

## 链霉菌 Z18 产木聚糖酶的发酵条件

翟倩<sup>1</sup> 江正强<sup>1</sup> 闫巧娟<sup>2</sup> 邓伟<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学 工学院, 北京 100083)

**摘要** 为进一步研究木聚糖酶的纯化和性质,对本研究室新筛选出一株高产木聚糖酶的链霉菌 Z18 的液态发酵条件进行了研究。结果表明:最佳碳源为 1.5% (质量分数) 的玉米芯水不溶性木聚糖,培养第 5 天其酶活性浓度达 435.03 U/mL。不同来源木聚糖诱导产木聚糖酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳及酶谱分析结果表明,链霉菌 Z18 能够产生 3 种木聚糖酶,以 22 ku 的木聚糖酶为主;初始 pH 5.5、培养温度 30 ℃ 时所得木聚糖酶活性最高。在优化后的培养基和培养条件下,第 7 天链霉菌 Z18 产木聚糖酶活性达到峰值,其活性浓度为 755 U/mL,为目前国内报道链霉菌属最高产酶水平。

**关键词** 链霉菌; 木聚糖酶; 发酵条件; 玉米芯水不溶性木聚糖

中图分类号 Q 93

文章编号 1007-4333(2007)03-0075-06

文献标识码 A

## Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. Z18

Zhai Qian<sup>1</sup>, Jiang Zhengqiang<sup>1</sup>, Yan Qiaojuan<sup>2</sup>, Deng Wei<sup>1</sup>

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

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** Fermentation conditions of xylanase production by strain of *Streptomyces* sp. Z18 were studied. The optimum concentration of insoluble corncob xylan (1.5%) produced a titre of 435.03 U/mL in the fifth day. Three kinds of xylanases were produced by *Streptomyces* sp. Z18 and the ratio of 22 ku xylanase was the most. Optimum pH and temperature for xylanase production were pH 5.5 and 30 ℃, respectively. The highest xylanase activity of 755 U/mL was achieved in the seventh day. Thus, *Streptomyces* sp. Z18 produced the highest xylanase activity among *Streptomyces*.

**Key words** *Streptomyces*; xylanase; fermentation conditions; insoluble corncob xylan

木聚糖酶在自然界分布广泛,已报道能产木聚糖酶的微生物有细菌、真菌、放线菌等。真菌来源的木聚糖酶因具有较高的纤维素酶活性,应用范围受到一定限制,不适用于纸浆生物漂白和低聚木糖生产等。放线菌产木聚糖酶的活性高而产纤维素酶活性较低,有较高的潜在工业应用价值<sup>[1]</sup>。国外已有许多关于链霉菌产木聚糖酶的报道,其中大部分产木聚糖酶活性较低。Nascimento 等报道 *Streptomyces malaysiensis* 产木聚糖酶活性为 116 U/mL<sup>[2]</sup>。我国关于链霉菌产木聚糖酶的研究较少,且产酶水平不高。孙晓霞等报道白色链霉菌 (*Streptomyces*

*albus*) 产木聚糖酶活性为 45.66 U/mL<sup>[3]</sup>,李里特等报道卷须链霉菌 (*Streptomyces cirratus*) 产木聚糖酶活性达 623 U/mL<sup>[4]</sup>;提高链霉菌产木聚糖酶活性水平成为一个亟待解决的问题。

笔者拟通过对本研究室新筛选出一株产木聚糖酶活性较高的链霉菌菌株发酵产酶条件的研究,为进一步研究木聚糖酶的纯化和性质提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

链霉菌 (*Streptomyces* sp.) Z18 菌株由本研究室

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-05-0130)

作者简介: 翟倩,硕士研究生;江正强,教授,博士,通讯作者,主要从事酶工程研究, E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

从土壤中筛选并保存。斜面培养基(每L):10 g 玉米芯水不溶性木聚糖,2 g 胰蛋白胨,2 g 酵母提取物,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,15 g 琼脂, $10^5$  Pa 灭菌 20 min。

## 1.2 试剂

玉米芯水不溶性木聚糖、棉子壳水不溶性木聚糖、甘蔗渣水不溶性木聚糖、稻壳水不溶性木聚糖均为自制,制造方法参考文献[5];桦木木聚糖(birchwood xylan)、榉木木聚糖(beechwood xylan)、燕麦木聚糖(oat spelts xylan)、低黏度羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose)为美国 Sigma 公司产品;微晶纤维素(avicel)为德国 Merck 公司产品;胰蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品;其他试剂为国产分析纯。所用农业废弃物购自北京郊区。

## 1.3 发酵产酶试验

1) 发酵产酶培养基。玉米芯水不溶性木聚糖 15 g,胰蛋白胨 15 g,酵母提取物 3 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,Tween 80 5 g,定容至 1 L,自然 pH 5.8, $10^5$  Pa 灭菌 20 min。

2) 培养条件。250 mL 三角瓶装液量 50 mL,接入  $1\text{ cm}^2$  平板培养基生长 5~6 d 的菌落,于 40、150 r/min 摇床培养 5 d。发酵结束后,于 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定酶活性浓度。

3) 发酵产酶条件的优化。改变碳源种类,考察其对该菌株产酶的影响。碳源种类包括:小分子糖类,添加量 1%(质量分数,下同);农业废弃物类,添加量 3%;不同来源木聚糖,添加量 1.5%。在优化的碳源基础上通过改变培养基初始 pH 和培养温度,确定最佳 pH 和温度对发酵产酶的影响。在最佳培养基组成和培养条件下,每天取样后测木聚糖酶活性浓度和蛋白含量,了解产酶历程。

## 1.4 酶活性和蛋白含量测定

木聚糖酶活性的测定参照 DNS 法<sup>[6]</sup>:将 0.1 mL 适当稀释的酶液,加入 0.9 mL 用 0.05 mol/L、pH 7.0 MOPS 缓冲液配制的 1% 桦木木聚糖底物溶液中,55 反应 10 min,以木糖作为标准,用 DNS 法测定释放的还原糖量。木聚糖酶活性单位定义:在上述条件下每 min 水解木聚糖生成  $1\ \mu\text{mol}$  木糖所需要的酶的物质量为 1 U。纤维素酶活性:方法同上,仅将底物和标准物分别换成低黏度羧甲基纤维素和葡萄糖。蛋白含量测定:采用 Lowry 法<sup>[7]</sup>,以牛血清蛋白作为标准。试验结果均为 3 次

平行试验的平均值。

## 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和酶谱分析

Native-PAGE 按照 Laemmli 方法<sup>[8]</sup>进行分析。使用 3.5%~15.0%(质量分数,下同)的梯度胶,样品与凝胶中不添加 SDS 与巯基乙醇。电泳完成后将凝胶分成 2 份,一份用于考马斯亮蓝 R-250 染色,另一份用于酶谱分析,用高分子质量标准蛋白作为标准。SDS-PAGE 按照 Laemmli 方法<sup>[8]</sup>进行分析。分离胶 12.5%,浓缩胶 4.5%。电泳完成后将凝胶分成 2 份,一份用于考马斯亮蓝 R-250 染色,另一份用于酶谱分析,用低分子质量标准蛋白作为标准。非变性条件下的酶谱分析和变性条件下的酶谱分析按照 Jiang 等<sup>[9]</sup>的方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同碳源对产木聚糖酶的影响

不同碳源对链霉菌 Z18 产木聚糖酶活性的影响结果见表 1。链霉菌 Z18 在没有诱导物存在的条件下,也有少量(1.80 U/mL)组成型木聚糖酶分泌到细胞外。在试验用碳源中,以玉米芯水不溶性木聚糖诱导产酶效果最佳,达到 435.03 U/mL。不同碳源诱导产纤维素酶活性水平都很低,最高值为玉米芯粉诱导产纤维素酶活性,其活性浓度达到 6.53 U/mL;玉米芯水不溶性木聚糖诱导产纤维素酶活性浓度仅为 0.85 U/mL。

以所试单糖和二糖作为碳源时诱导产酶效果不理想,木聚糖酶活性浓度均低于 10 U/mL,其中葡萄糖诱导产木聚糖酶活性浓度仅 1.42 U/mL。这可能是由于葡萄糖引起的代谢阻遏抑制了木聚糖酶的合成。不同农业废弃物作为碳源诱导产木聚糖酶时,菌体均能够生长,其中玉米芯粉诱导较高的木聚糖酶活性,其活性浓度为 226.53 U/mL。一般木聚糖的诱导效果好于农业废弃物,但孙晓霞等研究发现木粉的诱导效果好于木聚糖<sup>[3]</sup>。本研究中链霉菌 Z18 能够利用农业废弃物,且产酶水平最高可达玉米芯水不溶性木聚糖诱导时的 50%,与榉木木聚糖、燕麦木聚糖诱导所产木聚糖酶水平相当。链霉菌 Z18 的这一特性,可降低产酶成本。

从表 1 可以看出,试验所用木聚糖中,玉米芯水不溶性木聚糖是最佳诱导碳源,其第 5 天产酶为 435.03 U/mL。其他来源的木聚糖也能诱导产酶,其中效果较好的榉木木聚糖达 367.74 U/mL。自然条件下,微生物木聚糖酶属诱导酶,只有在有合适

的诱导底物时,才会产生较多木聚糖酶。有很多底物可以诱导微生物产生木聚糖酶,其中诱导性较高的是各种来源的木聚糖。不同植物纤维原料中木聚糖的组成和结构不同,即使同一原料中的木聚糖采用不同的方法制备,其组成和结构也不同,都会影响木聚糖酶活性<sup>[5]</sup>。

从图 1 可以看出,链霉菌 Z18 能够产生 3 种木聚糖酶;图 2 表明其产生至少 3 种木聚糖酶亚基,分子质量分别为 46、33 和 22 ku。玉米芯水不溶性木

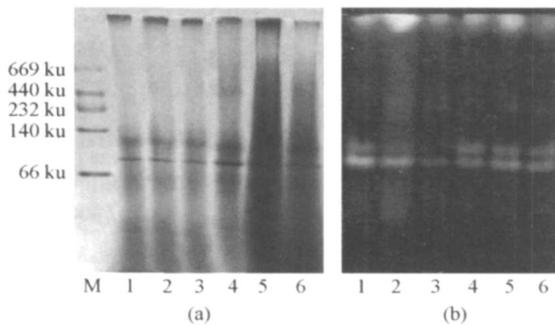
聚糖作为诱导碳源时,以产 46 和 22 ku 的木聚糖酶为主;而棉子壳水不溶性木聚糖作为诱导碳源时,以产 22 ku 的木聚糖酶为主,几乎不产 46 ku 的木聚糖酶。大多放线菌都能产生至少 2 种木聚糖酶,而且通常都是单亚基蛋白。Petrosyan 报道 *Streptomyces* DSM 41796 主要产生 4 种胞外木聚糖酶,分子质量分别为 145、120、60 和 45 ku,且不同碳源诱导下其产生的比例不同<sup>[10]</sup>。

表 1 不同碳源诱导物下链霉菌 Z18 产木聚糖酶和纤维素酶活性浓度

Table 1 Xylanase activity and cellulase activity of *Streptomyces* sp. Z18 cultured in the presence of different carbon resources as inducer

碳源来源	种 类	木聚糖酶活性浓度/ (U/ mL)	纤维素酶活性浓度/ (U/ mL)	蛋白酶质量浓度/ (mg/ mL)
糖类	对照	1.80	0.23	0.24
	木糖	5.75	4.76	0.67
	葡萄糖	1.42	1.10	0.74
	果糖	2.47	0.33	0.31
	甘露糖	3.39	0.61	0.34
	鼠李糖	2.33	0.58	0.33
	阿拉伯糖	2.78	1.21	0.56
	麦芽糖	5.35	1.38	0.33
	乳糖	9.67	1.78	0.42
	纤维二糖	3.09	0.76	0.38
	蔗糖	1.67	0.16	0.26
	棉子糖	1.64	0.27	0.30
	微晶纤维素	4.40	0.91	0.26
	可溶性淀粉	2.84	0.29	0.28
农业废弃物	玉米芯粉	226.53	6.53	1.95
	麦麸	33.78	0.91	0.74
	甘蔗渣	121.62	0.95	1.21
	玉米皮	101.54	2.80	1.40
	玉米秆	74.93	2.48	2.02
木聚糖	桦木木聚糖	367.74	1.77	1.13
	玉米芯水不溶性木聚糖	435.03	0.85	1.58
	桦木木聚糖	223.01	1.72	0.59
	燕麦木聚糖	225.50	0.90	1.03
	棉子壳水不溶性木聚糖	292.51	1.55	2.89
	甘蔗渣水不溶性木聚糖	246.10	0.71	4.29
	稻壳水不溶性木聚糖	30.27	0.55	1.37

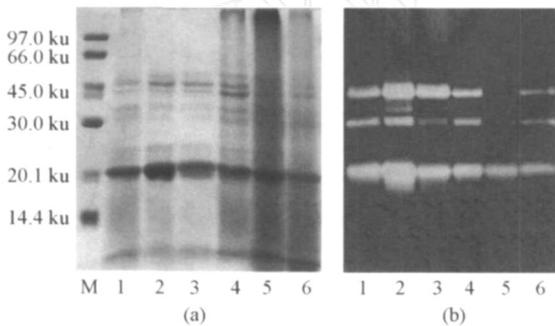
注:不同碳源使用量为农业废弃物 3% (质量分数,下同),不同来源木聚糖 1.5%,其他 1%;对照不添加碳源。数据为 3 次平行试验 (pH 5.8, 40 °C 培养 5 d) 结果平均值。



泳道 M 为高分子质量标准蛋白,自上而下顺序为:甲状腺球蛋白、铁蛋白、过氧化氢酶、乳酸脱氢酶、牛血清蛋白;泳道 1~6 分别为桦木木聚糖、玉米芯水不溶性木聚糖、榉木木聚糖、燕麦木聚糖、棉子壳水不溶性木聚糖和甘蔗渣水不溶性木聚糖(图 2 同)

图 1 不同来源木聚糖诱导链霉菌 Z18 上清液 Native-PAGE(a)及酶谱(b)分析(40℃培养 5 d,下同)

Fig. 1 Native-PAGE and zymogram analysis of culture supernatant by *Streptomyces* sp. Z18 using different xylans as inducer



泳道 M 为低分子量标准蛋白,自上而下顺序为:磷酸化酶、牛血清蛋白、鸡卵清蛋白、碳酸酐酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、牛乳清蛋白(图 4 同)

图 2 不同来源木聚糖诱导链霉菌 Z18 上清液 SDS-PAGE(a)及酶谱(b)分析

Fig. 2 SDS-PAGE and zymogram analysis of culture supernatant by *Streptomyces* sp. Z18 using different xylans as inducer

## 2.2 培养基初始 pH 对产木聚糖酶的影响

从图 3 可以看出,培养基初始 pH 对链霉菌 Z18 产木聚糖酶活性的影响显著。初始 pH 为 5.5 时酶活性浓度最高达 530.14 U/mL,随着 pH 的增高酶活性浓度下降迅速,pH 6.5 时仅为 5.5 时的 1/3 (144.58 U/mL),可见中性偏酸条件最适合链霉菌 Z18 产木聚糖酶。培养基的自然 pH 为 5.8,此时酶活性浓度为 435.03 U/mL,与最适初始 pH 的结果相差不大。形态学观察结果表明,培养基初始 pH 显著影响了菌丝的生长,而菌丝的生长则直接影响产酶。在 pH 5.0 和 7.5~9.0 时菌丝生长稀疏,发酵液黏度很低;pH 5.5~6.0 时菌丝生长茂密,发酵

液黏稠。

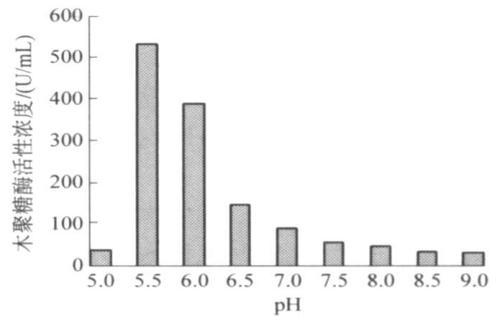
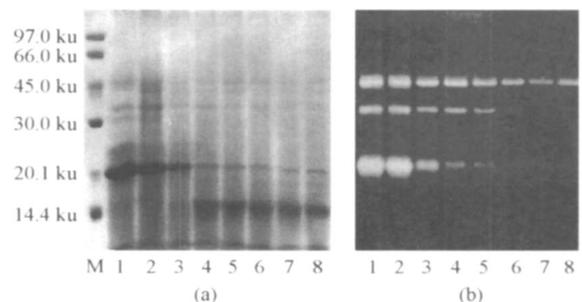


图 3 不同初始 pH 对产木聚糖酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on xylanase production

从图 4 可以看出,培养基初始 pH 5.5~6.0 时酶谱明显,对应的木聚糖酶蛋白带清晰;pH 6.5 后,随着培养基初始 pH 的升高木聚糖酶活性逐渐降低,15 ku 杂蛋白明显增加,酶谱带亮度逐渐减弱。有研究报道,培养基的初始 pH 不仅影响酶产量,而且能改变不同木聚糖酶的比例。Xiong 等报道 *Trichoderma reesei* Rut C-30 能产生 3 种木聚糖酶:当培养基 pH 较高时(约 6.0),主要产生木聚糖酶 XYN 和 XYN;当培养基 pH 较低时(约 4.0),主要产生木聚糖酶 XYN I 和 XYN<sup>[11]</sup>。本研究中链霉菌 Z18 在培养基 pH 5.5~6.0 时,产生分子质量 46、33 和 22 ku 的木聚糖酶,22 ku 木聚糖酶所占分泌蛋白的比例最大,但其仅在 pH 5.5~6.0 时产量较高;而 46 ku 木聚糖酶受初始 pH 影响较小,在 pH 5.5~9.0 之间变化很小,说明该木聚糖酶有一定的耐碱性。



泳道 M 为低分子量标准蛋白;泳道 1~8 培养基 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0

图 4 不同初始 pH 培养基诱导链霉菌 Z18 上清液 SDS-PAGE(a)及酶谱(b)分析

Fig. 4 SDS-PAGE and zymogram analysis of culture supernatant by *Streptomyces* sp. Z18 using media with different initial pH values as inducer

## 2.3 培养温度对产木聚糖酶的影响

从图 5 可以看出,培养温度约 30℃时,链霉菌

Z18 产木聚糖酶活性浓度达到最高水平 (720.75 U/mL), 20 和 50 ℃ 时均低于 200 U/mL, 与大多数文献报道的链霉菌最适生长温度相似<sup>[6]</sup>。温度过低菌株生长缓慢, 过高则易衰老, 均不利于产酶。

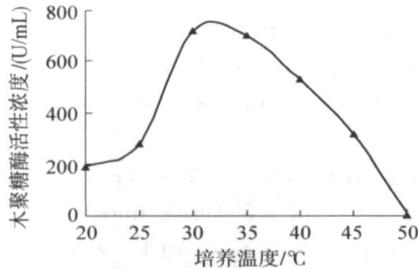


图5 培养温度对链霉菌 Z18 产木聚糖酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature on xylanase production by *Streptomyces* sp. Z18 cultivated in medium containing corncob xylan under pH 5.5

#### 2.4 培养时间对产木聚糖酶的影响

从图 6 可以看出, 自发酵培养第 5 天起菌株产酶水平上升缓慢, 第 7 天达到最高 (755 U/mL)。直到第 8 天产酶水平才开始下降, 这可能是由于蛋白酶影响了木聚糖酶的稳定性。

从图 7 可以看出, 发酵前 2 d 几乎不产酶, 从第 3 天开始酶活性浓度迅速升高, 到第 5 天开始稳定。

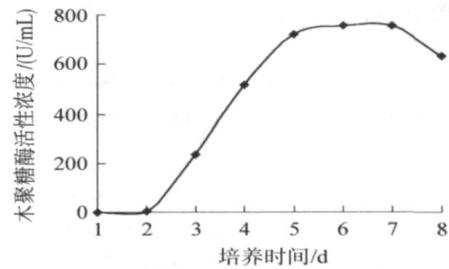
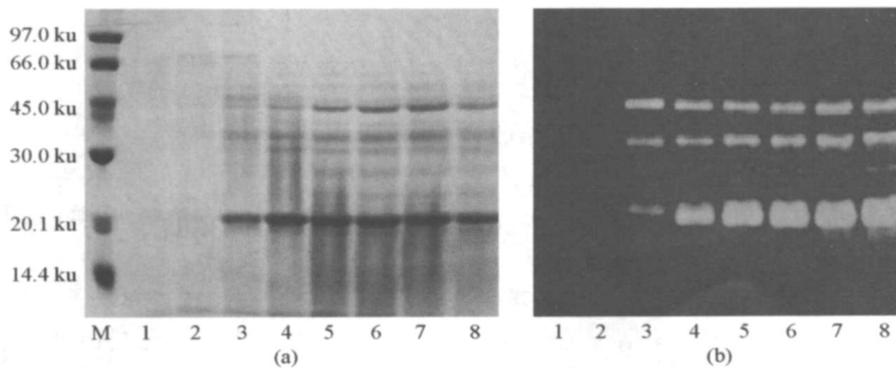


图6 培养时间对链霉菌 Z18 产木聚糖酶的影响

Fig. 6 Time course of xylanase production by *Streptomyces* sp. Z18 cultivated in medium containing corncob xylan under pH 5.5 at 30

链霉菌 Z18 所产 3 种木聚糖酶为最主要的胞外蛋白, 22 ku 木聚糖酶所占胞外蛋白的比率最大, 且随培养时间的延续而增大, 46 ku 木聚糖酶也随时间的延续明显增加。

迄今, 国外报道大多数链霉菌产酶水平不高, 一般在 200 U/mL 左右。Maheswari 等报道 *Streptomyces cuspidosporus* 产木聚糖酶活性浓度为 146 U/mL<sup>[12]</sup>, Beg 等报道 *Streptomyces* sp. QG11-3 产木聚糖酶活性浓度为 203 U/mL<sup>[13]</sup>。本研究中链霉菌 Z18 产木聚糖酶活性浓度高达 755 U/mL, 为目前国内报道链霉菌属的最高产酶水平。



泳道 M 为低分子质量标准蛋白; 泳道 1~8 培养时间分别为 1, 2...8 d

图7 培养时间诱导链霉菌 Z18 所得上清液 SDS-PAGE(a) 及酶谱(b) 分析

Fig. 7 Time course of SDS-PAGE and zymogram analysis of culture supernatant by *Streptomyces* sp. Z18

### 3 结论

玉米芯粉可诱导产木聚糖酶, 最佳碳源为 1.5% 玉米芯水不溶性木聚糖。在最佳碳源、初始 pH 5.5、培养温度 30 ℃ 条件下培养 7 d 后, 木聚糖酶活性浓度达到 755 U/mL。链霉菌 Z18 能够产生 3 种木聚糖酶, 以 22 ku 木聚糖酶为主。

### 参 考 文 献

- [1] Kusakabe I, Kawaguchi M, Yasui T, et al. Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86[J]. J Agr Chem Soc Japan, 1997, 51: 429-437
- [2] Kusakabe I, Yasui T, Kobayashi T. Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-containing natural materials[J]. J Agr Chem Soc Japan, 1976, 50: 199-208
- [3] 孙晓霞, 谢响明, 吴玉英, 等. 白色链霉菌产木聚糖酶

- 规律及其耐热碱性的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(3): 72-75
- [4] 李里特, 丁长河, 江正强, 等. 一株产木聚糖酶链霉菌的鉴定及发酵[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 59-64
- [5] Kusakabe I, Yasui T, Kobayashi T. Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-containing natural materials[J]. J Agr Chem Soc Japan, 1976, 50: 199-208
- [6] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. J Biotechnol, 1992, 23: 257-270
- [7] Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage T4[J]. Nature (London), 1970, 227: 680-685
- [9] Jiang Z Q, Deng W, Li X T, et al. A novel, large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis* E86 [J]. Biotechnol Lett, 2004, 26: 431-436
- [10] Petrosyan P, Luz-Madrigal A, Huitrón C, et al. Characterization of a xylanolytic complex from *Streptomyces* sp. [J]. Biotechnol Lett, 2002, 24: 1473-1476
- [11] Xiong H R, Weymarn N V, Leisola M, et al. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30 [J]. Process Biochem, 2004, 39: 729-733
- [12] Maheswari M U, Chandra T S. Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2000, 16: 257-263
- [13] Beg Q K, Bhushan B, Kapoor M, et al. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG 11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp [J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 27: 459-466

## 科研简讯

### 我校“省部共建功能乳品教育部重点实验室”通过验收

2007年4月11日,我校承担的“省部共建功能乳品教育部重点实验室”通过了教育部科技司、北京市教委组织的验收。验收专家组由江南大学副校长金征宇教授任组长,专家来自北京大学、东北农业大学、北京工商大学、北京林业大学、中国奶业协会和北京食品研究所。

该实验室是2003年11月27日由教育部批准建设的,根据国家乳品科技发展方针,面向国际乳品科技前沿和发展,以乳品基础科学研究、现代乳品生物技术、乳品加工工艺与功能性乳制品开发、乳品加工与包装关键设备4个方向为重点,从事创新性研究与人才培养工作。在近3年的建设与科学研究过程中,该实验室完成了18项国家和省部级科研课题,获省部级以上科技成果6项,在乳品生理生化特性、加工特性、功能因子等方面取得了理论和应用成果。

(科学技术处供稿)