

文章编号 :1009-038X(2001)06-0608-04

米曲霉 RIB128 耐酸性木聚糖酶的研究

陆 健¹, 曹 钰¹, 陈 坚¹, 若林三郎²

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036 ; 2. 日本国税厅酿造研究所酶工程研究室, 东广岛 739-0046)

摘 要 :通过 RBB—Xylan 筛选平板和固体培养方法获得了产木聚糖酶菌株米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB128. 在液体发酵时木聚糖是有效的诱导底物. 通过离子交换和凝胶过滤色谱纯化得到了一个耐酸性木聚糖酶(木聚糖酶 B). 它的相对分子质量为 65 000, 最适作用温度和 pH 分别为 55 ℃(pH 6.5), 它在 50 ℃时很稳定, 并且在 pH 2.0 时仍保留相当高的活性. 木聚糖酶 B 含有较多的天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸和丙氨酸.

关键词 :木聚糖酶 ; 米曲霉 ; 筛选 ; 纯化 ; 性质

中图分类号 :Q 556

文献标识码 :A

Study on An Acid-Stable Xylanase from *Aspergillus oryzae* RIB128

LU Jian¹, CAO Yu¹, CHEN Jian¹, SABURO Wakabayashi²

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China ; 2. Enzyme Engineering Division, National Research Institute of Brewing, Higashihiroshima 739-0046, Japan)

Abstract : *Aspergillus oryzae* RIB128 was isolated from *Aspergillus oryzae* strains as the xylanase producer by the methods of RBB-Xylan media and solid-state culture. Xylan from oat spelts is the effective inducing substrate for xylanase producing by submerged culture. An acid-stable xylanase (Xylanase B) was purified by ion exchange and gel filtration chromatographies. The molecular weight of xylanase B estimated by SDS-PAGE was 65 000. The optimum temperature of Xylanase B was 55 ℃. The optimum pH was pH 6.5. Xylanase B was more stable in acidic condition (pH 2.0) and contains large amounts of aspartic acid, serine, threonine, and alanine.

Key words : xylanase ; *Aspergillus oryzae* ; isolation ; purification ; property

木聚糖酶(endo-1,4-β-D-xylan xylanohydrolase EC3.2.1.8)由于其在造纸、食品和饲料等工业中潜在的应用前景而引起研究者越来越广泛的研究^[1]. 它在果汁、酒类、咖啡、香料和色素的生产等方面也有应用. 因此具有新性质的木聚糖酶产生菌仍在被研究. 丝状真菌由于分泌出胞外木聚糖酶且产酶水

平高于酵母和细菌而得到关注. 曲霉微生物产木聚糖酶已研究了多年^[2-6], 但是对于米曲霉木聚糖酶的性质还不太了解. 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)在日本传统发酵食品中应用历史悠久, 且已用于工业酶制剂的生产中. 作者从 316 株米曲霉中筛选产木聚糖酶活性高的菌株, 研究了酶的纯化及耐酸性木

收稿日期 2001-06-30 ; 修订日期 2001-09-10.

作者简介:陆健(1968-),男,江苏太仓人,发酵工程博士研究生,讲师.

万方数据

聚糖酶的性质,目的在于寻找出适合应用于酿酒行业的木聚糖酶,为今后通过蛋白质工程提高产酶水平作准备。

1 材料与方法

1.1 菌株

316株米曲霉菌株,日本国税厅酿造研究所保藏。

1.2 培养基

1.2.1 米曲霉培养基 土豆琼脂培养基(Difco)。

1.2.2 RBB-Xylan(Remazol Brilliant Blue R-D-Xylan Sigma公司)筛选平板培养基 0.67 g/dL 酵母氮基和 2 g/dL 琼脂于 121℃ 灭菌 10 min,同时将 0.2 g/dL RBB-Xylan 单独灭菌,然后混合溶解倾注平板。

1.2.3 液体发酵培养基 0.1 g/dL 蛋白胨, 0.5 g/dL 酵母膏 0.1 g/dL 硝酸钠 0.1 g/dL 磷酸氢二钾 0.05 g/dL 硫酸镁 0.001 g/dL 硫酸铁 0.3 g/dL 蔗糖 1 g/dL 木聚糖(from oat spelts Sigma公司) pH 6.0,接种量 1 g/dL,装液量 20 mL/dL,发酵温度为 30℃,150 r/min 培养 72 h。

1.3 方法

1.3.1 RBB-Xylan 平板筛选法 将 10 μ L 米曲霉孢子液接种到 RBB-Xylan 平板上,30℃ 培养 36 h,测量菌丝体生长直径及其周围出现的透明圈直径,选取菌丝体生长直径与其周围透明圈直径比值小的。

1.3.2 固体制曲培养 10 g α -米(已经浸泡,蒸煮过的米)放到 100 mL 三角瓶中,灭菌后接种 1.0 mL 米曲霉孢子液,加无菌水 4.0 mL,于 35℃,相对湿度 90%的条件下培养 36 h。

1.3.3 粗木聚糖酶的制备

1)从固体曲中提取木聚糖酶 在培养结束的固体曲中加入 0.1 mol/L pH 5.0 的含 0.5 g/dL NaCl 的醋酸盐缓冲液,于 4℃ 下静置过夜、8 000 r/min 离心 15 min,用 10 mmol/L pH 5.0 的醋酸盐缓冲液透析过夜。该部分粗木聚糖酶用于酶活性的测定。

2)从发酵液中提取木聚糖酶 将培养过的发酵液经 8 000 r/min 离心 30 min,经 0.45 μ m 的过滤膜过滤,Amicon YMI0 膜浓缩(Millipore 公司,美国),该粗酶用于酶的纯化。

1.3.4 木聚糖酶活性的测定方法 粗木聚糖酶采用 RBB-Xylan 方法测定^[5]以排除木糖苷酶的影响,

纯木聚糖酶活力测定方法如下:0.2 mL 适当稀释的酶液加入到在 40℃ 保温过的 0.5 mL 的 2 g/dL 木聚糖和 0.3 mL 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液,在 pH 4.5 的条件下,于 40℃ 反应 30 min,释放出的糖按照 Somogyi-Nelson 法测定^[7,8]。酶活单位定义:40℃ 条件下, pH 4.5 时每分钟产生 1 μ mol 产物(木糖)为 1 个活性单位(U)。

1.3.5 蛋白质的测定方法 采用 Bio-Rad 实验室试剂盒按照 Lowry 的方法测定蛋白质含量^[9],以牛血清蛋白为标准,在酶的纯化过程中测定 OD₂₈₀。

1.3.6 SDS-PAGE 电泳 按照 Laemmli 方法进行。采用第一化学公司(日本)的聚丙烯酰胺凝胶,考马斯蓝染色。

1.3.7 木聚糖酶的纯化 各环节均在 4℃ 进行。将经过浓缩的粗木聚糖酶进入凝胶过滤柱(TSK G2000SW 21.5 mm×600 mm, Tosoh 公司,日本),用含有 0.2 mol/L NaCl 的 pH 5.0 40 mmol/L 醋酸盐缓冲液洗脱,收集有活性部分,再进行 10K 膜浓缩(Pall Filtron 公司,日本),然后进入阴离子柱(Poros HQ/M 4.6 mm×100 mm,日本)。离子交换柱用 40 mmol/L pH 5.0 的醋酸盐缓冲液平衡,然后再用含 NaCl 的同种缓冲液洗脱。将得到的各活性组分分别收集,浓缩,再次进入 TSK G2000SW 凝胶柱。

1.3.8 木聚糖酶相对分子质量的测定 用 Pharmacia AB 公司(美国)的相对分子质量测定标准蛋白作为标准,通过 SDS-PAGE 测定纯化后的木聚糖酶相对分子质量。

1.3.9 氨基酸组成的测定 纯化后的酶在 105℃ 用 6 mol/L 盐酸水解 2 h,用自动氨基酸分析仪(L-8500A,日立公司,日本)分析。

2 结果与讨论

2.1 产木聚糖酶米曲霉菌株的获得

通过 RBB—Xylan 平板筛选后获得 9 株米曲霉,这些菌株在 RBB—Xylan 平板上培养 36 h 后都有不同程度大小的透明圈形成,而且其菌落直径与透明圈直径比值是较小的,结果见表 1。将这些菌株进行固体培养,提取其产生的木聚糖酶,经过测定酶活性后发现米曲霉 RIB128(*Aspergillus oryzae* RIB128)产酶活性高于其它的菌株,达到 5.17 U/g 曲,从而确定以该菌株为研究对象进行木聚糖酶发酵工艺和纯化的研究。作者对 *Aspergillus oryzae* RIB128 进行液体发酵并且纯化其中耐酸性木聚糖

酶.

表 1 RBB—Xylan 平板和固体培养产木聚糖酶的主要结果

Tab.1 Main results of xylanase production by the methods of RBB-Xylan media and solid-state culture

米曲霉菌株	木聚糖酶 相对活力/%	菌落直径与透明圈 直径比值
<i>A. oryzae</i> RIB128	100	0.49
<i>A. oryzae</i> RIB813	93.1	0.51
<i>A. oryzae</i> RIB163	92.5	0.52
<i>A. oryzae</i> RIB422	89.9	0.55
<i>A. oryzae</i> RIB 23	86.6	0.58
<i>A. oryzae</i> RIB151	83.0	0.59
<i>A. oryzae</i> RIB210	81.2	0.60
<i>A. oryzae</i> RIB331	78.2	0.63
<i>A. oryzae</i> RIB215	74.5	0.66

2.2 发酵条件的确定

通过对各发酵因素的研究,最后确定了发酵的起始 pH 6.0,装液量 20 mL/dL,接种量 1 mL/dL,发酵条件为 30 ℃,150 r/min,培养 72 h,产酶达到 2.07 U/mL,酶活提高了 11 倍.在发酵过程中合适底物的选择影响到产酶活性的高低^[1].通过对不同底物的研究,发现以木聚糖为诱导底物时,发酵获得的酶活最高.结果见表 2.

表 2 碳源对产木聚糖酶的影响

Tab.2 Effects of carbon sources on the production of xylanases

底物	用量/(g/dL)	相对酶活/%
木聚糖	1.0	100
木糖	1.0	0.6
木聚糖+木糖	各 1.0	65.7
淀粉	1.0	0.5
蔗糖	1.0	0
米糠	0.5	2.3

2.3 木聚糖酶的纯化

在经过 TSK G2000SW 凝胶柱后获得了 4 个有酶活的部分(第Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ和Ⅳ部分).第Ⅱ部分再进入阴离子交换柱(Poros HQ/M),HQ/M 柱用 pH 5.0 40 mmol/L 醋酸盐缓冲液平衡并用含 0~0.3 mol/L NaCl 的相同缓冲液连续梯度洗脱,又得到 4 个活性部分(第Ⅱ-I,Ⅱ-II,Ⅱ-Ⅲ和Ⅱ-Ⅳ部分).通过研究发现以上各活性部分中,第Ⅱ-I 部分有比较好的耐酸稳定性.因此首先纯化该耐酸性木聚糖酶.将第Ⅱ-I 部分再经过 TSK G2000 SW 凝胶柱后得到单一活性峰Ⅱ-I-I,在 SDS-PAGE 上显示出单一蛋白条带(见图 1),它被命名为木聚糖酶 B.

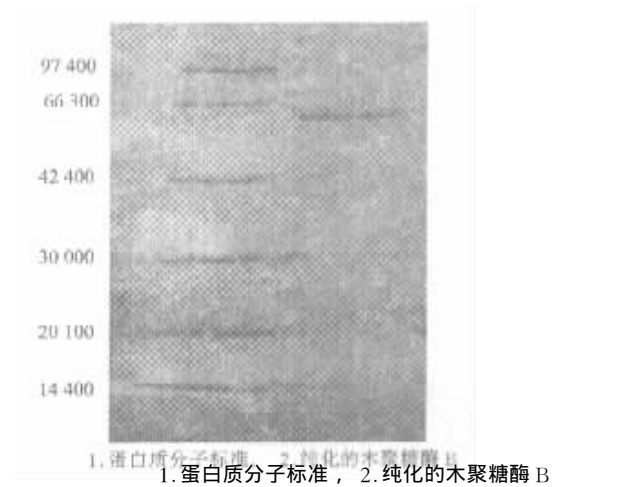


图 1 木聚糖酶 B 的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of Xylanase B

2.4 木聚糖酶的性质

表 3 列出了纯化后的木聚糖酶 B 的氨基酸组成,其中天冬氨酸,丙氨酸,丝氨酸和苏氨酸的含量较高,这和以往的有关曲霉木聚糖酶氨基酸组成的报导一致^[2,5].木聚糖酶 B 的一些基本性质见表 4,它的相对分子质量为 65 000,最适作用温度和 pH 分别为 55 ℃和 pH 6.5.木聚糖酶 B 在 50 ℃时仍很稳定,在 pH 2.0 时也保留有相当高的活性,是耐酸性的.表 5 表明木聚糖酶 B 受到铁离子和铜离子稍许的激活作用,锰离子对木聚糖酶 B 有抑制作用.表 6 说明木聚糖酶 B 对木聚糖有专一水解特性.在有较高酒精含量时(20 mL/dL),木聚糖酶 B 还能保留有较高的活性(见表 7),表明该酶是耐酸性和耐酒精的木聚糖酶.

表 3 木聚糖酶 B 的氨基酸组成

Tab.3 Amino acid composition of xylanase B

氨基酸	木聚糖酶 B 的摩尔分数/%	氨基酸	木聚糖酶 B 的摩尔分数/%
天冬氨酸	10.0	异亮氨酸	3.7
苏氨酸	10.9	亮氨酸	4.7
丝氨酸	14.9	酪氨酸	3.4
谷氨酸	8.3	苯丙氨酸	2.8
甘氨酸	9.0	赖氨酸	3.4
丙氨酸	11.4	组氨酸	1.1
半胱氨酸	0.5	精氨酸	3.9
缬氨酸	6.5	脯氨酸	4.8
蛋氨酸	0.7		

表 4 木聚糖酶 B 的基本性质

Tab.4 General properties of xylanase B

性质	木聚糖酶 B
相对分子质量	65 000
最适作用温度/℃	55

续表 4

性质	木聚糖酶 B
最适作用 pH	6.5
热稳定性/℃	<50
pH 稳定性	2.0~8.0

表 5 金属离子(2.0 mmol/L)对木聚糖酶 B 活性的影响
Tab.5 Effects of metal ions (2.0 mmol/L) on xylanase B activity

离子	木聚糖酶 B 相对酶活/ %
对照	100.0
镁	99.0
铁	114.3
钙	99.5
铜	109.5
锰	68.3
锌	99.3
钾	99.4
钠	96.8

3 结 论

通过结合 RBB-Xylan 筛选平板和固体培养方法获得了一株产木聚糖酶活性较高的米曲霉菌株(米曲霉 RIB128). 通过离子交换和凝胶过滤色谱纯

表 6 木聚糖酶 B 的底物特异性
Tab.6 Xylanase B substrate specificity

底物	木聚糖酶 B 相对酶活/ %
木聚糖	100.0
木二糖	0
木三糖	0
CMC	0
纤维二糖	0
麦糠	0

表 7 酒精对木聚糖酶 B 的影响
Tab.7 Effects of ethanol on xylanase B activity

酒精体积分数/ %	木聚糖酶 B 相对酶活/ %
0	100.0
10	98.6
14	97.2
16	88.7
18	87.4
20	87.3
30	82.5

化得到了耐酸性木聚糖酶 B ,并对它的基本性质进行了研究. 木聚糖酶 B 在 pH 2.0 时仍保留相当高的活性 ,并且对酒精有较好的耐受性 ,是酿酒过程中有潜在用途的木聚糖酶.

参考文献：

[1] KULKARNI N ,SHENDYE A ,RAO M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. **FEMS Microbiol Rev** , 1999 , 23 : 411~456.

[2] GORBASCHEVA I V , RODIONOVA N A. Studies on xylan degrading enzymes[J]. **Biochim Biophys Acta** , 1977 , 484 : 79~93.

[3] FREDERICK M M , CHIH-HEN K , FREDERICK J R , *et al.* Purification and characterization of endo-xylanase from *Aspergillus niger*[J]. **Biotechnol and Bioeng** , 1985 , 27 : 525~532.

[4] BISWAS S R , JANA S C , MISHRA A K , *et al.* Production , purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*[J]. **Biotechnol and Bioeng** , 1990 , 35 : 244~251.

[5] ITO K , OGASAWARA H , SUGIMOTO T , *et al.* Purification and properties of acid stable xylanase from *Aspergillus kawachii* [J]. **Biosci Biotech Biochem** , 1992 , 56 : 547~550.

[6] RAJ K C , CHANDRA T S. Purification and characterization of xylanases from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri*[J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1996 , 145 : 457~461.

[7] SOMOGYI M. Notes on sugar determination[J]. **J Biol Chem** , 1952 , 195 : 19~23.

[8] NELSON N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucos[J]. **J Biol Chem** , 1944 , 153 : 375~380.

[9] LOWRY O H , ROSEBROUGH N J , FARR A L , *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagen[J]. **J Biol Chem** , 1951 , 193 : 265~275.