

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20181225.011

吴仁智,黄俊,芦志龙,等.酸性木聚糖酶产生菌 XYW5 的筛选及酶学性质[J].广西科学,2018,25(6):669-677.

WU R Z, HUANG J, LU Z L, et al. Screening of microbial strain XYW5 for acidic xylanase and enzymatic properties of crude acidic xylanase[J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(6): 669-677.

酸性木聚糖酶产生菌 XYW5 的筛选及酶学性质*

Screening of Microbial Strain XYW5 for Acidic Xylanase and Enzymatic Properties of Crude Acidic Xylanase

吴仁智^{1,2}, 黄俊¹, 芦志龙¹, 陈小玲¹, 陈英¹, 陆琦¹, 陈东¹, 王青艳¹,
黄日波^{1,2**}

WU Renzhi^{1,2}, HUANG Jun¹, LU Zhilong¹, CHEN Xiaoling¹, CHEN Ying¹,
LU Qi¹, CHEN Dong¹, WANG Qingyan¹, HUANG Ribo^{1,2}

(1. 广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 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, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004)

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

摘要:【目的】选育优良的产酸性木聚糖酶的微生物, 考察酸性木聚糖酶的酶学性质(尤其是 pH 值为 4.0), 为实现纤维素乙醇低成本清洁生产打下基础。【方法】从广西大学农场采集土壤, 富集后经产酸性木聚糖酶的培养, 比较酸性木聚糖酶活力, 选育酸性木聚糖酶高产菌株, 鉴定菌种, 分析酶学性质。【结果】筛选出产酸性木聚糖酶活力较高的菌株 XYW5。扩增菌株 XYW5 的 ITS rDNA 序列, 经测序分析比对, 将其初步鉴定为日本曲霉 *Aspergillus japonicus* XYW5。菌株 XYW5 产酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力最高分别达 (26.26 ± 0.97) U/mL 和 (0.63 ± 0.02) U/mL, 比活力分别为 (85.50 ± 0.63) U/mg 和 (1.80 ± 0.01) U/mg; 其酸性木聚糖酶最适温度和最适 pH 值分别为 65℃ 和 6.5, 酸性木糖苷酶最适温度和最适 pH 值分别为 70℃ 和 4.5; 酸性木聚糖酶兼有酸性 CMCase 酶活力, 达到 8.54 U/mL。【结论】菌株 XYW5 所产的酸性木聚糖酶具有开发成为优良工业酸性木聚糖酶的潜力。

关键词: 日本曲霉 筛选 酸性木聚糖酶 酶学性质
纤维素乙醇

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2018)06-0669-09

Abstract: 【Objective】Breeding excellent microorganisms producing acidic xylanase and investigating the enzymatic properties of acidic xylanase (especially pH 4.0) can lay the foundation for low-cost and clean production of cellulosic ethanol. 【Methods】The soil was collected from the farm of Guangxi University, and after enrich-

收稿日期: 2018-08-29

作者简介: 吴仁智(1984—), 男, 在读博士研究生, 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研究。

* 国家 863 项目(2013AA050701), 国家科技计划课题子任务(2012AA022106), 广西重点研发计划(桂科 AB16380024), 广西自然科学基金联合资助培育项目-面上项目(2018GXNSFAA138111), 广西科技开发项目(桂科合 14123001-6)和广西科学院科研发展基金项目(2018YFJ402)资助。

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

ment, the acidic xylanase was cultured. The activity of acidic xylanase was compared, the acidic xylanase high-yield strain was selected and identified, and the enzymatic properties were analyzed. **【Results】**XYW5 strain with high activity of acidic xylanase was screened out. The ITS rDNA sequence of XYW5 strain was amplified and initially identified as *Aspergillus japonicus* XYW5 by sequencing analysis and inter-comparison. The enzyme activity of acidic xylanase and acidic xylosidase produced by XYW5 strain was (26.26 ± 0.97) U/mL and (0.63 ± 0.02) U/mL, respectively. The specific activity of the two enzymes was (85.50 ± 0.63) U/mg and (1.80 ± 0.01) U/mg, correspondingly. The optimum temperature and the pH value of the acidic xylanase was 65°C and 6.5, respectively. And the optimum temperature and the pH value of the acidic xylosidase was 70°C and 4.5, respectively. While acidic xylanase had acidic CMCase enzyme activity, reaching 8.54 U/mL. **【Conclusion】**The acidic xylanase produced by XYW5 strain has the potential to be developed into an excellent acidic xylanase for industry application.

Key words: *Aspergillus japonicus*, screening, acidic xylanase, enzyme properties, cellulosic ethanol

0 引言

【研究意义】非粮生物乙醇作为新一代的可再生能源,具有低碳清洁绿色环保等优势^[1],是目前最为成功的液体替代燃料^[2],如何研发和利用非粮生物乙醇是当前世界各国共同关注的焦点,已成为世界各国能源产业的发展趋势和必然选择^[3-4]。实际上,非粮生物乙醇已成为我国的战略性新兴产业^[5-6]。以非粮原料生产燃料乙醇,能一定程度上缓解我国的能源危机、保证我国的能源安全,意义重大。**【前人研究进展】**非粮生物乙醇原料来源丰富,主要是一些木质纤维,其中包括蔗渣、木薯、稻草、秸秆等,其主要成分为纤维素、半纤维素和木质素^[7]。而半纤维素的主要组分是木聚糖,其作为第二大丰富的多聚糖类物质(仅次于纤维素),所占比例为 20%~30%^[8]。来源于自然界的木聚糖,具有结构复杂、分子量庞大、不易降解等特点。降解木聚糖的方法,包括酶解法以及传统的化学法等。化学法容易引发环境污染问题,而酶解法采用生物酶催化水解方法(木聚糖酶),具有高效、环保等特点,相较于化学法具有明显的优势^[9]。木聚糖酶主要包括 β -1,4-内切酶(1,4- β -D-xylan xylano-hydrolase, EC 3.2.1.8)、 β -木糖苷酶(β -D-xylosidase, EC 3.2.1.37)以及支链酶等^[10],是可将木聚糖降解成为低聚木糖和木糖的一组酶的总称。其中最关键的酶是 β -1,4-内切酶(俗称木聚糖酶)和 β -木糖苷酶^[11],前者水解木聚糖分子中的 β -1,4-木糖苷键(以内切方式),主要产物是木寡糖和木二糖,后者降解产物主要是木糖。对于木聚糖酶的研究,国外起步较早,1955 年就从牛瘤胃、土壤中发现了木聚糖酶^[12]。随着后续的研究,截至目前,来源于自然界的

能产木聚糖酶的微生物主要有黑曲霉 *Aspergillus niger*^[13-15]、微紫青霉菌 *Penicillium janthinellum*^[16]、节图霉属 *Arthrographis* sp.^[17]、高温放线菌 *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C^[18]、链霉菌 *Streptomyces* sp. Ab106^[19]、里氏木霉 *Trichoderma reesei*^[20-21]等,大部分的木聚糖酶属于碱性木聚糖酶,我国及其他一些国家早已对碱性木聚糖酶成功进行商业化生产及应用,如应用在造纸工业及生物工程领域^[22-23]。据报道,我国最早对酸性木聚糖酶进行研究是在 1990 年,陈惠忠等^[24]开展了产酸性木聚糖酶微生物的选育、酸性木聚糖酶的酶学特性分析及酶活性改造等^[25]。**【本研究切入点】**纤维素乙醇产业化生产包括原料预处理、酶降解(纤维素酶、木聚糖酶等)、糖化发酵、蒸馏、脱水等工艺流程,发酵一般在酸性条件下(pH 值 3.8~4.0,即调酸发酵)进行,此酸性条件能抑制细菌等微生物的生长。近年来,研发高效优良的酸性木聚糖酶(常温 30~37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值约为 4 等酸性条件仍保持高酶活),应用于纤维素乙醇等领域,已成为研究的热点和难点^[26-27]。采用酸性木聚糖酶降解半纤维素的主要组分木聚糖,生成能供给酵母(如树干毕赤酵母、酿酒酵母等)利用^[28-29]的产物木糖,进而进行酒精发酵,这对于纤维素乙醇生产工艺来说,能节省调节 pH 值的时间及减少相应的设备,从而缩短酒精生产工艺流程,为实现纤维素乙醇高效、低成本、清洁生产打下基础。鉴于此,本研究将从自然界筛选产酸性木聚糖酶的微生物(采用 pH 值为 4.0)。**【拟解决的关键问题】**选育优良的产酸性木聚糖酶的微生物,考察其所产酸性木聚糖酶的酶学性质(尤其是 pH 值为 4.0),为实现纤维素乙醇低成本清洁生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从广西大学农场采集土壤,去除地表覆盖的土层,在地表以下 5~10 cm 处取样。

1.1.2 试剂

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

1.1.3 培养基

筛选培养基(g/L):桦木木聚糖 10,蛋白胨 20,酵母粉 10,KNO₃ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,KH₂PO₄ 0.5,琼脂 22。调节 pH 值至 4.0。

产酶培养基(g/L):桦木木聚糖或桦木木聚糖 10,(NH₄)₂SO₄ 5,蛋白胨 10,MgSO₄·7H₂O 0.5,KH₂PO₄ 1,CaCl₂ 0.2,FeSO₄·7H₂O 0.01。pH 值调至 4.0。

菌种保藏、活化的培养基均为 PDA(g/L):马铃薯 200,琼脂 20,葡萄糖 20。pH 值为自然状态。

1.2 方法

1.2.1 产酸性木聚糖酶菌株的筛选

选取一些呈弱酸性的土壤区域,取适量的土壤,加入 50 mL 无菌水进行稀释,取 10 mL 稀释液,加入至装有 40 mL 富集培养基的 250 mL 三角瓶,摇床培养(30℃,180 r/min) 2 d,从中吸取 10 mL 重复进行富集培养 1 次。然后经木聚糖平板进行初筛,选取水解圈较大的菌株进行纯化,经产酶液体培养和测酶活,选取酶活力较高的菌株进行保存及研究。

1.2.2 菌株 ITS rDNA 分子鉴定

(1)菌株 DNA 提取

采用 CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide)法抽提。先收集菌体,添加液氮进行研磨,加入适量 CTAB 经 65℃水浴 1 h,氯仿/Tris 平衡酚抽提,取上清加入适量经 -20℃预冷的异丙醇离心(8 000 r/min,15 min,4℃)收集沉淀,沉淀经预冷 75%(V/V)乙醇洗两次,沉淀风干后加入适量 ddH₂O 溶解,吸至 1.5 mL EP 管做好标记后置于 -20℃保存。

(2)菌株 ITS rDNA 序列分子鉴定

以菌株 DNA 为模板扩增 ITS rDNA 序列,采用一对通用引物:ITS1(序列为:5'-TCCG TAGGT-

GAACCTGCGG-3')及 ITS4(序列为:5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'),PCR 扩增条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 8 min。PCR 产物送英骏生物公司测序,测序结果登陆 NCBI 网站进行序列比对。选取一些有代表性菌株的 ITS 序列,采用软件 Mega 5.0 版本,选用 Kimura 2-parameter 距离的模型,采取邻接法(neighbor-joining,NJ)进行系统发育树的构建,系统发育树的图片保存待用。

1.2.3 酶活力测定

(1)木聚糖酶

参考文献[21,30]的方法,反应是在 pH 值为 4.0 条件下进行。1 个酶活力单位(IU)的定义:特定反应条件,1 min 转化 1 μ mol 底物所需的酶量。

(2)木糖苷酶

参考文献[21,31]的方法,反应是在 pH 值为 4.0 条件下进行。1 个酶活力单位(IU)的定义同上。

(3)纤维素酶(CMCase 酶活力)

参考文献[21]的方法,反应是在 pH 值为 4.0 条件下进行,底物为 1%(W/V)羧甲基纤维素钠。1 个酶活力单位(IU)的定义同上。

1.2.4 蛋白含量测定

采用 Bradford 蛋白定量盒测定,按说明书进行(每一样品反应的体积均为 20 μ L)。

1.2.5 酶学性质

(1)酶最适温度及热稳定性

酶最适温度的测定参考文献[21]的方法,分别采用不同温度:20~90℃进行反应(pH 值为 4.0)。

酶热稳定性的研究参考文献[21]的方法,即在确定最适温度的前提下选取一些特定温度,分别保温 5~30 min,经冰水冷却后测定酶活性(pH 值为 4.0)。

(2)酶最适 pH 值及稳定性

酶最适 pH 值的测定参考文献[21]的方法。缓冲液:pH 值 2.10~8.50 的 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠、pH 值 9.00~12.00 的 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH。

酶 pH 值稳定性的研究参考文献[21]的方法,酶液分别于不同 pH 值(2.10~12.00)4℃保温处理 24 h,测定酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选及菌株鉴定

从广西大学农场采集的土壤样品,经富集分离纯化,初步筛选出产木聚糖酶活力较高的菌株有 5 株,

其中酸性木聚糖酶活力最高的是菌株 XYW5。采用 CTAB 法提取菌株 XYW5 的基因组 DNA, 经 PCR 克隆出菌株 XYW5 的 ITS rDNA 序列片段, 将该片段送英骏生物公司测序, 获得菌株 XYW5 的 ITS rDNA 序列, 然后登陆网站美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 将该序列进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对分析, 发现其与日本曲霉

Aspergillus japonicus strain A1.1 ITS rDNA 序列同源率为 99%, 将其命名为 *Aspergillus japonicus* XYW5。2012 年 7 月 5 日, 将菌株 XYW5 的 ITS rDNA 序列提交到 GenBank, 经接收后获得登录号 JX277550, 同时于 2012 年 9 月 18 日在 GenBank 上公布 (为国内比较早登记的菌株)。通过 ITS rDNA 序列同源搜索, 构建了菌株 XYW5 的系统进化树 (图 1)。

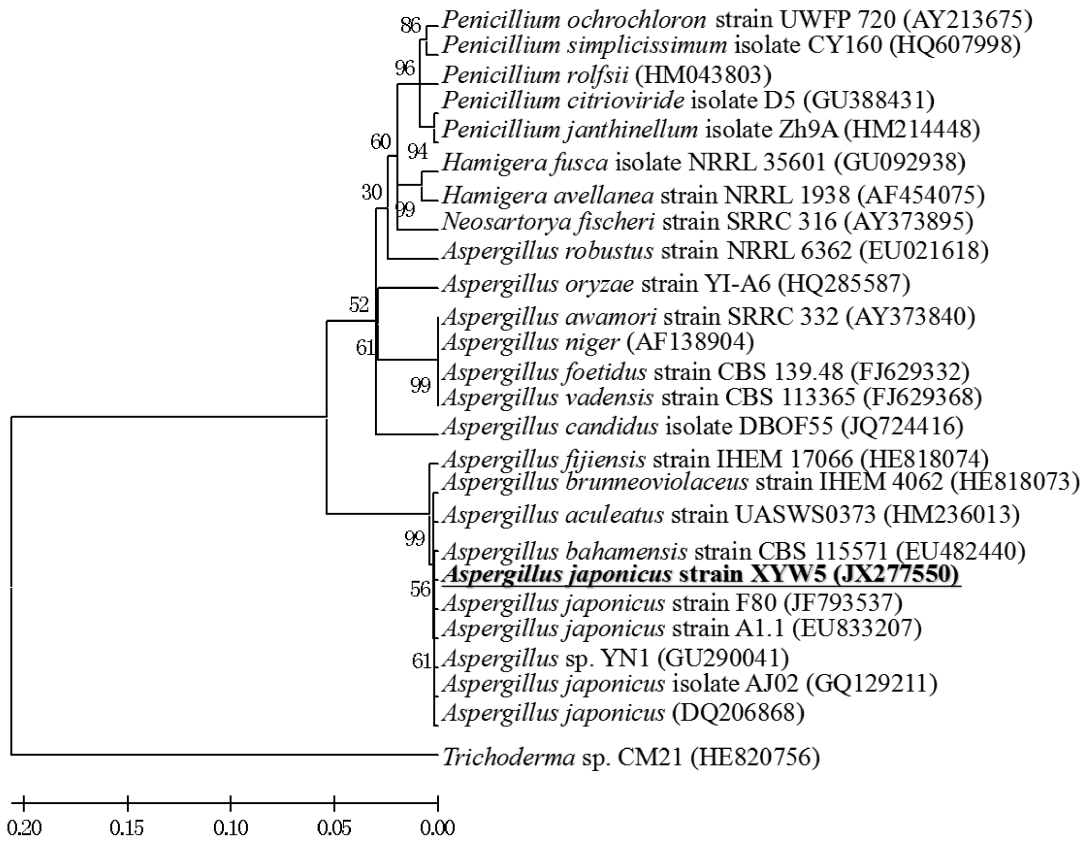


图 1 基于 ITS rDNA 序列构建的日本曲霉 XYW5 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram for *Aspergillus japonicus* XYW5 based on the ITS rDNA sequence

2.2 木聚糖诱导产酶情况比较

木聚糖酶一般是诱导性的酶, 为此, 采用不同的木聚糖作为底物, 所产酸性木聚糖糖酶的活力可能不同。菌株 XYW5 分别利用榉木木聚糖、桦木木聚糖作为底物进行产酶培养, 产酶情况如图 2 所示, 两者所产的酸性木聚糖酶酶活力均在 5 d 时达到最高; 采用榉木木聚糖诱导培养的酸性木糖苷酶酶活力 3 d 就能达到最高, 而采用桦木木聚糖诱导培养的酸性木糖苷酶酶活力则需要 5 d 达到最高。此外, 利用榉木木聚糖诱导所产的酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力、蛋白含量均明显高于利用桦木木聚糖所诱导产生的 (表 1), 尤其是木聚糖酶, 前者所产的酶活力是后者所产的 4 倍之多。菌株 XYW5 产酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活力最高分别达 (26.26 ±

0.97) U/mL 和 (0.63 ± 0.02) U/mL, 比活力分别为 (85.50 ± 0.63) U/mg 和 (1.80 ± 0.01) U/mg。综上所述, 以榉木木聚糖作为底物更有利于菌株 XYW5 产酸性木聚糖酶。

2.3 酸性 CMCase 酶活力

菌株 XYW5 分别利用榉木木聚糖、桦木木聚糖两种底物, 所产的酸性木聚糖酶均具有酸性 CMCase 酶活力, 且榉木木聚糖所产的酸性 CMCase 酶活力明显高于桦木木聚糖所产的 (表 2), 由此可知, 桦木木聚糖更有利于菌株 XYW5 产酸性木聚糖酶, 兼有更高的酸性 CMCase 酶活力。此外, 酸性条件下 CMCase 酶活均高于中性条件下的 CMCase 酶活力, 从这一点上印证了菌株 XYW5 所产的酸性木聚糖酶具有酸性 CMCase 酶活力。

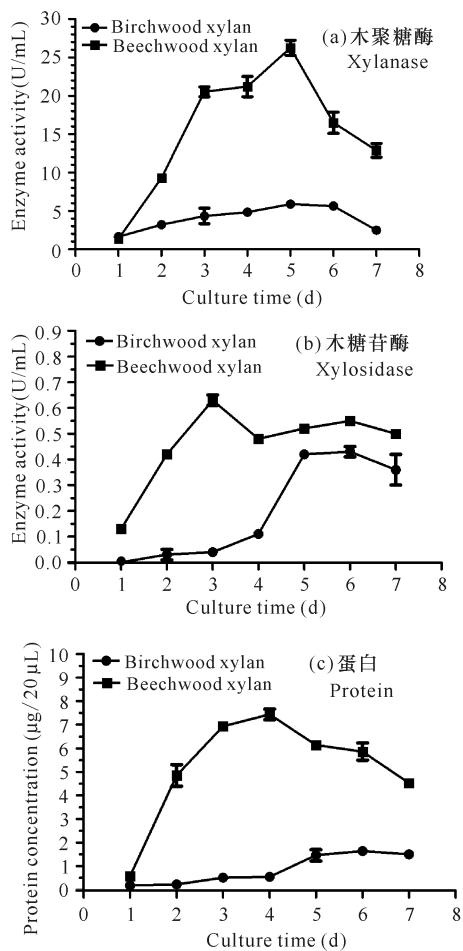


图2 菌株XYW5的产酶曲线

Fig. 2 Curve of xylanases of *Aspergillus japonicus* XYW5

表1 不同木聚糖底物的产酶酶活力和蛋白含量

Table 1 Enzyme activity and concentration of protein of different xylan substrates

种类 Kind	酶活力 Enzyme activity(U/mL)		蛋白含量 Concentration of protein (µg/20 µL)
	酸性木 聚糖酶 Acidic xyla- nase	酸性木 糖苷酶 Acidic xylo- sidase	
桦木木聚糖 Birchwood xylan	5.89 ± 0.00	0.43 ± 0.02	1.64 ± 0.02
榉木木聚糖 Beechwood xylan	26.26 ± 0.97	0.63 ± 0.02	7.44 ± 0.23

表2 酸性CMCase活力比较

Table 2 Comparison of enzyme activity of acidic CMCase

木聚糖种类 Kind of xylan	CMCase 酶活 CMCase activity (U/mL)	
	pH value 4.0	pH value 7.0
桦木木聚糖 Birchwood xylan	3.39	1.80
榉木木聚糖 Beechwood xylan	8.54	3.22

2.4 酸性木聚糖酶的酶学性质

2.4.1 酶的最适温度及热稳定性

为考察菌株XYW5所产酸性木聚糖酶的最适温度及热稳定性,选取酸性木聚糖酶活力最强时的产酶上清液开展试验研究(图3~4)。用榉木木聚糖作为碳源培养菌株XYW5产酶,收集5 d的粗酶液,经适当稀释,参照Bailey等^[30]方法在20~90℃反应测定酸性木聚糖酶的酶活力,以最高酶活力作为100%,测定相对酶活力。酸性木聚糖酶的最适温度为65℃,在45~80℃温度范围内酶活力均超过最适温度的70%,而当温度低至30℃或高达90℃时酶活力仍分别有最适温度的40%或50%左右(图3a)。当温度高于最适温度5℃(即70℃)条件下保温30 min后,酶活力仅下降不到30%(图3b)。此外,当温度在30~40℃时,酶活力仍然是最适温度的35%~55%,这意味着菌株XYW5所产酸性木聚糖酶具有能被开发为常温木聚糖酶的潜力。

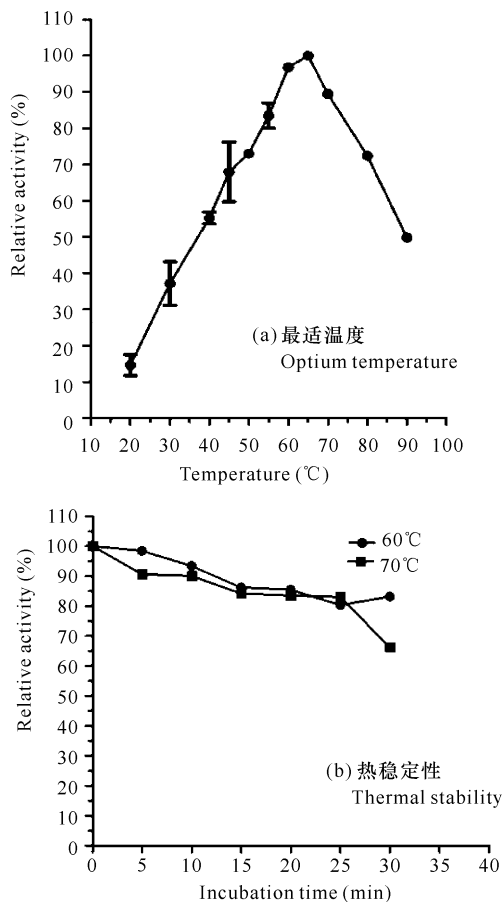


图3 酸性木聚糖酶的最适温度及热稳定性

Fig. 3 Optimum temperature and thermal stability of acidic xylanase

参照Poutanen等^[31]方法,在20~90℃反应测定酸性木糖苷酶的酶活力,以最高酶活力作为100%,测定相对酶活力。菌株XYW5的酸性木糖苷酶的最

适温度为 70℃。当温度低于 50℃ 或者高达 75℃ 时, 菌株 XYW5 酸性木糖苷酶的酶活力仅分别是最适温度的 40% 或 50% 左右。当温度在 30~40℃ 时, 酶活力仅分别是最适温度的 10%~30%。而当温度高达 90℃ 时, 检测不到酸性木糖苷酶的酶活性(图 4a)。此外, 当在最适温度 70℃ 条件下保温 15 min 后, 酸性木糖苷酶残余酶活力很低; 在此温度保温 20 min, 残余酶活力为 0(图 4b), 由此可知, 菌株 XYW5 的酸性木糖苷酶的热稳定性比较差。

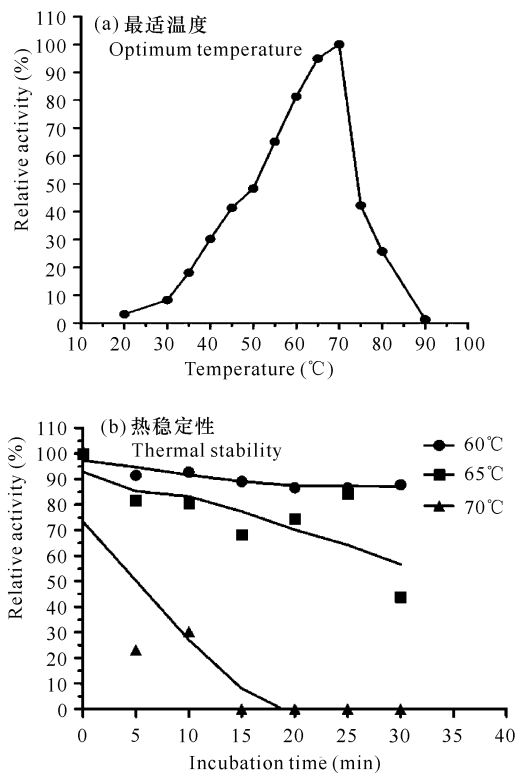


图 4 酸性木糖苷酶的最适温度及热稳定性

Fig. 4 Optimum temperature and thermal stability of acidic xylosidase

2.4.2 酶的最适 pH 值和 pH 值稳定性

粗酶液在不同 pH 值(2.10~12.00)条件测定菌株 XYW5 酸性木聚糖酶的酶活, 以最高酶活作为 100%, 测定相对酶活力, 菌株 XYW5 所产的酸性木聚糖酶最适 pH 值为 6.5, 当 pH 值在 4.5~8.0, 酶活力均超过最适 pH 值条件下 70% 的活性。而当 pH 值为 4.0 时, 酸性木聚糖酶的活力还能达到最适 pH 值时酶活性的一半(图 5)。

此外, 测定得菌株 XYW5 的酸性木糖苷酶最适 pH 值为 4.5(图 6)。当 pH 值在 4.0~5.0, 酶活力仍能保持超过最适 pH 值条件下 90% 的活性; 当 pH 值在 2.5~3.5, 残余酶活力是 20.00%~66.36%; 当 pH 值为中性(7.0)时, 酶活性是 6.06%; 当 pH 值超过 7.5 时, 几乎检测不到酶活性。此外, 菌株 XYW5

所产的酸性木糖苷酶在酸性条件下稳定性较好, 在中性碱性条件下, 酶活性很低甚至无酶活。由此可知, 菌株 XYW5 所产的酸性木糖苷酶是典型的酸性木糖苷酶, 能在酸性条件下发挥作用, 而在中性或碱性条件下不能发挥作用。

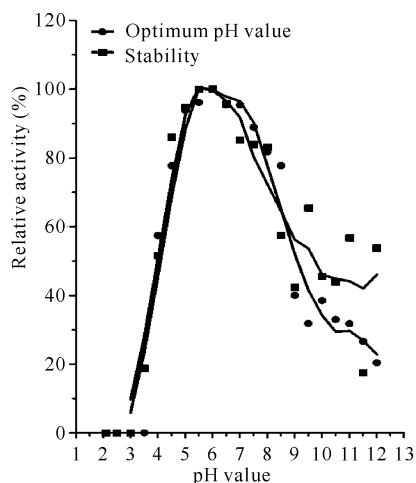


图 5 酸性木聚糖酶的最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig. 5 Optimum pH value and stability of acidic xylanase

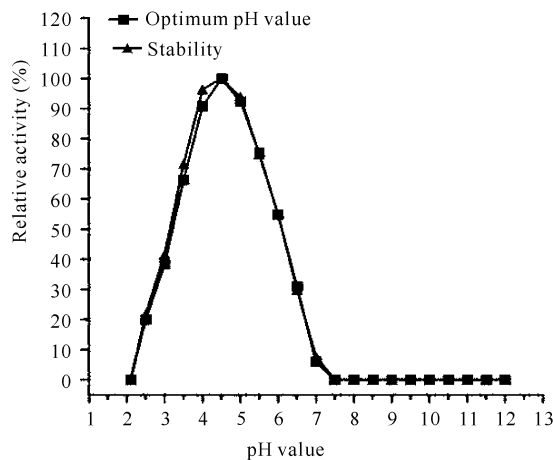


图 6 酸性木糖苷酶的最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig. 6 Optimum pH value and stability of acidic xylosidase

3 讨论

3.1 产酸性木聚糖酶的能力

来源于自然界微生物的木聚糖酶很多, 其中极小一部分来自细菌, 如链霉菌^[19]、高温放线菌^[18]、莫海威芽孢杆菌^[32]等, 但大部分是来自真菌, 如微紫青霉菌^[16]、里氏木霉^[23-24]、黑曲霉^[13-14]等。从广西大学农场土壤分离出能产酸性木聚糖酶、酸性木糖苷酶的菌株 XYW5 经鉴定为日本曲霉 *Aspergillus japonicus*。国外关于日本曲霉 *Aspergillus japonicus* 产木聚糖酶的报道较多^[33-37], 早在 1981 年就有日本曲霉 *Aspergillus japonicus* OM-4 能降解木质素的报道^[38]。经后续研究, OM-4 菌株所产的

木聚糖酶活力为 23.3 U/mL^[33]。Facchini 等^[39]选育的日本曲霉 C03 菌株,其所产的木聚糖酶活力最高达(23.85±1.2) U/mL,且具备 CMCase 活性,最高达(0.98±0.02) U/mL。C03 菌株以豆麸做底物,所产木聚糖酶活性最高达(224.62±1.38) U/g^[40]。而 Herculano 等^[41]以蓖麻皮等废弃物做干基(ds, dry substrate)进行产酶,结果日本曲霉 URM5620 菌种所产的木聚糖酶活力达到(29 085±1 808) U/(g·ds)。Wakiyama 等^[36]以燕麦木聚糖底物(0.5%, W/V)选育的 *Aspergillus japonicus* MU-2 菌株所产的木聚糖酶经纯化后,酶活力达 566 U/mg,此外此 MU-2 菌株所产的木糖苷酶活性最高达 1.88 U/mg^[37]。国内目前仅有中南大学夏金兰课题组^[42-44]开展了相关的研究,其选育的菌株为 *Aspergillus japonicus* PJ01,该菌株的 ITS rDNA 序列于 2015 年 10 月 27 日在 GenBank 上公布(GenBank 登陆号为 KF550286)。该研究采用陈皮粉做原料,所产的木聚糖酶活力最高为(12.07±0.85) U/mL,兼有的纤维素酶 CMCase 酶活力最高为(2.69±0.20) U/mL。

XYW5 菌株所产的酸性木聚糖酶、酸性木糖苷酶的酶活力不高,明显达不到工业化的要求。陈惠忠等^[24]通过复合诱变手段(紫外及甲基磺酸乙酯)诱变野生型菌株 C-2,选育到 An-76 突变株,An-76 所产的木聚糖酶和木糖苷酶的活力比 C-2 的分别提高 2 倍和 1 倍(353.6 U/mL、4.5 U/mL)。王金华^[45]克隆出黑曲霉 N402 的酸性木聚糖酶基因并成功实现了异源表达(*Pichia pastoris*),酶活比 N402 的提高了 10.3 倍,达到 453.6 U/mL。鉴于此,可以考虑对 XYW5 菌株进行改造或实现异源高效表达酶活性,从而构建出产酶性能更优良的酸性木聚糖酶。

广西是我国最大的食糖生产基地,多年来每年的甘蔗产量均占全国的 60%左右,位居全国第一。据统计,2007—2017 年 10 年间甘蔗产量、混合糖产量年平均分别为 5 800 多万吨、700 多万吨,相应的蔗渣产量近 700 万吨(以广西甘蔗品种,一般 8.5 t 甘蔗产出 1 t 糖和 1 t 的蔗渣),糖厂榨糖后所产的蔗渣比较集中,且蔗渣富含半纤维素,为此,下一步将开展菌株 XYW5 所产的酸性木聚糖酶处理蔗渣原料的应用研究,考察酶解效果及相关的产率等。

3.2 酶学性质的比较

酸性木聚糖酶是一组酶的总称,起主要作用的是酸性 β-1,4-内切酶(俗称酸性木聚糖酶)和酸性 β-木糖苷酶(简称酸性木糖苷酶)。这两个关键酶均受到所处环境因素的影响,如温度、pH 值等。Facchini

等^[40]选育的日本曲霉 *Aspergillus japonicus* C03 菌株,所产的木聚糖酶最适 pH 值、温度分别为 4.0 和 60℃。Wakiyama 等^[36]选育的 MU-2 菌株,所产的木聚糖酶最适 pH 值、温度分别为 5.0 和 60℃,45℃保温 30 min,酶活性影响不大,但当温度上升至 55℃,容易失去其活性。而 MU-2 菌株所产的酸性木糖苷酶最适 pH 值、温度分别为 4.0 和 70℃^[37]。Semenova 等^[35]选育的日本曲霉,所产的酸性木糖苷酶最适 pH 值、温度分别为 3.5~4.0 和 70℃。而日本曲霉 PJ01 产酶初始 pH 值为 5.0,木聚糖酶最适 pH 值也在 5.0 左右^[42]。XYW5 菌株所产的酸性木聚糖酶的最适温度和最适 pH 值分别为 65℃和 6.5,酸性木糖苷酶最适温度和最适 pH 值分别为 70℃和 4.5;酸性木聚糖酶兼有酸性 CMCase 酶活力,达到 8.54 U/mL。

4 结论

从广西大学农场采集土壤,富集后经产酸性木聚糖酶的培养,筛选出产酸性木聚糖酶活力较高的菌株 XYW5。扩增菌株 XYW5 的 ITS rDNA 序列,经测序分析比对,将其初步鉴定为日本曲霉 *Aspergillus japonicus* XYW5。菌株 XYW5 产酸性木聚糖酶和酸性木糖苷酶的酶活最高分别达(26.26±0.97) U/mL和(0.63±0.02) U/mL,两种酶所对应的比活力分别为(85.50±0.63) U/mg 和(1.80±0.01) U/mg;其酸性木聚糖酶最适温度和最适 pH 值分别为 65℃和 6.5,当温度在 30~40℃时,酸性木聚糖酶活力仍然是最适温度的 35%~55%,酸性木糖苷酶最适温度和最适 pH 值分别为 70℃和 4.5;酸性木聚糖酶兼有酸性 CMCase 酶活力,达到 8.54 U/mL。为此,这意味着菌株 XYW5 所产酸性木聚糖酶具有能被开发为优良酸性木聚糖酶的潜力。尽管如此,菌株 XYW5 所产的酸性木聚糖酶的各项指标仍未达到工业用酶的标准,亟待进一步改造及研发。

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] ZABED H, SAHU J N, BOYCE A N, et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 66: 751-774.
- [3] HIRANI A H, JAVED N, ASIF M, et al. A Review on first- and second-generation biofuel productions (eds) [M]. *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global*

- Warming. New Delhi: Springer, 2018; 141-154.
- [4] PENG K, LI J S, JIAO K L, et al. The bioeconomy of microalgal biofuels(eds), energy from microalgae[M]. Green Energy and Technology. Cham: Springer, 2018; 157-169.
- [5] JIAO J L, LI J J, BAI Y. Ethanol as a vehicle fuel in China: A review from the perspectives of raw material resource, vehicle, and infrastructure[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 180: 832-845.
- [6] 国家能源局.《关于扩大生物燃料乙醇生产和推广使用车用乙醇汽油的实施方案》印发. [2017-09-13]. http://www.nea.gov.cn/2017-09/13/c_136606035.htm. National Energy Administration. "On implementation plan for expanding biofuel ethanol production and promoting the use of ethanol gasoline for motor vehicles" printed and distributed. [2017-09-13]. http://www.nea.gov.cn/2017-09/13/c_136606035.htm.
- [7] BIELY P. Enzymological aspects of the production of microbial hemicellulases[M]//COUGLAND M P, HAZLEWOOD G P, eds. Hemi-celluloses and hemicellulases. London: Portland Press, 1993; 29-51.
- [8] PRADE R A. Xylanases: From biology to biotechnology [J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1995, 13(12): 100-131.
- [9] BRISARIA V S, GHOSE T K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1981, 3(2): 90-104.
- [10] BIELY P. Microbial xylanolytic systems[J]. Trends in Biotechnol, 1985, 3(11): 286-290.
- [11] SUBRAMANIYAN S, PREMA P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(1): 33-64.
- [12] SØRENSEN H. Xylanase in the soil and the rumen [J]. Nature, 1955, 176: 74.
- [13] JOHN M, SCHMIDT B, SCHMIDT J. Purification and some properties of five endo-1,4-beta-D-xylanases and a beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger* [J]. Can J Biochem, 1979, 57: 125-134.
- [14] 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.
- [15] 张水龙, 陈东, 曹树威, 等. 黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. 广西科学, 2013, 20(2): 148-151, 157.
ZHANG S L, CHEN D, CAO S W, et al. Cloning of *xynB* gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(2): 148-151, 157.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] TECHAPUN C, POOSARAN N, WATANABE M, et al. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(3): 298-301.
- [20] 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: 1461-1465.
- [21] 吴仁智, 黄俊, 芦志龙, 等. 里氏木霉和黑曲霉产酸性木聚糖酶及酶学特性比较 [J]. 广西科学, 2017, 24(1): 112-119.
WU R Z, HUANG J, LU Z L, et al. Comparative analysis of the characterization of crude acidic xylanases from two strains between *Trichoderma reesei* and *Aspergillus nige* [J]. Guangxi Sciences, 2017, 24(1): 112-119.
- [22] VIHKARI L, KANTELLINEN A, SUNDQUIST J, et al. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry [J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13: 335-350.
- [23] PRADE R A. Xylanases: From biology to biotechnology [J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996, 13: 101-131.
- [24] 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.
- [25] 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): 41-45.
CAO Y, LU J, LI Y. Research advances in acid-stable xylanase [J]. Industrial Microbiology, 2005, 35(4): 41-45.
- [26] 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: 320-328.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 刘宝利, 刘高冈, 林秋卉, 等. 多质粒共转化组合筛选方法构建木糖利用酿酒酵母的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(12): 86-97.
LIU B L, LIU G G, LIN Q H, et al. Construction of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* by three-plasmid co-transformation combinatorial screening method[J]. *China Biotechnology*, 2016, 36(12): 86-97.
- [30] BAILEY M J, BIELY P, POUTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. *J Biotechnology*, 1992, 23: 257-270.
- [31] POUTANEN K, PULS J. Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylanase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 28: 425-432.
- [32] KALLELA F, DRISSA D, CHAARIA 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.
- [33] SHARMA A, MILSTEIN O, VERED Y, et al. Effects of aromatic compounds on hemicellulose-degrading enzymes in *Aspergillus japonicus* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27(8): 1095-1101.
- [34] YANG C Y, SHEIH I C, FANG T J. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment[J]. *Ultrason Sonochem*, 2012, 19(3): 687-691.
- [35] SEMENOVA M V, DRACHEVSKAYA M I, SINITSYNA O A, et al. Isolation and properties of extracellular beta - xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei* [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2009, 74(9): 1002-1008.
- [36] WAKIYAMA M, YOSHIHARA K, HAYASHI S, et al. An extracellular endo - 1, 4 - β - xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(3): 227-229.
- [37] WAKIYAMA M, YOSHIHARA K, HAYASHI S, et al. Purification and properties of an extracellular β -Xy-
- losidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(4): 398-404.
- [38] MILSTEIN O, VERED Y, GRESSEL J, et al. Biodegradation of wheat straw lignocarbhydrate complexes (LCC) [J]. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1981, 13: 117.
- [39] FACCHINI F D A, VICI A C, BENASSI V M, et al. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(8): 1027-1038.
- [40] FACCHINI F D A, VICI A C, REIS V R A, et al. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(3): 347-355.
- [41] HERCULANO P N, MOREIRA K A, BEZERRA R P, et al. Potential application of waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) for production for xylanase of interest in the industry[J]. *Biotech*, 2016, 6(2): 144.
- [42] LI P J, XIA J L, NIE Z Y, et al. Saccharification of orange peel wastes with crude enzymes from new isolated *Aspergillus japonicus* PJ01[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(3): 485-492.
- [43] LI P J, XIA J L, SHAN Y, et al. Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01 [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(10): 2013-2022.
- [44] LI P J, XIA J L, SHAN Y, et al. Effects of surfactants and microwave-assisted pretreatment of orange peel on extracellular enzymes production by *Aspergillus japonicus* PJ01[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(3): 758-771.
- [45] 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.

(责任编辑: 陆 雁)