

# 木聚糖酶生产菌黑曲霉的诱变及周期变压发酵

张 怀 袁其朋 王永生 吕龙贤 马润宇\*

(北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

**摘 要:** 木聚糖酶产生菌黑曲霉 Anr-1 经紫外线和硫酸二乙酯(DES)处理后,采用显色平皿法及液体培养筛选,得到一产木聚糖酶活力较高的菌株 Anr-1.15,其产酶能力比 Anr-1 提高 90%。同时研究了周期变压操作对固态发酵过程中黑曲霉产酶的影响。当变压范围为 0~0.15 MPa,选取适当变压周期时,黑曲霉木聚糖酶酶活以干料计高达 3 690 IU·g<sup>-1</sup>,比静止固态发酵高 38%。

**关键词:** 黑曲霉; 木聚糖酶; 诱变; 周期变压

**中图分类号:** TQ 925.9

半纤维素为植物纤维材料的主要组分,约占其干重的 15%~30%,主要成分为木聚糖。木聚糖酶(EC. 3.2.1.8)为一类以内切方式水解木聚糖分子中的-1,4-木糖苷键的酶,水解产物主要为低聚木糖,并伴有少量木糖和阿拉伯糖。低聚木糖为功能性低聚糖类,具有优良的促双歧杆菌功能及良好的耐酸耐热稳定性<sup>[1]</sup>。国内外已报道了不少各种真菌及细菌木聚糖酶的研究成果,如陈惠忠等通过诱变得黑曲霉突变株 Anr-76,木聚糖酶活力提高 3.1 倍<sup>[2]</sup>。吴克等用黑曲霉固态发酵,不仅酶活高而且发酵时间短<sup>[3]</sup>。由于在固态发酵过程中,传质、传热效率低是限制微生物生长和产物形成的主要因素,因而通过气体压力的波动加强空气运动,可使气体得到有效更换,改善传质传热。本文除对木聚糖酶产生菌黑曲霉采用紫外线、硫酸二乙酯(DES)诱变,获得一高活力突变株 Anr-1.15 外,还对黑曲霉进行了固态发酵,初步研究了周期变压操作对产酶的影响。

## 1 实验材料

### 1.1 菌 种

黑曲霉(*Aspergillus niger*),中科院微生物研究所提供。

### 1.2 培养基

木聚糖:以玉米芯为原料制备<sup>[4]</sup>。

斜面培养基:查氏培养基。

营养盐液:NaNO<sub>3</sub> 质量浓度为 4.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 质量浓度为 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 质量浓度为 1 g/L, CaCl<sub>2</sub> 质量浓度为 0.5 g/L。

液体培养基:营养盐液+质量浓度为 3 g/L 木聚糖。

固体培养基:麸皮与玉米芯(质量比为 1:1)+营养盐液,其混合液的质量浓度为 500 g/L。

### 1.3 菌种诱变

紫外线处理:制备黑曲霉孢子悬液 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个/mL,于 15 W 紫外灯下,30 cm 左右距离照射。

DES 诱变:采用体积分数为 5%的 DES 对黑曲霉孢子悬液进行处理,于装有小玻璃珠的小三角瓶内振荡处理 2~3 h。

筛选经初筛和复筛。初筛:采用显色平皿法<sup>[5]</sup>,平皿中加入质量分数为 0.1%的胆酸钠,根据菌株所产木聚糖酶水解木聚糖形成透明圈大小判断该菌产酶能力。复筛:250 mL 三角瓶中装 50 mL 液体培养基,接种后于 28 ℃ 振荡培养 96 h 测木聚糖酶酶活。

### 1.4 周期变压固态发酵

实验设备:800 L 浅盘式周期变压固态发酵系统,中科院化工冶金研究所提供。

变压操作:该系统可改变发酵时空气压力,进行不同变压范围和周期的发酵实验。空气周期性变化由进出口阀控制,进出气口预先关闭,升压时,进气口开启,达一定压力后,关闭进气口;降压时,出气口开启,空气靠自身压力排出,至一定压力,关闭出气口。此为一个变压周期。

1.5 分析测试方法

粗酶液制备:将黑曲霉液体培养 96 h 后离心得上清液即为粗酶液。或将黑曲霉固体发酵曲加 5 倍体积水,30 ℃ 浸提 3 h,离心得上清液即为粗酶液。

木聚糖酶活力测定:取 0.1 mL 适当稀释的酶液,加 1 mL 浓度为 0.2 mol L<sup>-1</sup>,pH 为 4.8 的醋酸缓冲液配制的质量浓度为 1 g/L 木聚糖(Sigma oat xylan)溶液,50 ℃ 水浴 10 min 后,以 DNS 法测定还原糖。酶活单位定义为:每分钟水解木聚糖产生 1 μmol 木糖的酶量为一个酶活单位。

2 结果与讨论

2.1 紫外线诱变

将经紫外线不同照射时间的孢子悬液稀释涂平皿,28 ℃ 培养 2 d 后取出,进行单菌落计数。表 1 为不同紫外线照射时间对菌体致死率的影响。

表 1 不同的照射时间对菌体致死率的影响

Table 1 The influence of irradiation time of UV on killing rate

照射时间 <i>t</i> / min	菌落数/个 (稀释倍数 10 <sup>4</sup> )	菌落数/个 (稀释倍数 10 <sup>5</sup> )
5	多	多
8	多	多
10	178	81
12	80	46
15	1	2

由表 1 可见,随照射时间增加,致死率上升,对黑曲霉孢子致死合适的照射时间为 12 min,以后的处理时间均为 12 min。将诱变后的菌株用显色平皿初筛,其中加质量分数为 0.1 %的胆酸钠抑制菌落生长,菌落直径在经过 3~4 d 培养后也不会超过 1.5 cm。

将用平皿法测得透明圈较大的菌株进行摇瓶液体复筛,以出发菌株 Anr-1 为对照,部分结果如表 2 所示。经紫外线诱变后部分菌落发生色素变异,生长过程中分泌黄色色素,影响酶解透明圈的辨别;同时生长减缓,产孢子能力减弱,孢子颜色由黑色变得有些发灰。根据酶活测定结果,菌株 Anr-1.15 酶活最高,为对照的 1.9 倍。

2.2 DES 诱变

DES 属于烷化剂,DES 能在较小的致死率下得到较高的诱变率。以 Anr-1.15 为出发菌株,经上述

表 2 紫外线诱变结果

Table 2 The result of mutation by UV

菌号	酶活 /(IU·mL <sup>-1</sup> )	菌号	酶活 /(IU·mL <sup>-1</sup> )	菌号	酶活 /(IU·mL <sup>-1</sup> )
Anr-1	110.7	Anr-1.7	132.8	Anr-1.14	133.8
Anr-1.1	120.1	Anr-1.8	—	Anr-1.15	208.2
Anr-1.2	108.7	Anr-1.9	126.9	Anr-1.16	121.9
Anr-1.3	—	Anr-1.10	141.9	Anr-1.17	83.3
Anr-1.4	112.7	Anr-1.11	—	Anr-1.18	137.6
Anr-1.5	116.0	Anr-1.12	—	Anr-1.19	—
Anr-1.6	110.7	Anr-1.13	—	Anr-1.20	123.7

注:“—”表示酶活测定时酶活明显低下,吸光度过低,停止测定。

处理后采用显色平皿法测定,挑出 50 株进行复筛。经液体培养,其中有 5 株酶活较高,结果列于表 3。

表 3 DES 诱变结果

Table 3 The result of mutation by DES

菌号	酶活/(IU·mL <sup>-1</sup> )
Anr-1.15(对照)	206.3
Anr-1.15.1	180.1
Anr-1.15.2	213.7
Anr-1.15.3	201.4
Anr-1.15.4	223.6
Anr-1.15.5	225.7

从诱变结果看,酶活没有明显的提高,诱变结果不明显,可能由于黑曲霉对 DES 不如对紫外线诱变敏感。

2.3 固态发酵

2.3.1 常压静态发酵与变压发酵的比较 黑曲霉常压与变压固体发酵随时间的产酶曲线如图 1 所示。变压操作条件:空气压力变化范围为 0~0.10 MPa;变压周期为 30 min。从图中可以看出,黑曲霉在变压操作下产酶高峰期提前,发酵周期由常压条件下的 72 h 缩短为 64 h,木聚糖酶活明显高于常压发酵,达到 3 300 IU·g<sup>-1</sup>。从外观上看,常压静止发酵鲜曲结构密实,表面菌丝较内部多,而周期变压发酵鲜曲结构疏松,基质内部和表面均布满大量菌丝,生长情况非常好。由此可见变压操作对提高酶产率有显著作用。

2.3.2 不同压力范围对产酶的影响 在固体发酵时,采用不同的变压范围对木聚糖酶活力影响见表 4。常压培养时 72 h 测酶活,变压操作时 64 h 测酶活。从表中可以看出,开始随空气压力变化范围的

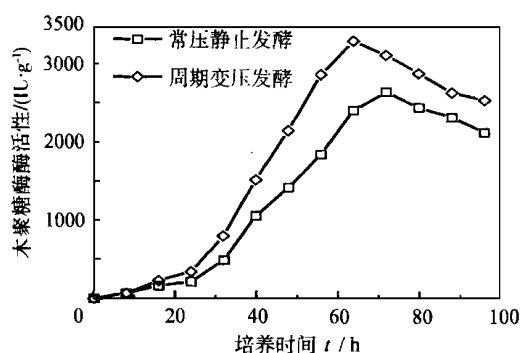


图1 常压与变压固体发酵的产酶曲线

Fig. 1 Xylanase activities during the course of solid state fermentation and periodic pressure solid state fermentation

变大,木聚糖酶活力提高,当变压范围过大时,产酶量呈下降趋势。这表明,随压力变化范围由小变大,基质内部气体压缩膨胀加剧,颗粒内部的空气得到更有效的更换,加强了对  $O_2$ 、 $CO_2$  和热量的传递,对黑曲霉的生长和产酶有利。但压力变化范围进一步加大,基质内的空气运动过于剧烈,对微生物生长和产物形成产生不利影响。对于黑曲霉产木聚糖酶来说,变压范围为  $0 \sim 0.10$  MPa,  $0 \sim 0.15$  MPa 较为合适。

表4 压力范围对木聚糖酶产率的影响

Table 4 The influence of pressure amplitude on xylanase yields

变压范围/MPa	木聚糖酶活/(IU·g <sup>-1</sup> )
0~0	2 670
0~0.05	3 012
0~0.10	3 289
0~0.15	3 324
0~0.20	3 145
0~0.25	2 756

**2.3.3 变压周期的选择** 变压周期是影响基质中  $O_2$ 、 $CO_2$  和热传递的重要因素。对  $0 \sim 0.10$  MPa,  $0 \sim 0.15$  MPa 变压范围采用以下 4 种变压形式进行比较:

- 3 次/h;
- 6 次/h;
- 发酵周期  $0 \sim 24$  h, 1 次/h;  $24 \sim 64$  h, 20 min 变压 1 次;
- 发酵  $0 \sim 4$  h, 高频变压 6 次/h;  $4 \sim 24$  h, 1

次/h;  $24 \sim 64$  h, 20 min 变压 1 次。

结果如图 2 所示。

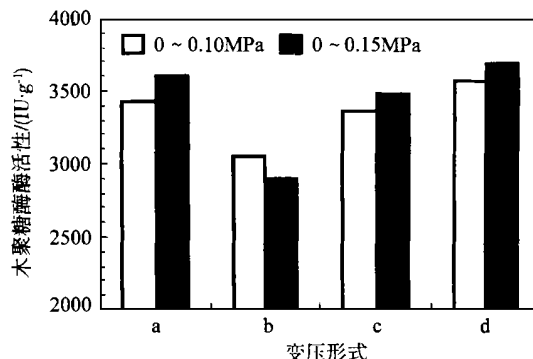


图2 不同变压形式对产酶的影响

Fig. 2 Effect of different air pressure oscillation on xylanase activities

从图 2 中 a、b 两项可见,如果在发酵过程中采用高频变压,产酶效果反倒不好,可能与采用较大的变压范围原因一致,即过于剧烈的气体运动反而会影响微生物生长及产物形成。还可看出,在发酵的不同阶段采取不同的变压频率可达到很好效果,在固体培养刚开始时,基质中含水量较大,空气流通较困难,可是以较高频率的压力变化促进通气;在发酵开始不久,黑曲霉菌体量较少,耗氧及产气产热量均不大,施以较低频率的压力变化即可达到良好的通气散热效果;到培养 1 d 以后,菌丝已达到一定数量且正处于对数生长期和产物形成期,耗氧和产热产气激增,此时提高变压频率以满足传热传质要求,起到良好作用,其中木聚糖酶活力高达  $3 690$  IU·g<sup>-1</sup>,比未采用变压操作的发酵提高 38%。

### 3 结 论

(1) 诱变黑曲霉时,采用显色平皿法初筛,形成的透明圈不十分清晰,但能反应出菌株产酶能力大小,减轻了筛选工作量。

(2) 在固体发酵中,搅拌和强制通风可基本上使颗粒间空气得到定期更换,但颗粒内部的气体不能有效更换,且搅拌对菌丝体损伤极大。而周期变压操作能解决这些问题。通过周期性空气压力波动,颗粒间及内部气体均得到有效更换,能为菌丝体生长提供充足氧,及时排出产生的代谢热及二氧化碳,使固体培养基保持疏松,避免了对菌丝体的剪切损伤,且疏松的基质又有利于酶及可溶性物质的扩散、渗透。

## 参 考 文 献

- [1] 袁其朋,马润宇,张华军. 纳米过滤在低聚木糖生产过程的应用. 无锡轻工业大学学报,1999,18(5):159~161
- [2] 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. 微生物学报,1990,30(5):351~357
- [3] 蔡敬明,吴克,张洁,等. 黑曲霉 A3 木聚糖酶固体发酵研究. 工业微生物,1997,27(2):1~4
- [4] Pellerin P, Gosselin M, Lepoutre J, et al. Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. Enzyme Microb Technol, 1991,13:617~621
- [5] Breccia J D, Catro G R, Baigori M D, et al. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78:469~472

## Mutation of aspergillus niger producing xylanase and its periodic pressure fermentation

ZHANG Huai YUAN Qi-peng WANG Yong-sheng LU Long-xian MA Run-yu

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** A mutant strain An-1.15 was obtained with the screening of a colour plate method and liquid state fermentation after *Aspergillus niger* An-1 producing xylanase was treated with UV and DES. The xylanase of An-1.15 increased by 90%. The influence of periodic air pressure oscillation on xylanase activities was investigated during the course of solid state fermentation of An-1.15. With the air pressure amplitude of 0~0.15 MPa and proper oscillation period, the xylanase activity was as high as 3 690 IU/g dry medium, which was 38% more than xylanase activity of static solid state fermentation.

**Key words:** aspergillus niger; xylanase; mutation; periodic air pressure oscillation

(上接第 13 页)

## Screening of microbe producing flocculant and characteristics of microbial flocculant

YE Jing-jing<sup>1)</sup> TAN Tian-wei<sup>2)</sup>

(1) Beijing Institute of Chemical Industry, Beijing 100013;

2) College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** 752 strains were isolated and purified from soil or mud collected from natural and artificial environment. Through investigating the flocculating abilities for kaolin clay of culture broth, strain 49<sup>#</sup> (BD-4), which had the highest flocculating activity among them, was finally picked out. The fermentation conditions, extraction conditions and the flocculating influence factors were studied. The chemical properties and composition of the culture extractive were also analyzed.

**Key words:** flocculate; bioflocculant; screening; wastewater treatment