

文章编号: 1009-038X(2004)05-0048-05

半纤维素酶高产菌种的选育及产酶条件

李江华, 房峻

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以黑曲霉 WA301 为出发株, 经过紫外诱变获得一株遗传性状稳定的半纤维素酶的高产突变株 WA9024. 通过对培养基中碳源、氮源、水分和起始 pH 值的优化, 突变株 WA9024 以麸皮为基质的固态发酵产半纤维素酶的能力进一步得到提高. 在较适的条件下, WA9024 的甘露聚糖酶酶活达到 8 984 U/g, 木聚糖酶酶活达到 503 U/g, 分别比出发菌株提高了 1 160% 和 210%.

关键词: 半纤维素酶; 黑曲霉; 诱变; 甘露聚糖酶; 木聚糖酶

中图分类号: TQ 925. 6

文献标识码: A

Breeding of Hemicellulase Overproducing Strain and Conditions for Hemicellulase Production

LI Jiang-hua, FANG Jun

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

Abstract: A genetic stable hemicellulase overproducing mutant WA9024 was obtained from its parent strain *Aspergillus niger* WA301 by mutagenesis of UV. Production of hemicellulase by mutant WA9024 under solid state fermentation (SSF) on wheat bran was enhanced by optimization of the type of carbon and nitrogen sources, water content in substrate and initial pH of the culture medium. Under the appropriate conditions, the hemicellulases yield of WA9024 were increased by 1 160% for mannanase and 210% for xylanase, and the enzyme activities reached 8 984 U/g and 507 U/g, respectively.

Key words: hemicellulase; *Aspergillus niger*; mutagenesis; mannanase; xylanase

半纤维素酶是分解半纤维素的一类酶的总称, 主要由各种细菌和霉菌发酵产生^[1,2], 在自然界中是仅次于纤维素的可再生有机资源. 与纤维素(β -1,4 葡聚糖主链)相比, 半纤维素的结构与组成十分复杂, 包括木聚糖、甘露聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯半乳聚糖和木葡聚糖等多种组分, 而其中又以木聚糖和甘露聚糖两种多糖与食品、饲料及

制浆造纸工业关系最大^[3-8]. 目前, 有关半纤维素酶的文献主要涉及酶的筛选、纯化和应用, 而产酶菌种的诱变育种则很少见报道. 作者报道了以黑曲霉(*Aspergillus niger*) WA301 为出发菌株, 经紫外诱变选育出一株半纤维素酶高产突变株 WA9024 的过程.

收稿日期 2003-09-05; 修回日期 2004-02-01.

作者简介: 李江华(1966-), 男, 江西九江人, 副研究员, 工学硕士.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 黑曲霉(*Aspergillus niger*) WA301, 作者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基

1) 固体(分离)培养基:土豆 20.0 g/dL,蔗糖 2.0 g/dL,琼脂 2.0 g/dL,pH 值自然。此培养基用于菌种保藏、斜面种子和平板分离。

2) 筛选培养基 250 mL 三角瓶装 10.0 g 麸皮,1.5 g 豆饼粉,0.4 g 魔芋粉,0.2 g 硫酸铵,15 mL 无机盐溶液,pH 值自然,121 °C 灭菌 45 min。此培养基用于突变株的初筛和复筛。

3) 固态发酵产酶培养基 250 mL 三角瓶中装 7.0 g 麸皮,3.0 g 豆饼粉,0.3 g 魔芋粉,15 mL 无机盐溶液,pH 值自然,于 121 °C 灭菌 45 min。

无机盐溶液的组成 0.1 g/dL CaCl_2 ,0.1 g/dL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.1 g/dL KH_2PO_4 。

1.2 实验方法

1.2.1 亚硝基胍诱变 见文献[9]。

1.2.2 紫外诱变 见文献[9]。

1.2.3 筛选方法 诱变处理后的孢子悬浮液经适当稀释后涂布于平板培养基培养,随机挑取长出的菌落转接于试管斜面,供固态发酵初筛和复筛用。

1.2.4 培养方法 固体发酵培养基灭菌冷却后接种一环斜面孢子,于 35 °C 培养 96 h。

1.2.5 酶活性的测定

1) 酶液制备:发酵结束后,称取 1 g 固体曲,加 10 mL 蒸馏水,25 °C 浸提 30 min,然后过滤,取滤液适当稀释测定酶活力。

2) 甘露聚糖酶活测定:取 0.5 g/dL 槐豆胶(Sigma 公司产品)溶液(以 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制)0.9 mL 于试管中,60 °C 水浴预热 5 min,加入适当稀释的酶液 0.1 mL,保温 10 min。采用 DNS 法测定水解产生的还原糖。在上述条件下,每克干曲每分钟催化底物水解释放出 1 μmol 还原糖(以甘露糖计)所含酶量定义为一个甘露聚糖酶单位。

3) 木聚糖酶活性的测定:取 1.0 g/dL 木聚糖(Sigma 公司产品)溶液(以 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制)0.9 mL 于试管中,60 °C 水浴预热 5 min,加入适当稀释的酶液 0.1 mL,保温 10 min。采用 DNS 法测定水解产生的还原糖。在上述条件下,每克干曲每分钟催化底物水解释放出 1 μmol 还原

糖(以木糖计)所含酶量定义为一个木聚糖酶单位。

1.2.6 水分的测定 湿曲在 105 °C 干燥至恒重测定。

2 实验结果

2.1 菌种选育

2.1.1 诱变方法的选择 传统的菌种改良方法主要有化学诱变和物理诱变。不同的微生物,各种诱变方法的诱变效果差异较大。对于出发株 WA301,分别采用亚硝基胍和紫外线处理,并比较两者的效果,结果见图 1,2。可以看出,用亚硝基胍处理 WA301 菌株,其正突变率随着亚硝基胍剂量的增加而提高,而用紫外线处理 WA301 菌株,其正突变率则随照射时间的增加而降低。对两者的诱变效果进行比较表明,采用紫外线处理 WA301 菌株,其正突变率明显高于亚硝基胍处理,而且采用亚硝基胍处理所获得的正突变株,其甘露聚糖酶和木聚糖酶活性提高的幅度均小于 10%。因此,在产半纤维素酶黑曲霉高产菌株的选育过程中采用紫外线诱变的方法。

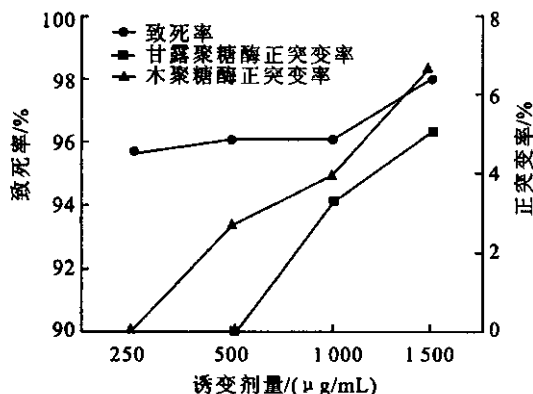


图1 亚硝基胍诱变效果

Fig.1 Effect of NTG treatment

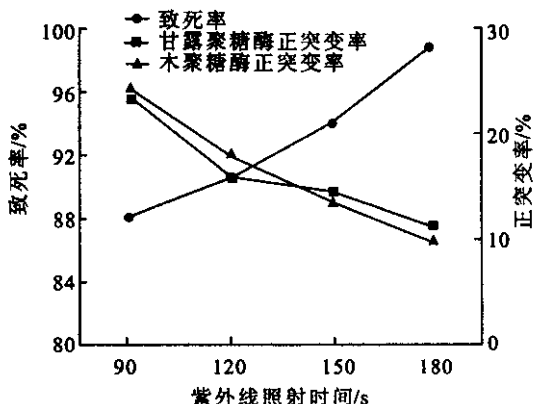


图2 紫外诱变效果

Fig.2 Effect of UV treatment

2.1.2 WA301 的诱变结果 将 WA301 的孢子

悬浮液用紫外线分别照射 90,120,150,180 s,然后涂布于平板土豆培养基上进行培养.从长出的单菌落中随机挑出约 300 株进行初筛,从中选择甘露聚糖酶和木聚糖酶的产酶水平均高于 WA301 菌株的突变株进行复筛,结果见表 1.可以看出,木聚糖酶活性的提高与甘露聚糖酶活性的提高有一定的关联,但其提高幅度小于甘露聚糖酶活性的提高幅度.在产酶水平较高的 10 株突变株中,编号为 WA9024 的突变株提高幅度最大,其甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活性分别为 6 949 U/g 和 347 U/g,提高幅度分别为 898% 和 145%,该菌株是从紫外照射时间为 90 s 的变异株中筛选出来的.

表 1 WA301 紫外诱变结果

Tab. 1 Results of mutagenesis on WA301 with UV

菌株编号	甘露聚糖酶 相对酶活/%	木聚糖酶 相对酶活/%
WA301	100	100
WA901	115	106
WA9013	215	118
WA9024	898	145
WA9045	157	115
WA9063	143	121
WA1219	136	129
WA1232	126	105
WA1251	119	112
WA1514	116	108
WA1521	124	117

2.1.3 WA9024 突变株的遗传稳定性 用于工业化生产的高产突变株,除了满足高产的要求外,还必须具有较好的遗传稳定性.因此在选育出半纤维素酶的高产突变株 WA9024 后,对其遗传稳定性进行了考察,结果见图 3.可以看出,经过 10 次传代培养后,WA9024 仍保留了较高的半纤维素酶的合成能力,具有较好的遗传稳定性.

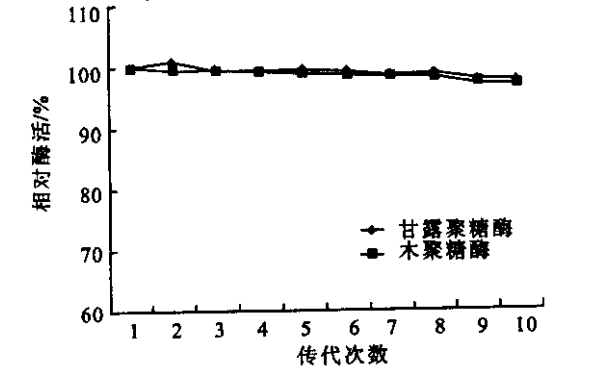


图 3 WA9024 突变株的遗传稳定性
Fig.3 The genetic stablility of mutant WA9024

2.2 突变株 WA9024 的产酶条件

2.2.1 碳源对产酶的影响 以麸皮为基础碳源,试验了不同碳源对产酶的影响,结果见表 2. 可见魔芋粉对甘露聚糖酶的合成有明显促进作用,但对木聚糖酶的合成有抑制作用.

表 2 碳源对产酶的影响

Tab.2 Effects of different carbon sources on production of enzymes

碳源种类	添加量/g	甘露聚糖酶 酶活/(U/g)	木聚糖酶 酶活/(U/g)
玉米粉	0.1	4 860	421
可溶性淀粉	0.1	4 615	403
黄原胶	0.1	4 101	398
甘露糖	0.1	4 436	382
葡萄糖	0.1	4 495	396
角豆胶	0.1	4 734	352
魔芋粉	0.1	5 978	411
对照		4 792	458

2.2.2 魔芋粉添加量对产酶的影响 从图 4 可以看出,培养基中添加魔芋粉有利于甘露聚糖酶的合成. 魔芋粉的添加量为 0.4 g 时,甘露聚糖酶的酶活最高. 但魔芋粉对木聚糖酶的合成有抑制作用,而且当魔芋粉的添加量超过 0.3 g 时,这种抑制作用更为显著. 综合考虑甘露聚糖酶和木聚糖酶的合成,确定魔芋粉添加量为 0.3 g.

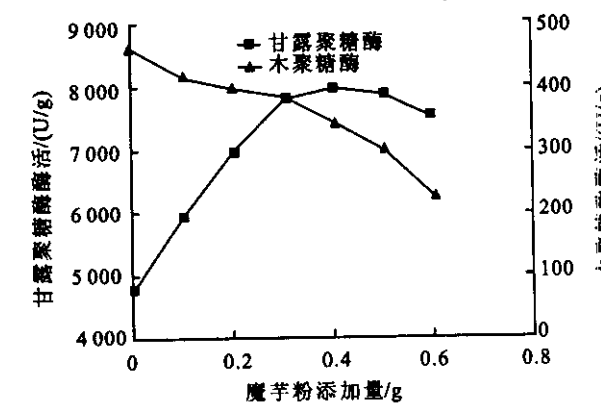


图 4 魔芋粉添加量对产酶的影响
Fig.4 Effect s of kojak concentration on enzymes production

2.2.3 氮源对产酶的影响 试验各种氮源对产酶的影响,结果见表 3. 结果表明,豆饼粉为最佳氮源.

2.2.4 麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响 试验了麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响(见表 4),结果表明,麸皮和豆饼粉的最佳质量配比为 7: 3.

表 3 氮源对产酶的影响

Tab.3 Effects of different nitrogen sources on production of enzymes

碳源种类	添加量/g	甘露聚糖酶酶活/(U/g)	木聚糖酶酶活/(U/g)
硝酸钠	1	5 063	336
尿素	1	3 952	273
豆饼粉	1.5	7 937	392
硝酸铵	1	5 357	308
蛋白胨	1	5 516	314
硫酸铵	1	5 357	325
酵母膏	1	4 913	269

表 4 麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响

Tab.4 Effects of wheat bran/ soybean meal ratio on production of enzymes

W 麸皮: 豆饼粉	甘露聚糖酶酶活/(U/g)	木聚糖酶酶活/(U/g)
9: 1	7 643	379
8: 2	8 277	413
7: 3	8 564	448
6: 4	8 338	425
5: 5	7 942	409
4: 6	6 587	357

2.2.5 培养基中水分对产酶的影响 试验培养基中不同水分含量对产酶的影响,结果见图 5。可以看出,水分质量分数对产酶有较大的影响,培养基中较适的水分质量分数大约在 68% (即加水体积比为 1: 1.5 左右)。

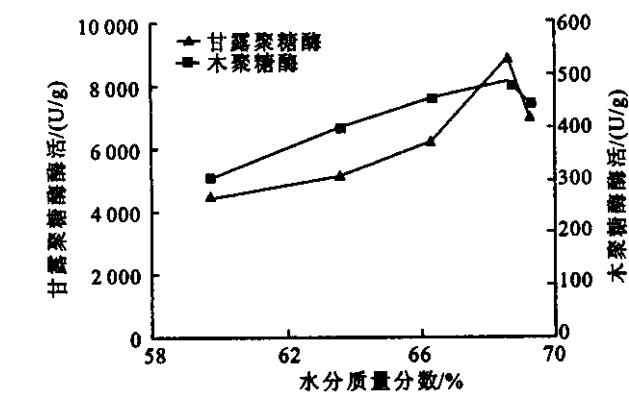


图 5 培养基中水分对产酶的影响

Fig.5 Effect of water content in substrate on production of enzymes

2.2.6 培养基起始 pH 值对产酶的影响 将培养

基调整至不同的 pH 值(4~7),分别灭菌、接种和培养。图 6 的结果表明,培养基的起始 pH 值在 4~7 的范围内对产酶的影响不明显,培养基的起始 pH 值可采用自然 pH 值(5.5~6.0)。

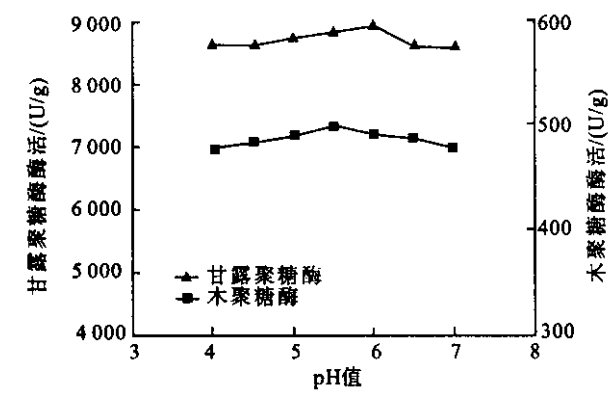


图 6 起始 pH 值对产酶的影响

Fig.6 Effects of initial pH on production of enzymes

2.3 WA9024 发酵过程曲线

根据试验结果,确定突变株 WA9024 较适的培养基组成为 250 mL 三角瓶中装 7.0 g 麸皮,3.0 g 豆饼粉,0.3 g 魔芋粉,15 mL 无机盐溶液,pH 值自然。将 WA9024 接种于固态发酵培养基,置 35℃ 培养。从 24 h 开始取样测定酶活力,以后每隔 12 h 取样测定一次,直到第 108 小时,结果见图 7。该菌从 24 h 时开始产半纤维素酶,培养 72 h 时木聚糖酶达到产酶高峰,酶活为 503 U/g,培养 96 h 甘露聚糖酶达到产酶高峰,酶活为 8 984 U/g。

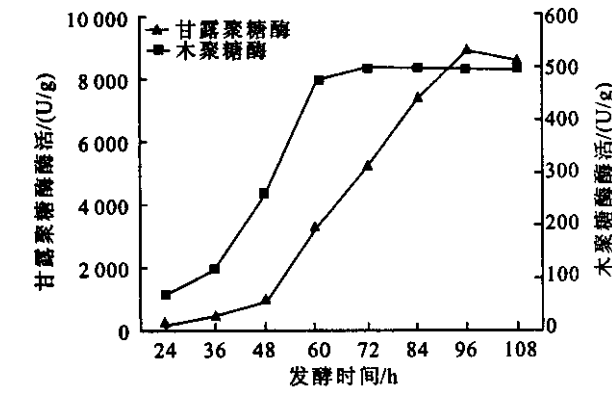


图 7 WA9024 发酵过程曲线

Fig.7 Time course of a batch cultivation of WA9024

3 结 论

以黑曲霉(*Aspergillus niger*) WA301 为出发菌株选育半纤维素酶高产菌,采用紫外线作为诱变剂,其诱变效果明显高于亚硝基胍,而且用紫外线处理 WA301 菌株,其正突变率则随照射时间的增加而降低。将 WA301 用紫外线照射 90 s 后,经过初筛和复筛,筛选出一株半纤维素酶的高产菌

WA9024,其甘露聚糖酶和木聚糖酶的发酵酶活分别为 6 949 U/g 和 347 U/g. 从培养基的碳源、氮源、水分和起始 pH 值等方面对突变株 WA9024 的固态发酵条件进行优化,其甘露聚糖酶和木聚糖

酶的最高产酶水平分别为 8 984 U/g 和 503 U/g,比出发株分别提高了 1 160% 和 210%,而且突变株 WA9024 具有较好的遗传稳定性.

参考文献:

- [1] Vinola R, Poovendhree R, Balakrishnan P, *et al.* Effect of aeration on the production of hemicellulases by *T. lanuginosus* SSBP in a 30 L bioreactor[J]. **Process Biochemistry**, 2002, 37 (12) 1221 – 1228.
- [2] Dalia S, Yuval S. Microbial hemicellulases[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2003, 6(3) 219 – 228.
- [3] 邱伟芬. 酶制剂在面粉品质改良中的应用[J]. **食品科技**, 2002, (3) 28 – 31.
- [4] 于红, 卢雪梅, 秦梦华, 等. 酶法漂白的现状和机理研究进展[J]. **中国造纸学报**, 2002, 17(2) 112 – 115.
- [5] Fodge D, Anderson D. Hemicellulase supplement to improve the energy efficiency of hemicellulose-containing animal feed[P]. **美国专利** 1USP5429828, 1995-06-02.
- [6] Pia A, Arthur V, Jo Zsef M, *et al.* Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a β -mannanase[J]. **Journal of Biotechnology**, 1998, 63(3) 199 – 210.
- [7] 吕广宙, 王君玮, 许同惠. 半纤维素酶可提高肉鸡生产性能[J]. **中国家禽**, 1996, (2) 13.
- [8] 许梓荣, 卢建军, 杨英. 饲料中添加半纤维素酶对生长猪的促生长作用及其内分泌机制[J]. **中国兽医学报**, 2002, 22(2) 201 – 202.
- [9] 微生物诱变育种编写组. 微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1973.

(责任编辑 李春丽)

《无锡轻工大学学报》连续四次进入中文“核心期刊”

依据文献计量学原理与方法,经过研究人员对相关文献的检索、计算与分析,通过学科专家评审,《无锡轻工大学学报》2004 年第四次被《中文核心期刊要目总览》核心期刊研究课题组确定为“轻工业”类核心期刊,并被编入《中文核心期刊要目总览》第四版,于今年 7 月由北京大学出版社出版发行。自 1992 年我国首次进行大规模“核心期刊”研究,并出版《中文核心期刊要目总览》以来,每 4 年对收录的刊物,根据相关指标实行动态筛选、淘汰,《无锡轻工大学学报》连续入编《中文核心期刊要目总览》前三版(1992 版、1996 版、2000 版),被确定为中文“核心期刊”。

《中文核心期刊要目总览》第四版“核心期刊”研究,为“2001 年国家社会科学基金项目”,该课题组总结了前三版的研究经验,参考了大量国内外相关文献,对“核心期刊”评价的基础理论、评价方法(评价指标体系、核心期刊表的学科划分、核心期刊数量的界定)、评价软件的设计与使用、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究,在更全面地认识和深入理解“核心期刊”评价理论基础,进一步改进了“核心期刊”评价方法,使之更趋科学、合理,力求使评价结果符合客观实际。

第四版“核心期刊”评选,采用了刊物的被索量、被摘量、被引量、它引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标,选作评价指标统计源的数据库(个别为文摘刊物)有 51 种,统计到的文献数量共计 9 435 301 篇次,涉及期刊 39 893 种次。参加“核心期刊”评审的学科专家达 1 873 位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国现行出版的 12 000 种中文期刊中评选出 1 800 种“核心期刊”。它为读者和情报部门遴选重要刊物信息提供了依据。

《无锡轻工大学学报》编辑部