

文章编号 :1009-038X(2003)05-0038-04

# 黑曲霉产木聚糖酶的特性

张年凤, 赵允麟

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**研究了木聚糖酶产生菌黑曲霉(*A. niger*)238 的产酶特性和麸曲的浸提条件,并对其浸提酶液进行浓缩.结果表明,菌株黑曲霉(*A. niger*)238 产木聚糖酶受诱导物的影响,发酵时间在 68~72 h 期间达到产酶高峰,酶活力为 286 U/mL.最佳氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,装料量为每瓶 10 g,接种量为每瓶 0.3 mL.其发酵麸曲用固液比为 1:5 的 2 g/dL  $\text{CaCl}_2$  溶液,30 ℃ 浸提 1.5 h;浸提液采用 25 ℃,40 kPa,冷却水温度 18 ℃ 条件超滤浓缩可获得 90% 以上回收率.

**关键词:**黑曲霉;木聚糖酶;提取

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

## Studies on the Xylanase Producer *Aspergillus niger*

ZHANG Nian-feng, ZHAO Yun-lin

(School of Biotechnology, Southern Yangtze university, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The enzyme productions from *Aspergillus niger* strain An-238 and the extracting conditions were studied. The extracted enzyme liquid was concentrated in order to form the enzyme powder. The results showed that the enzyme production was effected by several inducers. The activity reached the highest level of 286 U/mL at 68~72 h when fermentation was carried out at 30 ℃. The best nitrogen source, and the optimum amounts of medium and inoculum were  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g/bottle and 0.3 mL, respectively. A higher enzyme activity was obtained when extracting the fermented cells with 5 times of 2 g/dL  $\text{CaCl}_2$  solution at 30 ℃ for 1.5 h. By concentrating the extracted liquid at 25 ℃ (cooling water temperature 18 ℃) and 40 kPa, the yield of xylanase could be more than 90%.

**Key words:** *Aspergillus niger*; Xylanase; extract

木聚糖酶(1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase, EC. 3.2.1.8)以内切方式水解木聚糖分子中的  $\beta$ -1,4-木糖苷键,其水解产物主要是木二糖和木寡糖,也有少量木糖和阿拉伯糖.该酶具有广泛的应用前景,可用于纸浆生物漂白,减少环境污染,还可加入饲料中,改善其营养价值.近几年有报道<sup>[1]</sup>,木聚糖酶可作为很好的面包改良剂,某种特殊的木聚糖酶能降解不可溶性戊聚糖,而对面包有积极影响的可

溶性戊聚糖几乎不起作用.

国外已有不少研究者对黑曲霉、木霉(*Trichoderma sp.*)等真菌及短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)等细菌的木聚糖酶进行了研究,国内也有这方面的研究报道<sup>[2]</sup>.作者以木聚糖酶作为面包改良剂,对菌株黑曲霉(*A. niger*)238 的产酶特性,固体鲜曲浸提条件进行了研究.

收稿日期 2002-11-20; 修回日期 2002-12-30.

作者简介:张年凤(1977-),女,江苏兴化人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 发酵培养基 麦麸 8 g,豆饼粉 2 g,葡萄糖 0.2 g,水 10 mL;自然 pH,压力 0.1 MPa 20 min.

1.1.2 菌种 黑曲霉(*A. niger*)238:由作者所在实验室经紫外线、甲基磺酸乙酯复合诱变而得.

1.1.3 诱导物 玉米芯粉:自制;木聚糖:Sigma 公司产品;甘蔗渣粉:自制.

### 1.2 实验方法

1.2.1 酶液制备 发酵好的麸曲以  $m(g):V(mL) = 1:5$  的固液比加入 2 g/dL 的  $CaCl_2$  溶液,于 30 °C、120 r/min 条件下浸提 1.5 h,用三层纱布过滤即得酶液.

1.2.2 分析方法 Bailey 法:麸曲经浸提过滤所得的酶液适当稀释后,取 1 mL 酶液加入 1 mL 10 g/dL 的木聚糖溶液,于 50 °C 水浴反应 30 min.用 DNS 3 mL 显色,在 550 nm 处测定 A 值,绘制木糖标准曲线.一个酶活力单位(U)为每毫升浸提液每分钟作用底物生成 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量(U/mL).实验结果均为 3 次平行试验结果的平均值<sup>[3]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 黑曲霉(*A. niger*)238 菌株发酵试验

2.1.1 诱导试验 木聚糖酶属于诱导酶,底物中诱导物(木聚糖)是木聚糖酶菌株产木聚糖酶的条件,或者说是促进木聚糖酶产生的因素.选用富含木聚糖的诱导物做试验,以不加诱导物为空白(各种诱导物在培养基中的质量分数均为 2%),试验结果见表 1.

表 1 诱导物对黑曲霉(*A. niger*)238 产酶的影响

Tab.1 Effect of inducers on xylanase production by strain *A. niger* 238

质量分数为 2% 的诱导物	酶活力/(U/mL)
空白	170
玉米芯粉	230
木聚糖	432
甘蔗渣粉	185

从表 1 结果看出:诱导物对黑曲霉(*A. niger*)238 麦麸固体培养产木聚糖酶有明显的促进作用,这与文献[4]试验结果相同.由于木聚糖系纯试剂,价格较高,因此以下试验均用自制的玉米芯粉作为诱导物. 万方数据

2.1.2 菌株黑曲霉(*A. niger*)238 产酶进程 三角瓶培养过程中,菌株生长情况与酶活关系,结果见表 2 和图 1.

表 2 不同培养时间酶活力和菌株生长情况

Tab.2 The effect of culture time on xylanase production and the strain growth

培养时间/h	酶活力/(U/mL)	菌株生长情况
38	69	有大量白色分生孢子头
44	198	少量孢子头变黑
50	226	孢子头全部变黑
56	243	孢子头全部变黑
62	275	大量黑色孢子头
68	286	大量黑色孢子头
72	286	大量黑色孢子头
76	264	大量黑色孢子头
80	232	大量黑色孢子头

由图 1 可以看出:在三角瓶中,麸皮固体培养产酶高峰在 68~72 h,超过 72 h 产木聚糖酶活力下降.从菌株的生长情况来看,木聚糖酶大量产生的时间是在菌的成熟时期,因此可以认为该菌株主要在菌的成熟期以后大量产生木聚糖酶.

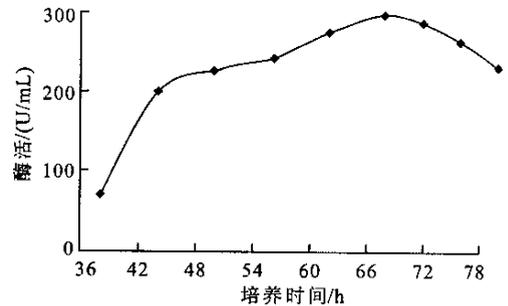


图 1 黑曲霉(*A. niger*)238 产酶进程曲线

Fig.1 Time course of xylanase production from strain *A. niger* 238

2.1.3 不同氮源和最适氮添加量试验 在麸皮发酵培养基中分别添加质量分数均为 2% 的  $(NH_4)_2SO_4$ 、玉米浆、尿素、酵母膏,后接种在 30 °C 培养 72 h,测定酶活力,结果见表 3.

表 3 氮源对菌株黑曲霉(*A. niger*)238 产木聚糖酶的影响  
Tab.3 The effect of nitrogen source on xylanase production by strain *A. niger* 238

质量分数为 2% 的氮源	酶活力/(U/mL)
$(NH_4)_2SO_4$	265
玉米浆	121
尿素	232
酵母膏	150

试验结果表明,黑曲霉(*A. niger*)238 麦麸固体培养添加无机氮源较有机氮源能提高酶活.其中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  不同添加量对酶活的影响结果见表 4.

表 4  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加量对酶活的影响

Tab.4 The effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  contents on xylanase production

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数/%	酶活力/(U/mL)
2	264
4	236
6	235

表 4 结果表明  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  最适添加质量分数为 2%.

2.1.4 装料量对产酶的影响 在 500 mL 三角瓶中,装有不同量的培养基.结果(见表 5)表明:装料量越多,黑曲霉(*A. niger*)238 产木聚糖酶能力越弱.这是因为装料多,料面厚不利于通气,因此影响产酶.例如在大三角瓶中培养比在小三角瓶中培养的酶活力高.

表 5 装料量对黑曲霉(*A. niger*)238 产酶的影响

Tab.5 The effect of medium amount on xylanase production by strain *A. niger* 238

装料量/g	酶活力/(U/mL)
10	280
15	268
20	202
25	165
30	161

2.1.5 接种量对产酶的影响 接种量以 0.3 mL 孢子悬液( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ )接种较为合适.接种量过低会使其生长缓慢,发酵周期延长,而过高的接种量则会造成菌种生长迅速,曲温升高,不利于产酶,结果见表 6.

表 6 接种量对黑曲霉(*A. niger*)238 产酶的影响

Tab.6 The effect of inoculum amount on xylanase production by strain *A. niger* 238

接种量/mL	酶活力/(U/mL)
0.1	143
0.2	178
0.3	230
0.4	186
0.5	170
0.6	169
万方数据	127

## 2.2 木聚糖酶提取条件的试验

2.2.1 浸提条件 浸提溶剂的选择是向发酵好的麸曲分别用固液比  $m(\text{g}):V(\text{mL})$  为 1:5 的  $\text{CaCl}_2$  (2 g/dL) 溶液、 $\text{NaCl}$  (2 g/dL) 溶液、自来水,在往复摇床上于 30 °C,120 r/min 条件下振荡 1.5 h,取滤液测定酶活,结果见表 7.由表 7 可知:用无机盐溶液浸提比用纯自来水浸提效果要好,这是由于无机盐对酶起到稳定作用.

表 7 不同提取剂对酶活的影响

Tab.7 The effect of different extractants on the activity of xylanase

提取剂	酶活力/(U/mL)
2 g/dL 的 $\text{CaCl}_2$	290
2 g/dL 的 $\text{NaCl}$	262
自来水	220

向发酵好的麸曲加入 2 g/dL  $\text{CaCl}_2$  溶液,分别于 30 °C、40 °C、50 °C 下浸提 1.5 h,结果见表 8.浸提温度的选择选用 30 °C 浸提比较经济.

表 8 浸提温度对酶活的影响

Tab.8 The effect of extracting temperature on the activity of xylanase

浸提温度/°C	酶活力/(U/mL)
30	286
40	279
50	126

向发酵好的麸曲加入固液比  $m(\text{g}):V(\text{mL})$  为 1:5 的 2 g/dL  $\text{CaCl}_2$  溶液,于 30 °C,120 r/min 条件下分别浸提 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h 后,取滤液测定酶活力,结果见表 9.浸提时间的选择为 1.5 h 最佳.

表 9 浸提时间对酶活的影响

Tab.9 The effect of extracting time on the activity of xylanase

浸提时间/h	酶活力/(U/mL)
0.5	245
1.0	275
1.5	304
2.0	280
2.5	270

把 2 g/dL  $\text{CaCl}_2$  溶液加入发酵好的 10 g 麸曲中浸提,其加入体积以每克麸曲固液比  $m(\text{g}):V$

(mL)分别为 1:5, 1:10, 1:15, 后在 30 °C 条件下浸提 1.5 h, 取滤液测定酶活力, 结果见表 10. 从单位酶活来看, 以  $m(g): V(mL)=1:5$  的浸提固液比最佳, 其次是  $m(g): V(mL)=1:10$ , 再次为  $m(g): V(mL)=1:15$ , 但从总酶活来比较, 则次序正好相反. 浸提固液比  $m(g): V(mL)=1:15$  和  $m(g): V(mL)=1:10$  比  $m(g): V(mL)=1:5$  总活力分别提高 49% 和 19%, 但考虑到浓缩所耗动力能源最终  $m(g): V(mL)=1:5$  固液比浸提较经济, 滤渣残

表 10 浸提固液比对酶活的影响

Tab.10 The effect of extractant amount on the activity of xylanase

液提液固液比	浸提酶液体积/mL	酶活力/(U/mL)	总酶活/U
1:5	44	302	13 288
1:10	93	171	15 903
1:15	141	141	19 881

存木聚糖酶可采用 2 次浸提加以解决.

2.2.2 超滤浓缩对酶活力的影响 鲜曲在最佳浸提条件(浸提溶剂:2 g/dL CaCl<sub>2</sub> 溶液;浸提温度:30 °C;浸提时间:1.5 h;浸提固液比: $m(g): V(mL)$ 为 1:5)下浸提 2 次, 而后把 2 次浸提过滤所得酶液合并, 进行多次浓缩, 最终确定于 25 °C, 40 kPa, 冷却水温度 18 °C 的条件下超滤浓缩为佳, 木聚糖酶的回收率能达到 90% 以上(见表 11).

表 11 浓缩实验结果

Tab.11 The results of concentrating experiment

酶液	体积/mL	酶活力/(U/mL)	总活力/U	收率/%
稀酶液	3 095	132	408 540	100
浓缩液	543	685	371 955	91

按同样条件进行 5 批超滤浓缩试验, 结果见表 12, 木聚糖酶的平均回收率达 92%.

固体发酵法制取麸曲, 再经溶剂浸提, 经过滤去杂、浓缩、喷雾干燥, 即为粉制产品.

表 12 木聚糖酶浓缩后回收率

Tab.12 The yield of xylanase by condensing

批次	浸提液滤液			浓缩液			收率/%
	体积/mL	酶活力/(U/mL)	总活力/U	体积/mL	酶活力/(U/mL)	总活力/U	
1	3 000	186	558 000	368	1380	507 740	91
2	3 000	217	651 000	356	1701	605 556	93
3	4 000	240	960 000	418	1998	835 164	87
4	4 500	228	1 026 000	475	2009	954 275	93
5	12 000	236	2 832 000	1440	1888	2 718 720	96

### 3 结 论

研究表明, 诱导物对木聚糖酶产率有明显促进作用. 而添加无机氮源较添加有机氮源有利. 接种量以 0.3 mL 孢子悬液( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ )为宜. 产酶过程

主要在成熟前期, 即培养 44 h 左右, 分生孢子变黑时达到产酶高峰. 本实验研究了木聚糖酶提取条件, 结果以  $m(g): V(mL)$ 为 1:5 的固液比加入 2 g/dL CaCl<sub>2</sub> 溶液, 30 °C 浸提 1.5 h, 采用 25 °C, 40 kPa, 冷却水温度 18 °C 条件浓缩可获得 90% 以上收率.

### 参考文献:

[1] 周素梅. 面包业酶制剂发展和研究现状[J]. 粮油食品科技, 1998, 5(23)-24.  
 [2] 蔡敬民, 吴克, 张洁, 等. 黑曲霉 A3 木聚糖酶固体发酵研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(2):1-4.  
 [3] 陈惠忠, 高培基, 王祖农. 产木聚糖酶菌株的选育及其液体发酵条件[J]. 微生物学报, 1990, 30(5):351-357.  
 [4] 陈红歌, 朱静, 梁改芹, 等. 酸性木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. 微生物学报, 1999, 39(4):350-354.

(责任编辑 杨 萌)