

里氏木霉和黑曲霉产酸性木聚糖酶及酶学特性比较* Comparative Analysis of the Characterization of Crude Acidic Xylanases from two Strains between *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*

吴仁智^{1,2}, 黄俊¹, 芦志龙^{1,2}, 陈英^{1,2}, 陆琦¹, 陈小玲¹, 陈东^{1,2}, 黄日波^{1,2**}
WU Renzhi^{1,2}, HUANG Jun¹, LU Zhilong^{1,2}, CHEN Ying^{1,2}, LU Qi¹,
CHEN Xiaoling¹, CHEN Dong^{1,2}, HUANG Ribo^{1,2}

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学, 生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】对黑曲霉和里氏木霉产酸性木聚糖酶的性能及所产粗酶的酶学特性进行分析比较, 尤其是考察 pH 值为 4 时木聚糖酶酶活力及稳定性, 从而确定潜在的较为理想的酸性木聚糖酶。【方法】将里氏木霉和黑曲霉接种至培养基进行产酶培养, 比较分析两者的酸性木聚糖酶、酸性木糖苷酶的酶活力及酶学特性。【结果】黑曲霉酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力最高分别达 (52.36 ± 2.61) U/mL 和 (0.57 ± 0.01) U/mL, 酸性木聚糖酶最适温度和 pH 值分别为 55°C 、5.0, 酸性木糖苷酶最适温度和 pH 值分别为 75°C 、5.0; 里氏木霉酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力最高分别达 (10.12 ± 0.95) U/mL 和 (0.32 ± 0.05) U/mL, 酸性木聚糖酶最适温度和 pH 值分别为 65°C 、6.5, 酸性木糖苷酶最适温度和 pH 值分别为 65°C 、4.5。黑曲霉和里氏木霉的酸性木聚糖酶兼有酸性 CMCase 酶活力, 分别为 (5.26 ± 0.21) U/mL、 (1.72 ± 0.21) U/mL。【结论】黑曲霉所产酸性木聚糖酶明显比里氏木霉的更优良, 是潜在的较为理想的酸性木聚糖酶。

关键词: 黑曲霉 里氏木霉 酸性木聚糖酶 酶学特性
中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2017)01-0112-08

收稿日期: 2017-01-19

作者简介: 吴仁智(1984—), 男, 在读博士生, 助理研究员, 主要从事甘蔗糖蜜酒精、纤维素乙醇等生物质能源方向的研究。

* 国家“863”项目(2013AA050701), 国家国际合作项目(2011DFA61910), 国家科技计划课题子任务(2012AA022106), 广西科技合作与交流计划(桂科合 2015DD23055), 广西重点研发计划(桂科 AB16380024), 广西科技攻关/首席科技资金(1517-07), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW04), 八桂学者建设工程专项经费项目, 广西生物质产业化工程院建设(桂科能 12237022)和广西生物炼制重点实验室项目(13-051-08)资助。

** 通信作者: 黄日波(1958—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物与酶学研究, E-mail: rbhuang@gxas.cn.

Abstract: 【Objective】To identify potential ideal acidic xylanase, the characterizations of crude acidic xylanase from two strains between *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* are analyzed and compared, especially when the xylanase activity and stability are determined at pH 4. 【Methods】These two strains mentioned above are inoculated into culture medium for xylanase production, and the enzyme activity and characterizations of crude acid xylanase are analyzed. 【Results】The activities of acidic xylanase and xylosidase from *Aspergillus niger* are up to $(52.36$

± 2.61) U/mL and (0.57 ± 0.01) U/mL respectively, and the optimum temperature and pH value of acidic xylanase from this strain are 55°C and 5.0, while the optimum temperature and pH value of acidic xylosidase from this strain are 75°C and 5.0, respectively. With construct to *Trichoderma reesei*, they are (10.12 ± 0.95) U/mL and (0.32 ± 0.05) U/mL, 65°C and 6.5, 65°C and 4.5, correspondingly. In addition, both of the acidic xylanases produced by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* have acidic CMCase activity, of which *Aspergillus niger* is (5.26 ± 0.21) U/mL and *Trichoderma reesei* is (1.72 ± 0.21) U/mL, respectively.

【Conclusion】The acidic xylanase produced by *Aspergillus niger* is potential ideal acidic xylanase, which is better than the one produced by *Trichoderma reesei*.

Key words: *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, acidic xylanase, enzyme properties

0 引言

【研究意义】随着煤、石油、天然气等化石燃料日益枯竭,人类寻找可替代能源或者开发可再生能源迫在眉睫。生物质能源作为一种可再生能源,具有原料来源广泛、价格低廉、低碳环保、绿色清洁可循环使用等一系列的优势^[1],已成为当前世界各国研究的热点。其原料来源之一——木质纤维素类物质,是世界上最为丰富的可再生资源,其主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[2]。木聚糖是半纤维素重要组成部分,其含量仅次于纤维素,是自然界中第二大丰富的多聚糖,占 20%~30%^[3]。木聚糖是高聚物,分子量庞大,须先降解成小分子的木寡糖和木糖才能被有效地利用。降解方法有传统的化学法和生物酶催化水解法。生物酶催化水解法是采用木聚糖酶降解木聚糖,相较于化学法具有明显的优势,表现在更高效的转化速率、无腐蚀性及环保等方面^[4]。木聚糖酶是可以将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的一组酶的总称,包括 β -1,4-内切酶($1,4\text{-}\beta\text{-D-xylan xylanohydrolase}$, EC 3.2.1.8)、 β -木糖苷酶($\beta\text{-D-xylosidase}$, EC 3.2.1.37)和支链酶如 $\alpha\text{-L-呋喃阿拉伯糖苷酶}$ (EC 3.2.1.55)等^[5],而降解木聚糖最关键的是 β -1,4-内切酶和 β -木糖苷酶^[6]。通常所说的木聚糖酶是指 β -1,4-内切酶,它以内切方式水解木聚糖分子中的 β -1,4-木糖苷键,其水解产物主要是木二糖和木寡糖。**【前人研究进展】**国外对木聚糖酶的研究比较早,早在 1955 年 Sørensen^[7]就发现存在于土壤和牛瘤胃中的木聚糖酶。目前,产木聚糖酶的菌株有黑曲霉 *Aspergillus niger*^[8-10]、里氏木霉 *Trichoderma reesei*^[11]、链霉菌 *Streptomyces* sp. Ab106^[12]、高温放线菌 *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C^[13]、节图霉属 *Arthrographis* sp.^[14]、微紫青霉菌 *Penicillium janthinellum*^[15]等。木聚糖酶广泛应用于工业、食品、养殖、造纸、生物医学等方面^[3,16-18],自然界中微生物来源的木聚糖酶绝大多数属于碱性

木聚糖酶,国内外对碱性木聚糖酶早已实现商业化生产;而国内较早进行酸性木聚糖研究的是 1990 年山东大学微生物研究所的陈惠忠等^[19],一般集中在产酶微生物选育、酶学性质研究、酶改造等^[20]。近年来随着纤维素乙醇日益成为研究的热点和难点问题^[21-22],开发高效的工业酸性木聚糖酶(常温 30~37°C、pH 值在 4.0 左右等酸性条件下仍然保持较高酶活性)已成为一个重要研究方向,目的是利用酸性木聚糖酶将富含木聚糖的半纤维素组分降解为木糖等产物供酵母(如树干毕赤酵母)进行酒精发酵^[23],从而为实现纤维素乙醇低成本清洁生产打下基础。**【本研究切入点】**在已有菌种基础上,对黑曲霉和里氏木霉产酸性木聚糖酶的性能及所产粗酶的酶学特性进行分析比较。**【拟解决的关键问题】**考察两种菌所产的酸性木聚糖酶在 pH 值为 4 时的酶活及稳定性,从而确定潜在的较为理想的酸性木聚糖酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

桦木木聚糖(Beechwood xylan)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自 Sigma,桦木木聚糖(Birchwood xylan)购自上海瀚鸿化工,对硝基苯基- β -D-木糖苷(pNPX)购自上海梯希爱,Bradford 蛋白定量试剂盒购自上海捷瑞,其他为国产分析纯试剂。

1.1.2 菌种

黑曲霉 *Aspergillus niger* CICC40616,里氏木霉 *Trichoderma reesei* CICC40360。

1.1.3 培养基

产酶培养基(g/L):桦木或桦木木聚糖 10,蛋白胨 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CaCl_2 0.2,调节 pH 值至 4.0。

菌种活化或保藏培养基(PDA, g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20, pH 值自然。

1.2 方法

1.2.1 产酶情况比较

将菌种于 PDA 培养基中培养活化 3 次后,接种到不同的产酶培养基中(分别含有桦木木聚糖和桦木木聚糖)进行培养,培养 7 d,每天取样测酶活和蛋白含量。

1.2.2 酶活力测定方法

(1)木聚糖酶^[24]

取发酵液,4℃、4 000 r/min×15 min 条件下离心,取上清用 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)适当稀释成酶液;将 1.8 mL 1%(W/V)木聚糖底物(50℃水浴预热)加入 0.2 mL 酶液混匀后,50℃水浴 5 min,然后加入 3 mL DNS 终止反应,并迅速置于沸水浴显色 5 min,冰水冷却,测定 OD_{520} 。1%(W/V)木聚糖底物的配制方法如下:用 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)配置。1 个酶活力单位(IU)是指在特定反应条件下,在 1 min 内能转化 1 μ mol 底物的酶量。

(2)木糖苷酶^[25]

取发酵液,4℃、4 000 r/min×15 min 条件下离心,取上清即酶液 20 μ L,然后加入 270 μ L 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)、5 μ L 20 mmol/L pNPX 底物,混匀后于 50℃水浴反应 10 min,加 1.5 mL 1 mol/L $NaHCO_3$ 终止反应,测定 OD_{400} 。1 个酶活力单位(IU)是指在特定反应条件下,在 1 min 内能转化 1 μ mol 底物的酶量。

(3)纤维素酶(CMC_{Case} 酶活力)

方法同木聚糖酶酶活测定方法,但底物是 1%(W/V)羧甲基纤维素钠,测定 OD_{540} ,测定酸性(pH 值为 4.0)条件下的 CMC_{Case} 活力。1 个酶活力单位(IU)是指在特定反应条件下,在 1 min 内能转化 1 μ mol 底物的酶量。

1.2.3 蛋白含量测定

用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定,样品测定的体积均为 20 μ L,操作按说明书进行。

1.2.4 酶学性质

(1)酶的最适温度及热稳定性

在不同温度(20~90℃)下于 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)中进行酶促反应,测定酶活力从而确定酶的最适温度。

在不同温度下分别保温 5~30 min,经冰水冷却后,于 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)中进行酶促反应,酶促反应温度均为 50℃,测定酶活力从而研究酶的热稳定性。

(2)酶最适 pH 值及稳定性

酶液经稀释后,在不同 pH 值条件下于 50℃水浴下进行酶促反应以测定最适 pH 值。所用缓冲液为 pH 值为 2.10~8.50 的 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,pH 值为 9.00~12.00 的 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液。

酶液在不同 pH 值(2.10~12.00)条件下 4℃处理 24 h,经 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 4.0)适当稀释后测定酶活力以研究酶的 pH 稳定性。

2 结果与分析

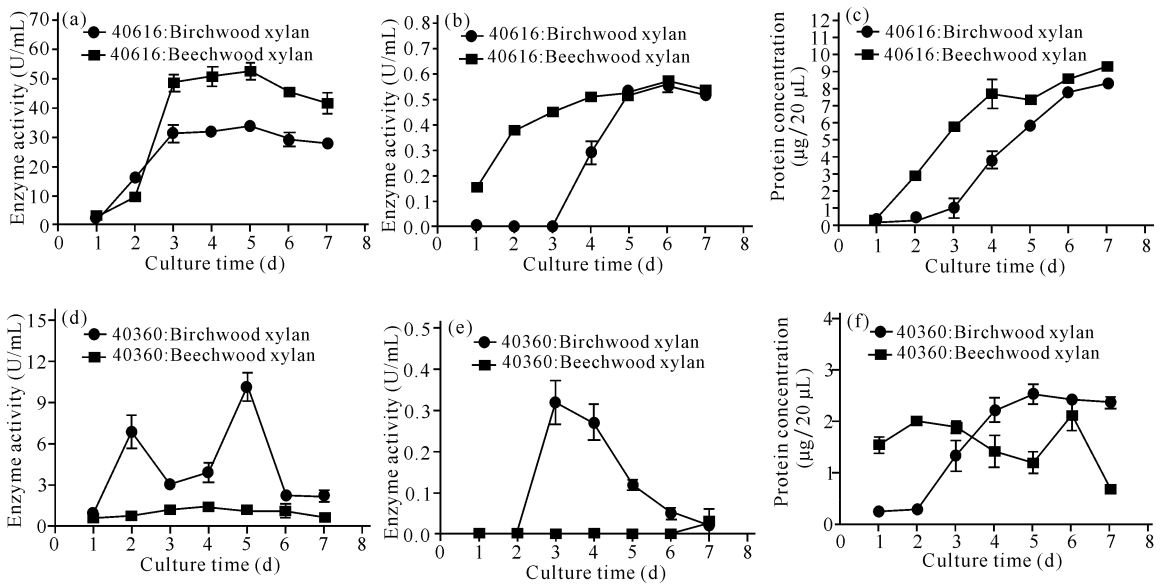
2.1 产酶情况比较

利用桦木木聚糖和桦木木聚糖为底物时,黑曲霉的酸性木聚糖酶酶活力 5 d 时均达到最高,分别为(52.36±2.61)U/mL、(33.59±0.28)U/mL;酸性木糖苷酶酶活力 6 d 均达到最高,分别为(0.57±0.01)U/mL、(0.55±0.02)U/mL;蛋白含量均逐渐增多,7 d 均达到最高,分别为(9.32±0.17) μ g/20 μ L、(8.34±0.06) μ g/20 μ L,可以看出桦木木聚糖比桦木木聚糖更有利于黑曲霉产酶(图 1a~c)。而对于里氏木霉来说(图 1d~f),情况则有所不同:分别以桦木木聚糖和桦木木聚糖为底物时,产酸性木聚糖酶酶活力 5 d 或 4 d 达到最高,分别为(10.12±0.95)U/mL、(1.41±0.16)U/mL;利用桦木木聚糖所产的酸性木糖苷酶酶活力 3 d 达到最高,为(0.32±0.05)U/mL,但利用桦木木聚糖所产酶液几乎检测不到酸性木糖苷酶酶活力;蛋白含量均不高,最高分别为(2.52±0.16) μ g/20 μ L、(2.11±0.29) μ g/20 μ L,均低于黑曲霉所产的酶蛋白(图 1c、f)。由此可知,两种木聚糖作为诱导物,黑曲霉所产的酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力均比里氏木霉的高。此外,两个菌株所产的酸性木聚糖酶兼有酸性 CM-Case 酶活力,黑曲霉的为(5.26±0.21)U/mL,里氏木霉的为(1.72±0.21)U/mL,前者的酶活力是后者的 3 倍。综上所述,黑曲霉产酶能力比里氏木霉的强。

2.2 酶学性质比较

2.2.1 最适温度及热稳定性

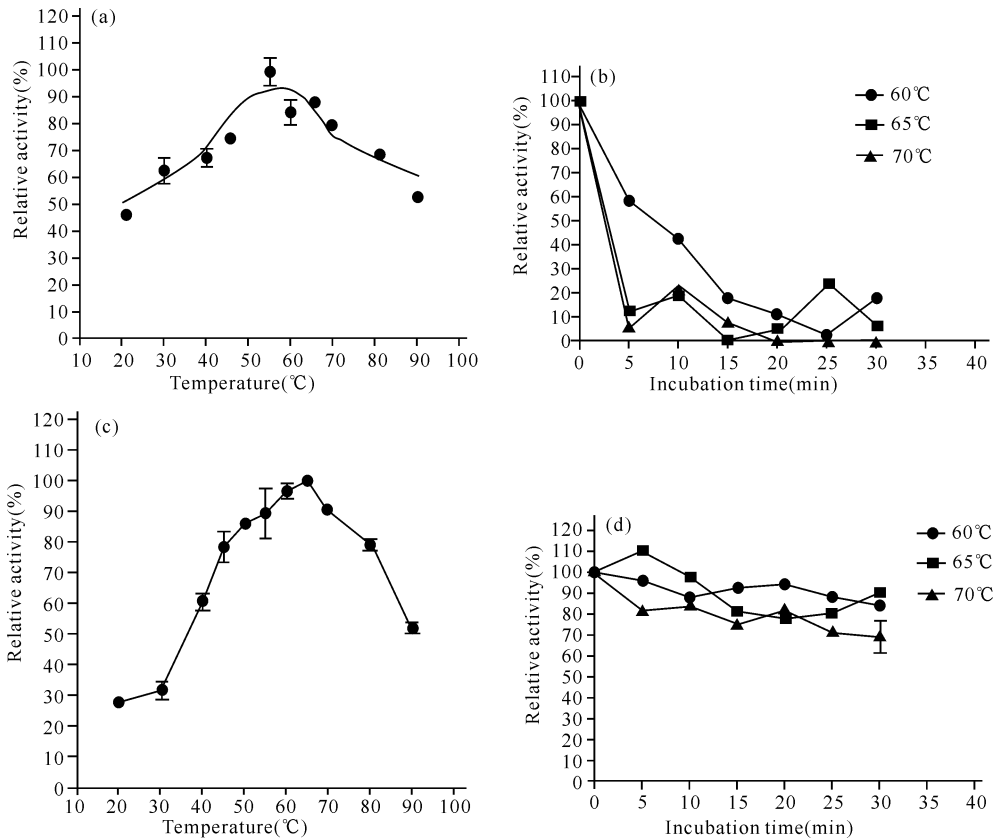
选取酶活力最强时的上清液作为原酶液,分别进行最适温度和热稳定性实验(图 2~3)。黑曲霉和里氏木霉所产的酸性木聚糖酶最适温度分别为 55℃和 65℃(图 2a、c),前者的热稳定性比后者的差,前者在高于最适温度 5℃(即 60℃)条件下保温 5 min 或 10 min,酶活力分别下降近 40%和 60%;后者在高于最



(a,d)木聚糖酶曲线,(b,e)木糖苷酶曲线,(c,f)蛋白曲线
(a,d)Curve of xylanase,(b,e)Curve of xylosidase,(c,f)Curve of protein

图1 黑曲霉 40616 和里氏木霉 40360 的产酶曲线

Fig. 1 Curve of xylanases of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*



(a,b)黑曲霉,(c,d)里氏木霉,(a,c)最适温度,(b,d)热稳定性

(a,b) *Aspergillus niger*, (c,d) *Trichoderma reesei*, (a,c)Optimum temperature,(b,d)Thermal stability

图2 酸性木聚糖酶的最适温度及热稳定性

Fig. 2 Optimum temperature and thermal stability of acidic xylanase

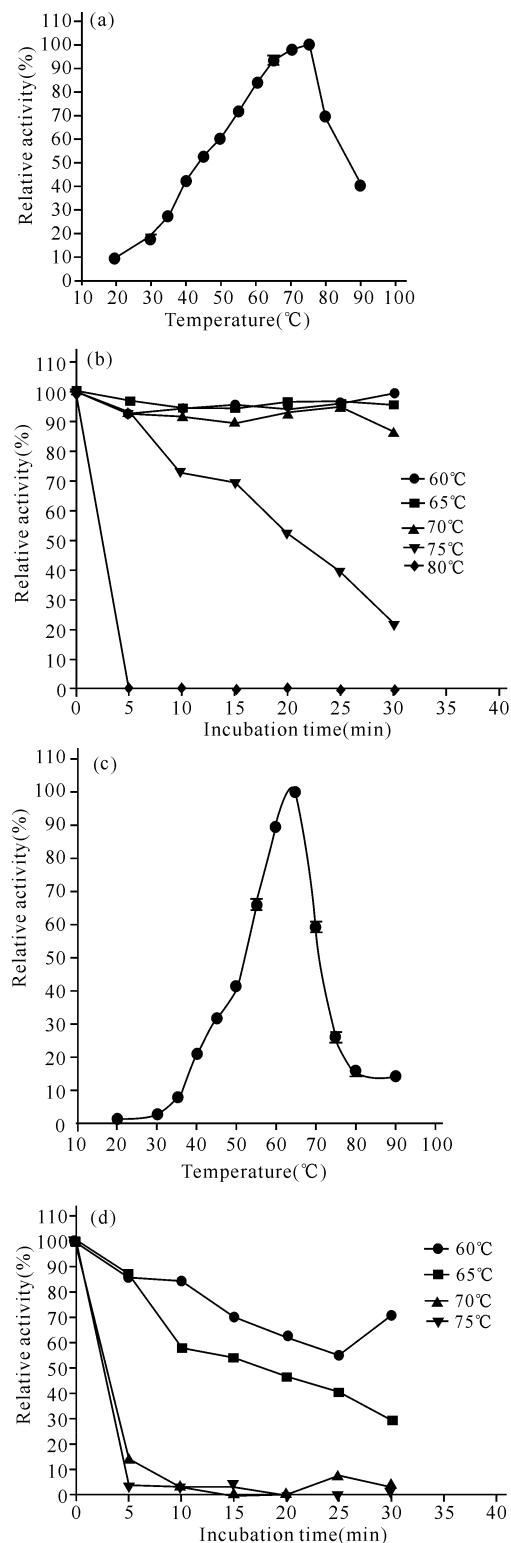
适温度 5°C(即 70°C)条件下保温 30 min,酶活力仅下降不到 30%(图 2b,d)。值得一提的是黑曲霉的酸性木聚糖酶在 30~40°C 条件下,酶活力能达到最适温度的 60%以上,这对于常温开发利用黑曲霉木聚糖

酶非常有利。黑曲霉和里氏木霉所产的酸性木糖苷酶最适温度分别为 75°C 和 65°C(图 3a,c),两者在高于最适温度 5°C(即 80°C 或 70°C)条件下保温 5 min,检测到的酶活力很低(图 3b,d),说明两者的热稳定

性均比较差。此外,在 30~40℃条件下,两者的酸性木糖苷酶活力不到最适温度的 30%。

2.2.2 最适 pH 值及稳定性

黑曲霉和里氏木霉所产的酸性木聚糖酶最适 pH 值分别为 5.0 和 6.5(图 4a、b),前者在酸性条件下(3.0~5.0)稳定性比后者的略好,但在中性和碱性条件下后者的稳定性比前者略好;两者在 pH 值为 4.0 条件下,酶活力仍能保持最适 pH 值条件下 30% 的活性。黑曲霉和里氏木霉所产的酸性木糖苷酶最适 pH 值分别为 5.0 和 4.5(图 5a、b),两者在酸性条件下(2.1~6.0)稳定性较好,在 pH 值为 2.1 条件下酶活力均能达到 40% 以上,黑曲霉的酸性木糖苷酶更是较为明显达到 50% 以上;但两者在中性和碱性条件下酶活力很低,尤其是当 pH 值达到 8.0 以上,几乎检测不到酶活力。由此可知,黑曲霉和里氏木霉所产的酸性木糖苷酶均比自身所产的酸性木聚糖酶更能耐受酸性条件。



(a、b)黑曲霉,(c、d)里氏木霉,(a、c)最适温度,(b、d)热稳定性

(a、b) *Aspergillus niger*, (c、d) *Trichoderma reesei*, (a、c) Optimum temperature, (b、d) Thermal stability

图3 酸性木糖苷酶的最适温度及热稳定性

Fig. 3 Optimum temperature and thermal stability of acidic xylosidase

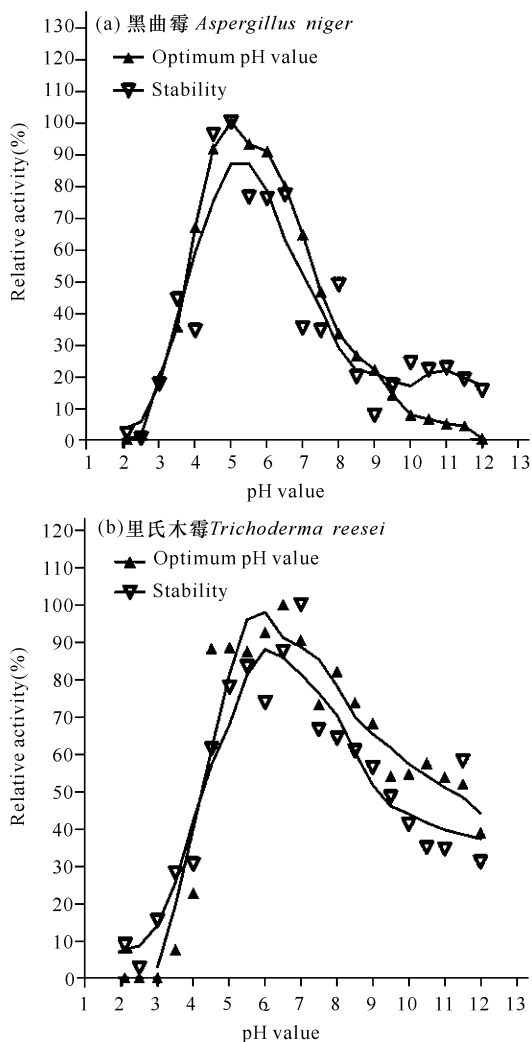
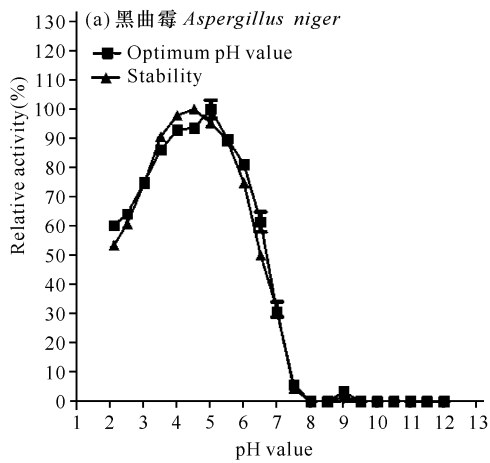


图4 酸性木聚糖酶的最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig. 4 Optimum pH value and stability of acidic xylosidase



mL 和 4.5 U/mL,活力分别提高 2 倍和 1 倍。陈红歌等^[27]选育的产酸性木聚糖酶微生物为黑曲霉 *Aspergillus niger* 149 菌株,利用麸皮半纤维素 (4%, W/V), 28~30℃ 培养 60 h, 酶活力最高可达 375.2 U/mL。王金华^[28]将 *Aspergillus niger* N402 的酸性木聚糖酶基因实现在 *Pichia pastoris* 表达,重组菌的酶活达到 453.6 U/mL,是原始出发菌株 N402(40.2 U/mL)的 11.3 倍。为此,我们需要借鉴别人成功的经验,对已有菌种进行改造或者从自然界选育产酶微生物,从而构建出性能更优良的酸性木聚糖酶。

3.2 酶学性质

木聚糖酶能将木聚糖降解成木寡糖和木二糖,也有少量木糖和阿拉伯糖。木聚糖酶发挥作用受到外界条件的影响,如温度、pH 值等。Frederick 等^[29]报道的黑曲霉木聚糖酶最适温度为 45℃,显然比本研究的黑曲霉 CICC40616 的低 10℃,而前者的最适 pH 值为 5.5,跟 CICC40616 的差不多。Tenkanen 等^[30]报道的里氏木霉木聚糖酶最适温度为 45/40℃,明显比本研究的里氏木霉 CICC40360 的低 20℃ 左右,且前者的最适 pH 值(5.5)也比后者的低一些,并在 pH 值 3~8.5 条件下稳定。

4 结论

对黑曲霉和里氏木霉产酸性木聚糖酶的性能及所产粗酶的酶学特性进行分析比较,尤其是考察 pH 值为 4 的条件下木聚糖酶酶活力及稳定性,结果发现黑曲霉利用桦木木聚糖比桦木木聚糖更有利于产酶,而对于里氏木霉,则相反,即利用桦木木聚糖比桦木木聚糖更有利于产酶。此外,利用桦木木聚糖,黑曲霉所产的酶蛋白含量明显高于里氏木霉的,而利用桦木木聚糖,黑曲霉和里氏木霉所产的酶蛋白含量相差不大。黑曲霉所产酸性木聚糖酶兼有酸性 CMCase 酶活力,均优于里氏木霉的,这些对于有效降解木聚糖是非常有利的,是潜在的较为理想的酸性木聚糖酶,可以考虑将其作为改造对象进行改良。但黑曲霉的酸性木聚糖酶酶活力显然达不到工业化要求,亟待我们改造或者从自然界选育产酸性木聚糖酶性能更优良的微生物。

参考文献:

- [1] FARGIONE J, HILL J, TILMAN D, et al. Land clearing and the biofuel carbon debt [J]. *Science*, 2008, 319 (5867):1235-1238.
- [2] BIELY P. Enzymological aspects of the production of

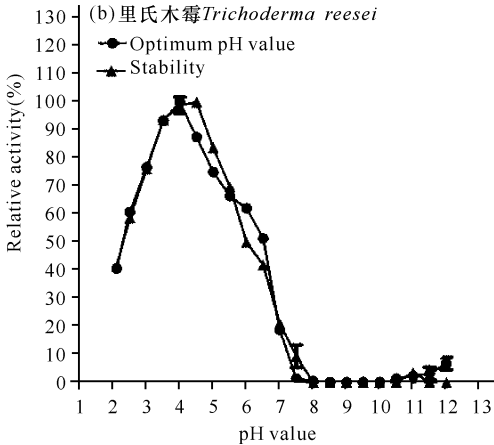


图 5 酸性木糖苷酶的最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig. 5 Optimum pH value and stability of acidic xylosidase

3 讨论

3.1 产酸性木聚糖酶能力

微生物来源的木聚糖酶很多,少部分是来自细菌的,如高温放线菌 *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C^[13]、链霉菌 *Streptomyces* sp. Ab106^[12]、莫海威芽孢杆菌 *Bacillus mojavensis*^[26] 等,但大部分是来自真菌的,如黑曲霉 *Aspergillus niger*^[8-10]、里氏木霉 *Trichoderma reesei*^[11]、微紫青霉菌 *Penicillium janthinellum*^[15] 等。本研究基于已有菌种的基础上,对黑曲霉和里氏木霉产酸性木聚糖酶的性能进行比较分析,从结果可知,黑曲霉的酸性木聚糖酶酶活力明显优于里氏木霉的,但黑曲霉酸性木聚糖酶酶活力不高,明显达不到工业化要求。陈惠忠等^[19]从土壤选育出黑曲霉 C-2 菌株,该菌株发酵 2% (W/V) 半纤维素 4 d,木聚糖酶和木糖苷酶活力分别为 112.3 U/mL 和 2.3 U/mL,而通过紫外线和甲基磺酸乙酯诱变 C-2 菌株获得一突变株 An-76,该突变菌株木聚糖酶和木糖苷酶的活力分别为 353.6 U/

广西科学 2017 年 2 月 第 24 卷第 1 期

- microbial hemicellulases[M]//COUGHLAN M P,HAZLEWOOD G P (eds.). Hemicelluloses and hemicellulases. London:Portland Press,1993:29-51.
- [3] PRADE R A. Xylanases:From biology to biotechnology [J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1995,13(1):101-132.
- [4] BISARIA V S,GHOSE T K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products[J]. Enzyme and Microbial Technology,1981,3(2):90-104.
- [5] BIELY P. Microbial xylanolytic systems[J]. Trends in Biotechnology,1985,3(11):286-290.
- [6] SUBRAMANIYAN S,PREMA P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application[J]. Critical Reviews in Biotechnology,2002,22(1):33-64.
- [7] SØRENSEN H. Xylanase in the soil and the rumen[J]. Nature,1955,176(4471):74.
- [8] JOHN M,SCHMIDT B,SCHMIDT J. Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylanases and β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger* [J]. Canadian Journal of Biochemistry,1979,57(2):125-134.
- [9] PEL H J,DE WINDE J H,ARCHER D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513. 88 [J]. Nature Biotechnology,2007,25(2):221-231.
- [10] 邢亚梅,陈勇,应汉杰. 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 发酵生产木聚糖酶的 pH 调控策略[J]. 生物加工过程, 2015,13(1):23-27.
XING Y M,CHEN Y,YING H J. Two-stage pH control strategy for xylanase production by *Aspergillus niger* D08[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering,2015,13(1):23-27.
- [11] TÖRRÖNEN A,MACH R L,MESSNER R, et al. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: Characterization of both enzymes and genes[J]. Nature Biotechnology,1992,10(11):1461-1465.
- [12] TECHAPUN C,POOSARAN N,WATANABE M, et al. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase - free xylanase production by *Thermotolerant streptomycetes* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2003,95(3):298-301.
- [13] KOHLI U,NIGAM P,SINGH D, et al. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28 (7/8): 606-610.
- [14] OKEKE B C,OBI S K C. Preliminary studies on a xylanase from an *Arthrographis* species [J]. FEMS Microbiology Letters,1992,96(1):43-47.
- [15] MILAGRES A M F,LACIS L S,PRADE R A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum* [J]. Enzyme and Microbial Technology,1993,15(3):248-253.
- [16] VIIKARI L,KANTELINEN A,SUNDQUIST J, et al. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry [J]. FEMS Microbiology Reviews,1994,13(2/3):335-350.
- [17] GOSWAMI G K,PATHAK R R. Microbial xylanases and their biomedical applications: A review[J]. International Journal of Basic & Clinical Pharmacology,2013,2(3):237-246.
- [18] 曲音波,高培基,陈嘉川. 制浆造纸用木聚糖酶的研究进展[J]. 生物工程进展,1998,18(6):36-40.
QU Y B,GAO P J,CHEN J C. Production and application of xylanase preparations for pulp and paper industry[J]. Advance in Bioengineering,1998,18(6):36-40.
- [19] 陈慧忠,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.
CHEN H Z,GAO P J,WANG Z N. Screening of high yield xylanase producing strain and studies on its submerged fermentation conditions[J]. Acta Microbiologica Sinica,1990,30(5):351-357.
- [20] 曹钰,陆健,李胤. 酸性木聚糖酶的研究进展[J]. 工业微生物,2005,35(4):41-44,50.
CAO Y,LU J,LI Y. Research advances in acid-stable xylanase[J]. Industrial Microbiology, 2005, 35(4): 41-44,50.
- [21] PERALTA-YAHYA P P,ZHANG F Z,DEL CARDAYRE S B, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels[J]. Nature,2012,488(7411):320-328.
- [22] THOMAS L,PARAMESWARAN B,PANDEY A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production[J]. Renewable Energy,2016,98:9-15.
- [23] 吴仁智,陈东,芦志龙,等. 发酵木糖高产乙醇树干毕赤酵母菌株的 Co⁶⁰ 诱变选育[J]. 广西科学,2014,21(1):47-53.
WU R Z,CHEN D,LU Z L, et al. Breeding of high-yield *Pichia stipitis* strains by Co⁶⁰ Mutagenesis for ethanol fermentation from xylose [J]. Guangxi Sciences,2014,21(1):47-53.
- [24] BAILEY M J,BIELY P,POUTANEN K. Interlabora-

- tory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23(3): 257-270.
- [25] POUTANEN K, PULS J. Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988, 28(4/5): 425-432.
- [26] KALLEL F, DRISS D, CHAARI F, et al. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 5: 1-10.
- [27] 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.
CHEN H G, ZHU J, LIANG G Q, et al. Screening of acidic xylanase producing strain and studies on its enzyme production conditions [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(4): 350-354.
- [28] 王金华. 黑曲霉酸性木聚糖酶基因在毕赤酵母中的高

效表达及其表达产物性质及应用特性研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2003.

WANG J H. Cloning and overexpression of gene encoding acidic endo- β -1, 4-xylanase from *Aspergillus niger* (N402) in *Pichia pastoris* and analysis of properties of the recombinant xylanase [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2003.

- [29] FREDERICK M M, KIANG C, FREDERICK J R, et al. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(4): 525-532.
- [30] TENKANEN H, PULS J, POUTANEN K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(7): 566-574.

(责任编辑: 米慧芝)

(上接第 111 页 Continue from page 111)

- [8] KIM D Y, HAM S J, KIM H J, et al. Novel modular endo- β -1, 4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 25-32.
- [9] KAMBLE R D, JADHAV A R. Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(3): S1790-S1797.
- [10] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法 [J]. *生物技术*, 2007, 17(1): 39-41.
JIANG S M, ZHANG L, DAI S K, et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from actinobacteria [J]. *Biotechnology*, 2007, 17(1): 39-41.
- [11] ÖSTLING S, VIRTAMA P. A modified preparation of the universal buffer described by teorell and stenhagen

[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1946, 11(4): 289-293.

- [12] 孙超, 陈卫平. 微生物木聚糖酶及其应用研究进展 [J]. *中国酿造*, 2013, 32(4): 24-29.
SUN C, CHEN W P. Research progress in microorganism xylanase and its application [J]. *China Brewing*, 2013, 32(4): 24-29.
- [13] SIBTAIN A, SABA R, AMER J. Molecular cloning of fungal xylanases: An overview [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(1): 19-35.
- [14] KNOB A, TERRASAN C R F, CARMONA E C. β -Xylosidases from filamentous fungi: An overview [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 26(3): 389-407.

(责任编辑: 米慧芝)