

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

*C12N 9/42 (2006.01)*

*C12R 1/465 (2006.01)*



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910157992.8

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101624584A

[22] 申请日 2009.7.21

[21] 申请号 200910157992.8

[71] 申请人 北京工商大学

地址 100048 北京市海淀区阜成路33号

[72] 发明人 李秀婷 吕跃钢 宋焕禄 马家津  
余元莉

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### [54] 发明名称

一种内切型木聚糖酶的制备方法

### [57] 摘要

本发明公开了一种以农业废弃物为原料经微生物发酵方法制备生产低聚木糖用内切型木聚糖酶的方法。筛选得到一株枝链霉菌 (*Streptomyces rameus*)，可利用经碱法处理的农业废弃物产生内切木聚糖酶，并通过生化方法进行纯化，得到可水解木聚糖生产木糖含量低、聚合度为2到5的低聚木糖产品的内切型木聚糖酶。

1. 一种内切型木聚糖酶的制备方法，其特征在于：

经碱法处理富含半纤维素的农业废弃物为原料，以一株新型木聚糖酶产生菌株——枝链霉菌对该原料进行微生物发酵处理，制备可降解木聚糖的内切型木聚糖酶，该酶可生产出该木糖含量低、聚合度为 2 至 5 的低聚木糖。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：

a. 将收集到的富含腐败木质纤维材料的土样，置于以玉米芯木聚糖为唯一碳源的选择培养基上培养，初测木聚糖酶活力、结合色谱技术对木聚糖水解产物进行分析，选出一株内切木聚糖酶活力较高的放线菌菌株；通过形态学特征、培养特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析，确定这是一株新型的木聚糖酶产生菌——枝链霉菌 L2001；

b. 处理农业废弃物原料：原料经粉碎，40℃水浴预处理 1h 后取滤渣，用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡（按固液比 1:10），煮沸 2h 后趁热过滤，取滤液，用浓盐酸调 pH 至 7.0，蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次，至上清液澄清，沉淀物即为木聚糖粗品；

c. 以枝链霉菌 (*Streptomyces rameus*) L2001 为产酶菌，培养基条件为 (g/L)：木聚糖粗品，25；酵母浸膏，5；蛋白胨，10；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，7.5；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1.5，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，0.5，pH6.0。液体发酵转速控制在 140r/min，40℃培养 7d，该培养液经离心得到的上清液即为木聚糖粗酶液；

d. 对枝链霉菌 L2001 产生的木聚糖粗酶液进行提纯，得到高纯度内切木聚糖酶；通过 40%-60%硫酸铵沉淀、DE52 离子交换层析和 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析后，纯酶分子量约为 20 kDa。

### 一种内切型木聚糖酶的制备方法

#### 技术领域

本发明涉及一种内切型木聚糖酶的制备方法，内切型木聚糖酶以农业废弃物为原料、经微生物发酵制得，以便用于生产低聚木糖，所述农业废弃物包括：玉米芯、秸秆、稻壳、豆秆、甘蔗渣等。

#### 背景技术

低聚木糖是低聚糖的一种，是由内切木聚糖酶以木聚糖为底物、水解 $\beta$ -1,4糖苷键形成的聚合度为2-7的低聚糖。其主要活性成分以木二糖和木三糖为主。

低聚木糖具有刺激对健康有益的细菌活性增强的作用，主要为：在人体肠道中有选择性地增殖双歧杆菌等益生菌，且其最低有效作用量低于其它低聚糖；抑制病原菌，防止腹泻；具有诸如降低胆固醇、维持胃肠健康、促进钙吸收、防便秘等生理功能；提供较低的能量，不引起龋齿，利于口腔健康；具有温和的甜味、耐酸碱能力很强，可用作偏酸性食品的添加剂，如果汁、碳酸饮料等；不会导致人体血浆中葡萄糖水平的大幅上升，可作为糖尿病或者肥胖症患者的甜味剂等。

低聚木糖的生产方法包括物理、化学及酶等方法，主要采用水解富含木聚糖的原料，然后对产物进行提取精制。

在低聚木糖的多种生产方法中，酶水解法具有反应专一性强，易于控制其水解速度及程度，且所得产物分离及精制较为容易等优点，因此逐渐成为生产高品质低聚木糖的主要方法。酶法生产低聚木糖过程中的关键是木聚糖酶。木聚糖酶是一种重要的半纤维素降解酶系，它能够降解由 $\beta$ -1,4-糖苷键连接 $\beta$ -D-吡喃型木糖单元构成主链，该酶系包括多种水解酶： $\beta$ -木糖苷酶、 $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶和 $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶，其中 $\beta$ -木糖苷酶作用于木寡糖的末端，释放出木糖残基； $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶和 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶能够

释放侧链糖： $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶（EC 3.2.1.8）以内切方式作用于木聚糖主链，能够释放出不同链长的寡糖及少量的木糖。

木聚糖酶是一种诱导酶，很多微生物如细菌、霉菌和放线菌均能产生木聚糖酶。尽管可通过含有木聚糖丰富的木质纤维质原料诱导微生物产生木聚糖酶，但由于木聚糖存在于植物细胞壁中且与纤维素、木质素之间形成复杂的结构，大多数微生物不能直接利用木质纤维质原料，而只能利用纯净的木聚糖产生木聚糖酶，而提取木聚糖不仅工艺复杂而且得率较低，提高了制备木聚糖酶制剂成本。另外，由于木聚糖酶种类繁多，大多数能够降解木聚糖类的产酶菌株产生的木聚糖酶系组成复杂，因具有 $\beta$ -木糖苷酶使水解产物中木糖含量过高，而低聚木糖含量不足，从而影响了低聚木糖的品质。

农作物及其在加工过程中产生的副产物，包括玉米芯、棉籽壳、甘蔗渣等农业废弃物，均为重要的木质纤维原料。由于缺乏合理的利用，大量的农作物秸秆及副产物等废弃物除非常少量的可以做为饲料用，绝大部分被焚烧，使有机质大量流失，空气污染。若能以农业废弃物为原料制备低成本工业酶制剂，进而生产具有高附加值的低聚木糖，不仅可以充分利用农业废弃物，合理利用资源，而且可以获得巨大的经济效益，保护环境。

本发明的目的正是针对上述问题而研制的一种高效率、低成本的以农业废弃物为原料、用于制备低聚木糖的木聚糖酶及其制剂的方法，该方法以一株新型木聚糖酶产生菌株——枝链霉菌对农业废弃物原料进行微生物发酵处理，制备可降解木聚糖的内切型木聚糖酶，该酶特异性强，可降解木聚糖产生聚合度为2至5的低聚木糖，且纯度高，木糖含量低。

本发明一方面能够使制备木聚糖酶原料成本降低；另一方面能够得到产物主要为木二糖至木五糖的目标产物含量高的低聚木糖产品，使后续产品精制过程简化，具有良好的应用前景。

#### 发明内容

本发明所解决的技术问题是，以农业废弃物为原料经微生物发酵方法制备内切型木聚糖

酶的方法，特别是一种制备生产低聚木糖产品的微生物酶的方法。

本发明的目的是通过以下方案来实现的：

#### 1. 农业废弃物经碱法进行预处理

农业废弃物的碱处理：原料经粉碎，40℃水浴预处理 1h 后取滤渣，用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡（按固液比 1:10），煮沸 2h 后趁热过滤，取滤液，用浓盐酸调 pH 至 7.0，蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次，至上清液澄清，沉淀物即为木聚糖粗品。

#### 2. 液体发酵产木聚糖酶

以枝链霉菌 (*Streptomyces rameus*) L2001 (保藏单位：CGMCC 北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所，保藏日期 2009 年 7 月 20 日；保藏编号 3196；分类命名：枝链霉菌 *Streptomyces rameus*；存活) 为产酶菌，培养基条件为 (g/L)：木聚糖粗品，25；酵母浸膏，5；蛋白胨，10；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，7.5；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1.5；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，0.5，pH6.0。液体发酵转速控制在 140r/min，40℃培养 7d，离心得上清液即为液体木聚糖酶。

3. 对木聚糖酶粗酶液进行提纯，通过 40%-60%硫酸铵沉淀、DE52 离子交换层析和 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析后，得到分子量约为 20 kDa 的纯木聚糖酶。其 SDS-PAGE 和酶谱分析结果见附图 1。

4. 木聚糖酶酶解：以经碱法处理的农业废弃物为底物，底物浓度为 1%，加酶量为 20U/g 底物，反应温度为 50℃，酶解时间 24h。在此条件下所得木聚糖酶解液中主要成分为木二糖和木三糖。

#### 附图说明

图 1 为 *Streptomyces rameus* L2001 木聚糖酶纯酶的 SDS-PAGE (a) 和酶谱分析 (b) 图。

(注：列 M，低分子量标准蛋白；列 E，纯酶蛋白；列 Z，纯酶酶谱。)

#### 具体实施方式

本发明以下结合具体实例作进一步说明，但并不是限制本发明。

#### 实施例 1

步骤 1: 将玉米芯粉 40℃水浴预处理 1h 后取滤渣, 用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡 (按固液比 1:10), 煮沸 2h 后趁热过滤, 取滤液, 用浓盐酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次, 至上清液澄清, 取沉淀物。

步骤 2: 液体发酵得 *Streptomyces rameus* L2001 的木聚糖酶粗酶液, 通过生化方法纯化得内切木聚糖酶。

步骤 3: 以上述碱法处理的玉米芯为底物, 底物浓度为 1%, 加酶量为 20U/g 底物, 在 50℃恒温振荡酶解 24h。在沸水浴中煮 10min 灭酶, 离心, 分离, 收集上清液, 即为低聚木糖糖液。

#### 实施例 2

步骤 1: 将豆杆粉 50℃水浴预处理 1h 后取滤渣, 用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡 (按固液比 1:10), 煮沸 2h 后趁热过滤, 取滤液, 用浓盐酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次, 至上清液澄清, 取沉淀物。

步骤 2: 摇瓶发酵得 *Streptomyces rameus* L2001 的木聚糖的粗酶液, 通过生化方法纯化得内切木聚糖酶。

步骤 3: 以上述碱法处理的豆杆为底物, 底物浓度为 1%, 加酶量为 20U/g 底物, 在 50℃恒温振荡酶解 24h。在沸水浴中煮 10min 灭酶, 离心, 分离, 收集上清液, 即为低聚木糖糖液。

#### 实施例 3

步骤 1: 将棉籽壳粉 80℃水浴预处理 1h 后取滤渣, 用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡

(按固液比 1:10), 煮沸 2h 后趁热过滤, 取滤液, 用浓盐酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次, 至上清液澄清, 取沉淀物。

步骤 2: 摇瓶发酵得 *Streptomyces rameus* L2001 的木聚糖的粗酶液, 通过生化方法纯化得内切木聚糖酶。

步骤 3: 以上述碱法处理的棉籽壳为底物, 底物浓度为 1%, 加酶量为 20U/g 底物, 在 50℃ 恒温振荡酶解 24h。在沸水浴中煮 10min 灭酶, 离心, 分离, 收集上清液, 即为低聚木糖糖液。

#### 实施例 4

步骤 1: 将甘蔗渣粉 100℃ 水浴预处理 1h 后取滤渣, 用 10% (w/v) 的 NaOH 溶液浸泡 (按固液比 1:10), 煮沸 2h 后趁热过滤, 取滤液, 用浓盐酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水洗涤并离心分离 5-6 次, 至上清液澄清, 取沉淀物。

步骤 2: 摇瓶发酵得 *Streptomyces rameus* L2001 的木聚糖的粗酶液, 通过生化方法纯化得内切木聚糖酶。

步骤 3: 以上述碱法处理的甘蔗渣为底物, 底物浓度为 1%, 加酶量为 20U/g 底物, 在 50℃ 恒温振荡酶解 24h。在沸水浴中煮 10min 灭酶, 离心, 分离, 收集上清液, 即为低聚木糖糖液。

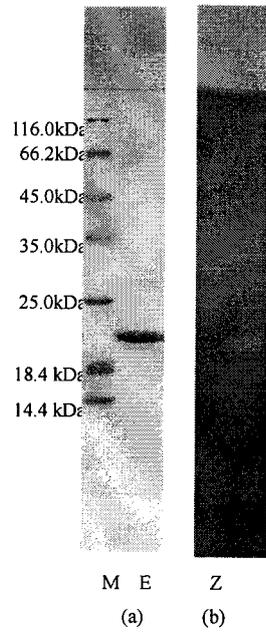


图 1