, 葡萄糖 10; 麦草浆 15; pH 7.8–8.0。

木聚糖发酵培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 酵母粉 2, 酶水解酵素 2, NaCl 6, 葡萄糖 10; 木聚糖 2; pH 7.8–8.0。

1.3 方法

1.3.1 孢子悬浮液的制备: 将绿色糖单孢菌的活化液吸取适量于产孢固体培养基上, 45 °C 培养 4–6 d。加入 3 mL 灭菌的种子培养液和 10–20 粒灭菌玻璃珠, 匀速轻摇将孢子带下, 吸取孢子悬液于 EP 管中。用血球计数板对孢子进行镜检计数, 并将孢子浓度调整到 10^6 – 10^7 个/mL。

1.3.2 ARTP 诱变方法: 利用清华大学化工系自主开发的常压室温等离子体育种机(ARTP)对绿色糖单孢菌的孢子悬浮液进行诱变。在一定的电源功率、工作气流量、等离子体发射源与样品之间距离的条件下, 诱变主要的可变操作参数是处理时间^[12]。本研究利用氦气作为工作气体, 为了寻找最佳的诱变条件, 首先需要得到致死率曲线。在表 1 所示的 ARTP 操作条件下, 处理时间从 60 s 开始依次增加到 420 s, 然后将处理的样品稀释涂平板, 利用 CFU 方法来计算致死率。

1.3.3 筛选方法: (1) 初筛。将经过 ARTP 育种机诱变后的孢子悬浮液, 稀释后涂布于种子固体培养基上, 在 45 °C 条件下培养, 待平板上出现明显

表1 ARTP 诱变条件
Table 1 Operating conditions using ARTP

参数 Parameters	操作条件 Operating condition
Power input (W)	115
Treatment distance (mm)	2
Gas flow rate (L/min)	10
Treatment time (s)	60, 120, 180, 240, 360, 420
Sample amount	10 μ L of spore suspension, 10 ⁷ spore/mL

菌落后,用打孔器(孔径 $D=5$ mm)将单一菌落(带有部分固体培养基)接于一个灭菌后的空培养皿中继续培养 2 d,再转接到含有刚果红的筛选平板上,继续培养。测定菌落周围透明圈直径(H)与菌落直径(D)之比,以 H/D 比值来衡量菌株产木聚糖酶的能力大小。然后挑选出比值最大菌落进行纯化并保存^[13]。(2)复筛。将初筛所得菌株于液体种子培养基中,45 °C、120 r/min 培养 3 d。将培养液接种于两种不同的发酵培养基中,接种量为0.5%。在45 °C条件下,120 r/min 培养 7 d,提取粗酶液,测酶活。

1.3.4 粗酶液提取: 发酵液于 10 000 \times g、4 °C 离心 15 min,上清液即为粗酶液。保存于 4 °C,待测酶活。

1.3.5 遗传稳定性分析: 为了分析突变株的遗传稳定性,在固体平板上进行 6 次传代培养,对每一代菌株发酵液的木聚糖酶活性进行分析。

1.3.6 增殖速率的测定: 活化液以 1:100 的接菌量接于 250 mL 的三角瓶中,在培养过程中,每 6 h 取样测定 OD_{600} 值。以同条件下未接种的培养液为空白对照,培养时间为横坐标,菌液的 OD_{600} 吸光度值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.7 酶活性测定: 采用 DNS 法对木聚糖酶活性进行测定^[14]。具体方法如下:木糖标准曲线的测定:用 pH 7.0 的 PBS 分别配制浓度 1 g/L 的木糖溶液;取 10 支带有刻度的 25 mL 试管,分别吸

入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 木糖溶液;加入 PBS 溶液,使每支试管的溶液体积为 1.5 mL;每支试管中加入 1.0 mL DNS 溶液,在沸水中反应 5 min,反应后迅速冷却至室温;向每支试管中加入 10 mL 蒸馏水,测 OD_{540} 吸光度值,制作木糖标准曲线(图 1),x 轴为木糖浓度,y 轴为 OD_{540} 。

根据标准曲线绘制结果线性回归后得到吸光度-木糖含量公式为: $y=0.982 1x+0.000 9$, $R^2=0.997 1$ 。

木聚糖酶活的测定^[15-17]:用磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的 1%木聚糖溶液作为木聚糖酶的反应底物。在试管中加入 0.5 mL 底物,0.1 mL 酶液和 0.9 mL 磷酸缓冲液,于 60 °C 下水浴 20 min,立即加入 1 mL DNS 试剂,在沸水中煮 5 min,冷却后加 10 mL 蒸馏水,混匀后在 540 nm 波长下测定其吸光度。每一个样品需做 3 个平行,参照木糖标准曲线求得木糖含量,计算酶活,零对照组不经过 60 °C 恒温水浴,先加入 DNS 溶液最后加入 0.1 mL 灭活酶液。酶活性单位定义:每分钟水解木聚糖生成 1 μ mol 还原糖所需要的酶量定义为木聚糖酶活力单位(U/mL)。

木聚糖酶酶活(U/mL)= $N \times C \times 12.5 \times 1 000 / M \times T \times V$

其中, N :稀释倍数; C :由标准曲线得到的木糖浓度;12.5:反应的总体积(mL); M :木糖的

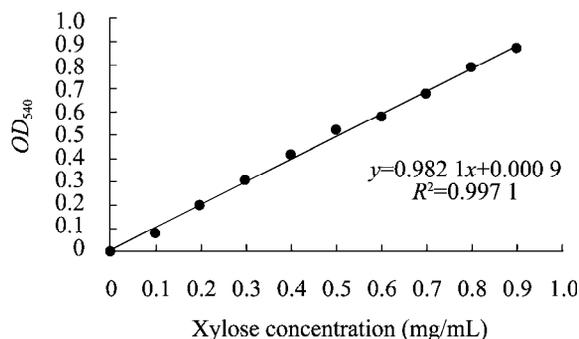


图1 木糖标准曲线

Fig. 1 Xylose standard curve

分子质量(150.13); T : 反应时间(min); V : 酶液体积(mL)。

蛋白含量测定: 参照 Bradford 法^[18]测定蛋白含量, 标准蛋白为牛血清蛋白(BSA)。

1.3.8 pH 对木聚糖酶活性的影响: 用不同 pH 值(4.0–11.0)的缓冲液进行酶活测定, 使酶反应在不同的 pH 值条件下进行, 测定木聚糖酶活力, 确定最适反应 pH。分别用 pH 4.0–11.0 的缓冲液适当稀释酶液, 4 °C 放置 36 h, 在最适反应条件下测定其相对酶活力, 以测定相应木聚糖酶的 pH 稳定性。

1.3.9 温度对木聚糖酶活性的影响: 分别在 40 °C–100 °C 温度条件下(间隔为 5 °C), 对粗酶液测定木聚糖酶活力, 确定最适反应温度。酶液分别在 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、100 °C 温度条件下保存 1 h, 并每隔 15 min 取样, 立即冰浴, 在最适条件下测定其残余酶活力, 以测定相应温度酶的稳定性。

1.3.10 不同金属离子对木聚糖酶活力的影响: 在适当稀释的酶液中分别加入浓度为 5 mmol/L 的 Na^+ 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} , 在最适反应温度下保温 60 min 测定其酶活力, 以未加任何金属离子的酶活力为 100%。

2 结果与分析

2.1 ARTP 诱变致死率曲线的测定

图 2 所示, 对绿色糖单孢菌的孢子诱变处理时间从 60 s 到 420 s, 随着时间的增加, 菌体的致死率不断上升。处理 60 s 杀死约 32% 的孢子; 处理 180 s 以后致死率达到了 96% 左右; 处理 420 s 致死率接近 100%。由于突变的发生具有随机性, 致死率和正突变之间的关系并不是十分清楚, 并且孢子悬浮液经诱变处理 180 s 后涂布于培养基上就可出现便于挑取的、分散的单菌落, 故选取

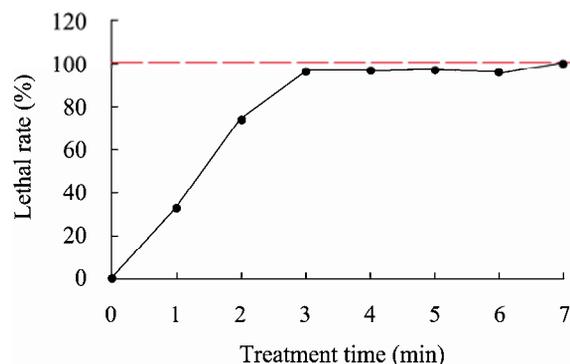


图 2 绿色糖单孢菌的致死率曲线

Fig. 2 Variation of the lethal rate of the *Saccharomonospora viridis* with the ARTP treatment time

处理时间为 180 s 的条件进行诱变。

2.2 筛选木聚糖酶高产突变株

刚果红能与筛选培养基中的木聚糖形成红色复合物, 当木聚糖被木聚糖酶分解后, 培养基中会出现以能够产生木聚糖酶的菌落为中心的透明圈, 通常木聚糖酶的产量决定了透明圈的直径, 产量越高的菌株周围产生的透明圈直径就越大。然而, 在本研究中发现, 一些能够产生较大透明圈的菌株在后续摇瓶发酵培养中可检测到的木聚糖酶产量并不高, 而一些透明圈并不明显的菌株经测定反而具有较高的木聚糖酶活性。故而透明圈筛选方法并不适用于此项研究中突变株的筛选, 最终我们选择摇瓶发酵胞外酶活性测定法作为筛选方法。

在摇瓶发酵的基础上, 本文共对 390 株诱变处理后的菌株进行研究。挑取筛选平板上的单菌落于两种不同的发酵培养基中, 按照 1.3.3 中的复筛条件发酵培养 7 d, 提取粗酶液。通过 DNS 法测定粗酶液中木聚糖酶的活性, 筛选得到了 AT24 和 AT22-2 两株木聚糖酶高产突变株。原始菌株绿色糖单孢菌 *S. v* 在以麦草浆为诱导底物的发酵培养基中可检测到的木聚糖酶酶活最高为 31.57 U/mL, 在以木聚糖为诱导底物的发酵培养基中木聚糖酶活最高为 39.83 U/mL。AT22-2 在以

麦草浆为诱导底物的发酵粗酶液中木聚糖酶活性最高为 552.70 U/mL, 当诱导底物为木聚糖时它所产木聚糖酶活性为 321.45 U/mL, 分别为原始菌株的 17 倍和 8 倍; 突变株 AT24 在以麦草浆为诱导底物的发酵粗酶液中木聚糖酶活性高达 512.74 U/mL, 是原始菌株的 16 倍, 但在以木聚糖为诱导底物时的发酵粗酶液中可检测到的木聚糖酶活性偏低且不稳定, 最高为 38.97 U/mL, 低于原始菌株产酶水平。

2.3 遗传稳定性分析

为了检测突变株的遗传稳定性, 对突变株 AT24 和 AT22-2 进行 6 代连续发酵培养, 并检测每一代发酵液的木聚糖酶活性。结果如图 3 所示, 经等离子体诱变的突变体 AT22-2 和 AT24 产生木聚糖酶具有较好的遗传稳定性, 均为产酶能力稳定的突变株。

2.4 增殖速率

图 4 给出了原始菌株 *S. v* 和突变株 AT22-2

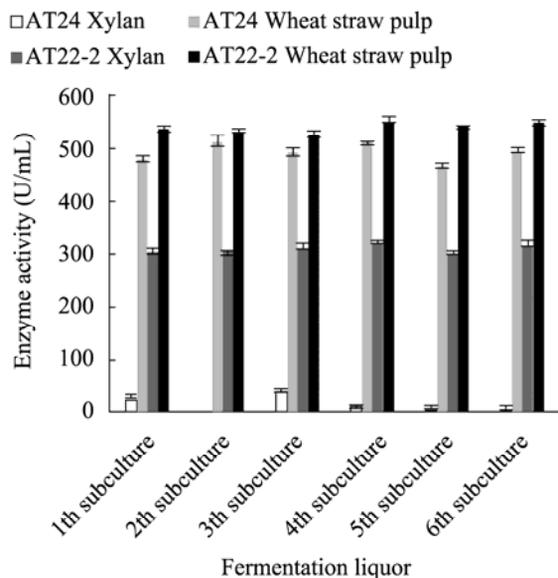


图 3 6 次传代培养的突变株 AT22-2 和 AT24 在两种不同发酵培养基中木聚糖酶活性

Fig. 3 The xylanase activity of the mutants AT22-2 and AT24 at six times subculture in two kinds of different fermentation mediums

和 AT24 在同样条件下培养不同时间段所测 OD_{600} 值。

从图 4 中可以看出经过等离子体诱变处理后筛选得到的突变株 AT22-2 和 AT24 的增殖速率并没有受到等离子体的影响, 与原始菌株几乎一致。

2.5 pH 对酶活的影响

不同 pH 对木聚糖酶活力的影响如图 5 所示, 突变株 AT22-2 在 pH 4.0–6.0 范围内, 相对酶活力逐渐增加, 酶活力变化较大, pH 范围 6.5–9.0, 酶活力相对稳定, 最适 pH 为 9.5, 当 pH 高于 9.5 时酶活开始缓慢降低, 当 pH 为 10.0 时, 剩余酶活为 75.59%, 明显高于酸性条件下的相对值。突变株 AT24 在 pH 范围在 4.0–6.0 内, 相对酶活逐渐增加, pH 范围在 6.5–9.5 范围内, 酶活力相对稳定, 最适酶活为 pH 10.0 处, 当 pH 为 10.5 时剩余酶活力为 83.94%。

突变株 AT24 及 AT22-2 发酵粗酶液分别用 pH 4.0–11.0 的缓冲液适当稀释, 4 °C 放置 36 h 后, 与未经处理的粗酶液酶活相对比(图 6), AT22-2 在 pH 为 11.0 时仍然能保持 >68% 的活性, AT24 在此时的剩余酶活 >73%; 与酸性条件相比碱性范围内突变株 AT22-2 和 AT24 的粗酶液中木聚糖酶的活性更高而且相对稳定。

此实验结果表明, 突变株 AT22-2 及 AT24 所

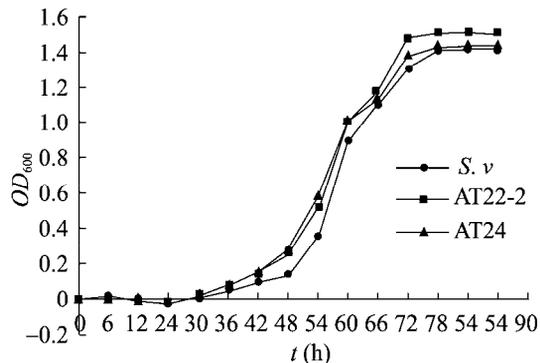


图 4 野生型菌株和突变株 AT24、AT22-2 的生长曲线
Fig. 4 The growth curves of AT24, AT22-2 and the original strain *S. v*

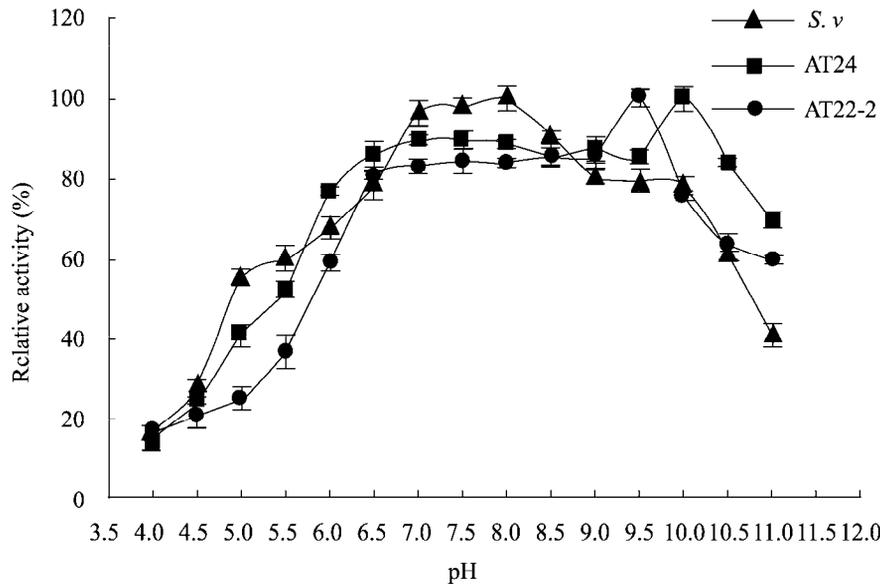


图5 木聚糖酶反应最适 pH 值

Fig. 5 The optimal reaction pH of xylanase

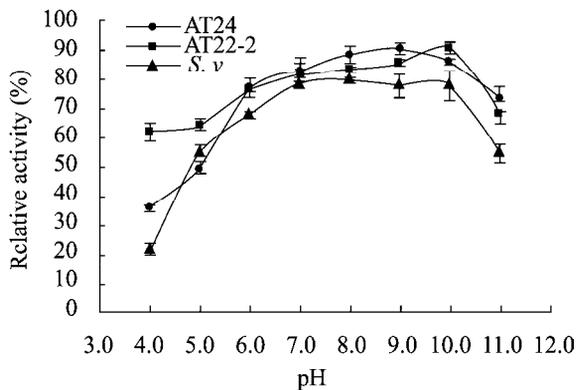


图6 木聚糖酶的 pH 稳定性分析

Fig. 6 pH stability of xylanase

分泌的木聚糖酶与原始菌株 *S. v* 相比具有良好的耐碱性, 符合工业纸浆生物漂白的碱性环境需要, 有一定应用潜能。

2.6 温度对酶活的影响

对原始菌株 *S. v*、突变株 AT22-2 和 AT24 在其相对应的最适反应 pH (pH 8.0、9.5、10.0) 条件下测量其最适反应温度(图 7), 发现原始菌株 *S. v* 和突变株 AT24 所产木聚糖酶的最适反应温度均为 60 °C, 但 AT24 所产木聚糖酶在 75 °C–95 °C 范围酶活力相对稳定, 大约保持在 40% 左右; 而

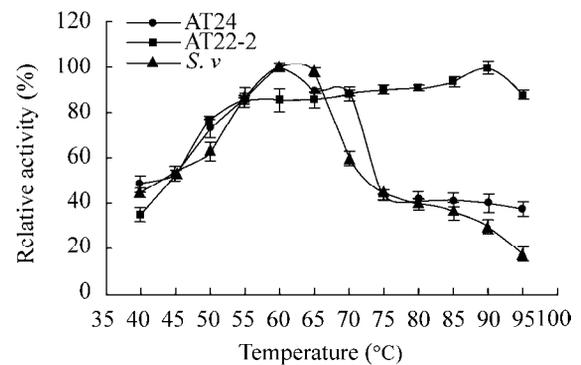


图7 木聚糖酶最适反应温度

Fig. 7 The optimal reaction temperature of xylanase

突变株 AT22-2 所产木聚糖酶在 55 °C–95 °C 范围内酶活力维持稳定, 在温度为 90 °C 时相对酶活力最高, 在 95 °C 时开始下滑, 但残余酶活力仍有 88%。

由图 8 可以看出, 突变株 AT24 在其最适反应温度(60 °C)条件下保温 60 min 后, 相对酶活力为 88%; 在 80 °C 保温 60 min 后仍具有 48% 的酶活; 而在 90 °C–100 °C 条件下处理 30 min 后, 酶活性下降较快。由此结果可知, 在 60 °C–80 °C 的高温环境下, 突变株 AT24 所产的木聚糖酶具有较好

的热稳定性,基本符合实际制浆漂白工艺环境的温度范围。

由图 9 可以看出,突变株 AT22-2 在 50 °C–90 °C 范围内处理 60 min, 剩余酶活基本保持在 80%以上,而在 100 °C 温度条件下,随着处理时间的增加,酶活性下降较快,但在处理时间为 30 min 时,相对酶活力仍为 68%。此结果说明,在 50 °C–90 °C 温度范围内,突变株 AT22-2 具有良好的热稳定性,在实际制浆漂白工艺的高温条件下仍以相对酶活高于 80%的能力发挥作用。

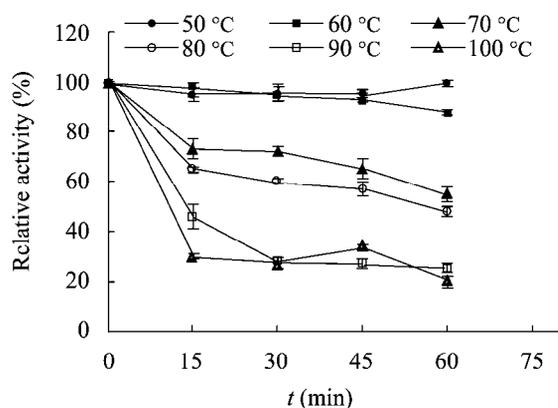


图 8 突变株 AT24 所产木聚糖酶的热稳定性分析
Fig. 8 Thermostability of the xylanase from mutant AT24

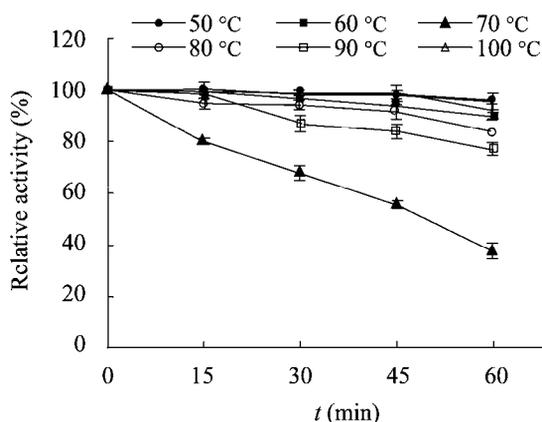


图 9 突变株 AT22-2 所产木聚糖酶的热稳定性分析
Fig. 9 Thermostability of the xylanase from mutant AT22-2

2.7 不同金属离子对木聚糖酶的活性影响

金属离子对突变株 AT24 和 AT22-2 来源的木聚糖酶活力的影响如表 2 所示。

从表 2 中可以看出,不同金属离子对来源于突变株 AT24 和 AT22-2 的木聚糖酶的作用效果及影响力的大小存在明显差异。 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 对来源于 AT24 的木聚糖酶具有激活作用,分别提高了 70.09%、44.65%、27.36%、42.25% 和 10.56%,但对来源于 AT22-2 的木聚糖酶却具有抑制作用。 Na^+ 对于来源于 AT22-2 的木聚糖酶具有激活作用,但对来源于 AT24 的木聚糖酶活性有抑制作用; Al^{3+} 对于来源于两种突变株的木聚糖酶均具有抑制作用,但抑制作用的大小不同,对于来源于 AT24 的木聚糖酶,酶活力降低了 50.41%,而对于来源于 AT22-2 的木聚糖酶,酶活只降低了 7.20%。

3 讨论

本研究利用常压室温等离子快速诱变绿色糖单孢菌,该方法的射流温度低、产生的等离子体

表 2 金属离子对酶活力的影响
Table 2 Effect of metal ions on xylanase activity

离子 Ions	相对酶活 Relative activity (%)	
	AT24	AT22-2
None	100	100
Mn^{2+}	170.09±2.9	75.52±1.2
Ba^{2+}	144.65±2.0	73.12±3.2
Fe^{3+}	79.36±3.2	79.84±3.6
Zn^{2+}	68.80±3.1	77.44±4.4
Mg^{2+}	127.36±2.7	66.87±3.9
Cu^{2+}	142.25±4.9	90.88±1.9
Co^{2+}	110.56±1.9	63.51±2.3
Na^+	77.44±1.9	104.32±4.1
Ca^{2+}	105.28±2.2	94.24±1.9
K^+	126.40±3.2	101.92±1.2
Al^{3+}	49.59±3.0	92.80±4.3

均匀、无需真空装置,与传统诱变方法相比具有操作简易、成本低、与生物大分子和细胞作用明显等优点,已成为快速突变微生物基因组的有效方法。陈红歌等(2004)^[19]利用紫外线对 *Aspergillus niger* M1 进行随机诱变,筛选得到一株木聚糖酶活力提高 30%的突变株 J506。Wu 等(2005)^[20]通过离子注入法对黑曲霉进行随机诱变,得到一株突变株 P602,它的木聚糖酶活性较原始菌株提高了 2 倍左右。等离子体对细菌细胞壁、细胞膜及蛋白质等都有显著地作用效果,能够使微生物细胞壁和细胞膜的结构及通透性改变,长时间处理会使细胞壁部分或者完全破裂,释放出细胞内蛋白,从而导致大部分微生物死亡。但部分经过等离子体照射的微生物会通过自身的修复系统修复存活,并在这一个过程中使微生物基因序列及其代谢网络显著变化,最终导致基因突变^[21-22]。前期的研究表明,ARTP 技术可以快速有效地突变细菌、微藻、真菌、酵母等微生物^[23-24]。本文通过摇瓶发酵胞外酶活性测定的方法筛选得到的两株木聚糖酶高产菌株 AT22-2 和 AT24,当诱导底物为麦草浆时它们产生的木聚糖酶活性分别是原始菌株的 17 倍和 16 倍;当底物为木聚糖时 AT22-2 产生的木聚糖酶活性较原始菌株提高了 8 倍,但 AT24 产生的木聚糖酶活性很低,甚至低于原始菌株。这可能是由于突变株 AT24 经过等离子体处理后其木聚糖酶基因或相应的调控基因序列发生了变化。在自然条件下,木聚糖酶大部分属于诱导酶,只有在合适的诱导物存在的条件下,微生物才会将较多的木聚糖酶蛋白分泌到细胞外,一般来讲木聚糖酶的诱导是复杂的,其诱导水平也因微生物的生理、生化特征不同而相差较大。

在纸浆蒸煮过程中,木聚糖部分溶解、变性并重新沉积在纤维表面上,致使纸浆可漂性较差,所得漂白浆白度不高并且白度稳定性也较

差。在纸浆漂白前使用碱性木聚糖酶,水解纤维表面部分沉积的木聚糖,这样增大了纸浆基质孔隙,使被困的可溶性木素释放出来,使漂白药品更直接的与木素反应而提高漂白效率^[25]。葛本灵(2010)^[26]研究报道了碱性木聚糖酶在硫酸盐竹浆漂白生产实践中的应用可以使漂白竹浆的质量上升一个等级,并提高漂白线的日生产量,同时漂白废水排放负荷降低。用于纸浆漂白的木聚糖酶必须具有耐碱耐高温特点。本研究筛选得到的两株突变株均具有良好的耐碱性,突变株 AT24 的木聚糖酶与原始菌株相比有较好耐高温性质,但与突变株 AT22-2 相比其热稳定性要差些。结果表明,突变株 AT22-2 与原始菌株和突变株 AT24 相比,具有良好的耐热耐碱性,在制浆造纸、纺织等行业具有很好的应用前景。此外,两株突变株产生的木聚糖酶在耐高温、耐碱性方面与原始菌株有大幅度提高,这可能是由于等离子体产生的活性粒子穿过细胞壁到达细胞内,打断基因、蛋白键等,导致染色体重复、易位、倒位或使 DNA 分子断裂、碱基缺失等多种生物学效应,在细胞自身修复过程中发生基因突变,最终导致蛋白质空间结构的变化,如热稳定结构域的变化、二硫键的增加或减少等。

不同金属离子对酶的活性有不同的作用,具体机制还有待进一步的研究。但可以推测那些对酶活性有明显促进作用的金属离子可能是由于它可与底物结合,使其在酶反应中正确定向,或者它也可以与酶蛋白结合使酶稳定于催化活性构象^[27],也可能是由于它可以影响酶与底物的结合和解离状态;而一些金属离子可形成金属离子螯合物阻碍酶反应过程中某些中间体的形成从而抑制酶的活性^[28]。Taibi 等(2012)^[29]从家禽堆肥中筛选到一株生产耐高温木聚糖酶的放线菌 Cpt20,在研究该酶性质时发现 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活性有促进作用, Mg^{2+} 对酶活有抑制作用;

Liu 等(2011)^[30]筛选到一株木聚糖酶高产菌株, Cu^{2+} 对其分泌的木聚糖酶活性有抑制作用, 但 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对其活性有不同程度的促进作用。这说明同一金属离子对不同来源的木聚糖酶有不同的作用。本研究中, 不同金属离子对来源于突变株 AT24 和 AT22-2 的木聚糖酶的作用效果及影响力的大小存在明显差异, 这可能也是由于木聚糖酶蛋白的空间结构发生变化而导致的。

本研究选择绿色糖单孢菌经过等离子体的轰击下发生随机突变后, 筛选出的两株木聚糖酶高产菌株在不同发酵培养基中产酶活性不同, 酶学性质也存在差异, 这为今后进一步在分子水平上研究木聚糖酶的耐热耐碱性机理提供了重要的分析数据。

参 考 文 献

- [1] 刘巍, 范树田, 李心治, 等. 地衣芽孢杆菌 H-1 的鉴定及其产木聚糖酶性质的研究[J]. 工业微生物, 1996, 269(4): 11-15.
- [2] 徐志兵, 张群, 夏万燕. 酶在纸浆漂白中的应用[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 54-56.
- [3] 曾宇成, 张树政. 海枣曲霉木聚糖酶的提纯和性质[J]. 微生物学报, 1987, 27(4): 34-349.
- [4] 包怡红, 刘伟丰, 毛爱军, 等. 耐碱性木聚糖酶高产菌株的筛选、产酶条件优化及其在麦草浆生物漂白中的应用[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 235-240.
- [5] 刘相梅, 祁蒙, 曲音波. 木聚糖酶基因克隆、表达与分泌及定点诱变研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 28-31.
- [6] 谢响明, 孙晓霞, 吴玉英, 等. 绿色糖单孢菌产木聚糖酶规律及其耐碱耐热性的初步研究[J]. 生命科学研究, 2005, 9(1): 55-59.
- [7] Máximo C, Ferreira MC, Duarte J. Some properties of eucalyptus kraft pulp treated with xylanase from *Aspergillus niger*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998, 14(3): 365-367.
- [8] Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, et al. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(7): 2311-2316.
- [9] Taberero C, Sanchez J, Perez P, et al. Cloning and DNA sequencing of *xyaA*, a gene encoding an endo- β -1,4-xylanase from an alkalophilic *Bacillus* strain(N137)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(6): 2420-2424.
- [10] Dey D, Hinge J, Shendye A, et al. Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(5): 436-442.
- [11] Christakopoulos P, Nerinckx W, Kekos D, et al. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 51(2): 181-189.
- [12] 金丽华, 方明月, 张翀, 等. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 461-467.
- [13] 张秋卓, 蔡伟民. 纤维素酶高产菌株的复合交替诱变选育[J]. 工业微生物, 2008, 38(6): 32-37.
- [14] 全桂静, 赵航. 半纤维素酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 沈阳化工学院学报, 2010, 24(1): 20-23, 57.
- [15] Lopez C, Blanco A, Javier pastor FI. Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*[J]. Biotechnology Letter, 1998, 20(3): 243-246.
- [16] Sunna A, Bergquist PL. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample[J]. Extremophiles, 2003, 7(1): 63-70.
- [17] Bataillon M, Nunes CP, Castillon N, et al. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000,

- 26(2/4): 187-192.
- [18] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 138-140.
- [19] 陈红歌, 刘新育, 张世敏, 等. 木聚糖酶高产菌株的诱变[J]. 微生物学通报, 2004, 31(6): 33-36.
- [20] Wu M, Li SC, Yao JM, et al. Mutant of a xylanase-producing strain of *Aspergillus niger* in solid state fermentation by low energy ion implantation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6/7): 1045-1049.
- [21] Pompl R, Jamitzky F, Shimizu T, et al. The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging[J]. New Journal of Physics, 2009, 11(11): 115023.
- [22] Morfill GE, Kong MG, Zimmermann JL. Focus on plasma medicine[J]. New Journal of Physics, 2009, 11(11): 115011.
- [23] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858.
- [24] Wang LY. Studies on the mechanisms and applications of the atmospheric room temperature plasmas acting on the microbes[D]. Beijing: Tsinghua University, 2010.
- [25] 张义生, 慈元钊. 碱性木聚糖酶在麦草浆漂白生产中的应用试验[J]. 湖北造纸, 2002(2): 8-9.
- [26] 葛本灵. 碱性木聚糖酶在硫酸盐竹浆漂白生产实践中的应用[J]. 华东纸业, 2010, 41(1): 34-37.
- [27] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2007: 81-91.
- [28] Ninawe S, Kuhad RC. Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(18): 2291-2295.
- [29] Taibi Z, Saoudi B, Boudelaa M, et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(3): 663-679.
- [30] Zhengchu L, Xiaoyang D, Juzuo Z, et al. Screening of a xylanase high-producing strain and its rapid separation and purification[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(4): 901-906.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。