

文章编号:1000-5862(2020)05-0501-05

大米草半纤维素选择性酶解研究

谢茹胜¹, 李 蒙², 龙敏南¹

(1. 福建生物工程职业技术学院药学系, 福建 福州 350002; 2. 厦门大学能源学院, 福建 厦门 361102)

摘要:采用由东方肉座菌 EU7-22 表达的重组木聚糖酶 HoXyn11A、黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 和商品木聚糖酶分别降解大米草半纤维素, 探索其降解的最佳工艺条件, 结果发现该 3 种木聚糖酶最适 pH 值为 4.5~5.5, 最佳反应温度为 45~55℃, 酶用量为 200~300 IU·g⁻¹ 底物, 反应时间为 12~24 h。对比结果表明:通过黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 能够在 24 h 内基本将大米草半纤维素降解为低聚木糖, 效率远高于商品酶和东方肉座菌 EU7-22 表达的重组木聚糖酶 HoXyn11A。黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 是大米草半纤维素降解酶的良好来源。

关键词:大米草半纤维素; 木聚糖酶; 东方肉座菌 EU7-22; 黑曲霉 BE-2; 酶降解

中图分类号:TQ 35 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.05.09

0 引言

大米草是一种资源丰富的盐沼植物, 目前在中国沿海滩涂大量分布, 综合开发利用大米草具有重要的生态意义和经济效益。大米草含有丰富的纤维素、木质素和半纤维素等成分。纤维素、木质素和半纤维素均为高分子化合物, 它们具有复杂的空间结构, 在天然纤维素原料中, 它们聚合为一个整体, 形成复杂的超分子化合物。半纤维素占生物总质量的 20%~35%, 其含量仅次于纤维素^[1], 半纤维素的结构较为复杂, 为非均一聚糖, 其主要成分是木聚糖, 其主链是由 β -1,4-糖苷键相连的 β -D-吡喃型残基聚合而成, 因此可用内切 β -1,4-木聚糖酶随机切割木聚糖主链。根据其来源的不同, 可以有不同的侧链取代基, 主要有 4-O-甲基葡萄糖醛酰基、阿拉伯糖酰基和乙酰基^[2]。在木质纤维素生物质中的木聚糖可通过酸催化或者酶水解选择性地转化为木糖或者低聚木糖^[3]。内切 β -1,4-木聚糖酶是主要的木聚糖降解酶, 根据氨基酸序列相似性和疏水簇分析, 内切 β -1,4-木聚糖酶被分为 5、8、10、11 和 43 共 5 个糖苷水解酶 (glucoside hydrolase, GH) 家族, 其中 GH10 和 GH1 家族木聚糖酶应用较为广泛, 它们在

分子量、等电点和 3 维结构等方面存在显著差异^[4]。研究表明半纤维素在木质纤维素水解过程中担当重要角色^[5-6]。在木质纤维素生物质中木聚糖、阿拉伯聚糖可通过酸催化或者酶水解转化为低聚木糖和阿拉伯糖等功能糖^[7]。其中低聚木糖又称木寡糖, 是由 2~7 个木糖分子以 β -1,4 糖苷键结合而成的功能性聚合糖, 可选择性地促进肠道双歧杆菌的增殖活性, 低聚木糖的双歧因子功能是其其他聚合糖类的 10~20 倍, 是一种高附加值的食品添加剂^[8-9]。因此, 利用富含木聚糖的木质纤维素生物质生产木糖或者低聚木糖具有巨大的市场前景。

酶法制备低聚木糖克服了物理法得率低和化学法选择性差的缺点, 可实现产物得率较高的目的。由于酶法制备的温和性、可控性, 使得酶法制备可以替代酸法降解实现高效、清洁地制备低聚木糖。本文选择木聚糖酶降解半纤维素的效果进行初步研究, 拟筛选半纤维素降解活性较高的酶。从实验室特有菌株东方肉座菌 (*Hypocreaorientalis*) EU7-22 和黑曲霉 (*Aspergillusniger*) BE-2 出发重组毕赤酵母诱导表达半纤维素酶, 分别获得重组木聚糖酶 HoXyn11A 和重组木聚糖酶 AnXyn10C。同时与商品木聚糖酶进行对比, 优化各自的酶解条件, 筛选出具有较高活性的半纤维素降解酶。

收稿日期:2020-02-27

基金项目:闽海洋高新“海洋生物制品创新服务平台”[201621]资助项目。

作者简介:谢茹胜(1978-), 女, 福建漳州人, 副教授, 主要从事化学、海洋生物制品研究。E-mail:xierusheng78@163.com

1 试验材料和方法

1.1 材料与仪器

大米草在福建省宁德市滩涂采集,大米草半纤维素自制.木糖(Xylose)购自上海国药集团(分析纯);木二糖(Xylobiose, X2)、木三糖(Xylotriose, X3)、木四糖(Xylotetraose, X4)、木五糖(Xylopentaose, X5)和木六糖(Xylohexaose, X6)均购自Megazyme公司(纯度>90%,爱尔兰);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,分析纯)购自比利时Acros Organics公司;乙腈(色谱纯)购自美国Sigma公司.商品木聚糖酶购自宁夏夏盛实业集团有限公司;实验所用到的菌株分别为东方肉座菌(*Hypocreaorientalis*) EU7-22 和黑曲霉(*Aspergillusniger*) BE-2,均由本实验室筛选保存.其他试剂均为国内产分析纯试剂.DNS试剂参照文献[10]的方法配制.

Waters 高效液相色谱(岛津 2030),美普达 UV-1800 紫外-可见分光计.

1.2 实验方法

1.2.1 大米草半纤维素的提取与分析 大米草用一定浓度的NaOH与 H_2O_2 溶液在50℃下作用1h,滤渣洗净即为 α -纤维素.滤液用醋酸调至合适pH值,经浓缩后用乙醇沉淀出半纤维素.干燥备用.其中测出半纤维素纯度高于75.83%^[11].

制备的半纤维素经红外光谱测试分析,表明大米草半纤维素糖单元之间主要的连接方式是 β -糖苷键.

1.2.2 木聚糖酶的制备 由东方肉座菌 EU7-22 表达的重组木聚糖酶 HoXyn11A、黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 的制备参照文献[12].

1.2.3 酶活的测定 木聚糖酶活力的测定^[13]:取毛榉木聚糖0.5040g,用柠檬酸缓冲液配制成分数为1.0%的溶液50.0mL,取0.2mL稀释酶液置于25mL具塞刻度试管中,加入1.0%毛榉木聚糖底物1.8mL,然后在50℃水浴中保持10min,加入3mL DNS试剂,在100℃水浴中反应5min,然后在冰水中中止反应.按DNS法测定并换算出还原糖含量.以每分钟催化底物水解生成1 μ mol还原糖所需的酶量定义为1个国际酶活单位(IU).

1.2.4 酶水解大米草半纤维素 用重组木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品木聚糖酶分别对大米草半纤维素进行酶水解,采用正交设计实验分别考

察酶用量、pH值、水解温度、水解时间对木聚糖的得率(酶解效率)的影响,优选大米草半纤维素酶解成低聚木糖的最佳木聚糖酶和最优工艺.

1.2.5 大米草半纤维素酶解 将大米草半纤维素(10mg \cdot mL⁻¹)分别与木聚糖酶 HoXyn11A(100~500IU \cdot g⁻¹底物)、AnXyn10C(100~500IU \cdot g⁻¹底物)和商品半纤维素酶(100~500IU \cdot g⁻¹底物)在柠檬酸缓冲液(0.1mol \cdot L⁻¹,pH值为4~6)中于35~60℃条件下反应12~72h后(反应液中添加0.02%叠氮钠),在搅拌速率为150r \cdot min⁻¹、水解液温度为100℃条件下煮沸灭活10min,然后在转速为8000r \cdot min⁻¹的条件下离心分离5min,取上层清液待测.

1.2.6 PMP衍生化 取大米草半纤维素水解液100 μ L加到0.3mol \cdot L⁻¹的NaOH溶液中,再加入100 μ L0.5mol \cdot L⁻¹的1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)甲醇溶液,混合均匀后在70℃下反应30min,然后取出冷却至室温后加入100 μ L0.3mol \cdot L⁻¹的HCl进行中和.最后用1mL氯仿进行萃取,用涡流震荡法除去有机溶剂.重复上述操作3次.然后在12000r \cdot min⁻¹转速下离心分离5min,取上层清液稀释到一定倍数,用0.22 μ m滤膜过滤3次后进行检测.

1.2.7 HPLC分离检测^[14] 色谱柱C₁₈;检测波长为245nm,流动相A为磷酸缓冲液(0.04mol \cdot L⁻¹,pH值为8.06),流动相B为乙腈,采用等梯度洗脱法(A:B=79:21),流速为0.4mL \cdot min⁻¹.

2 结果与讨论

2.1 木聚糖酶酶活测定结果

木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品半纤维素酶活力分别为197IU \cdot mL⁻¹、108IU \cdot mL⁻¹、263IU \cdot mg⁻¹.

2.2 木聚糖酶水解液分析

采用重组木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品木聚糖酶分别对大米草半纤维素进行酶水解,得到其水解产物为具有高附加值的低聚木糖(含有木糖、木二糖、木三糖、木四糖、木五糖、木六糖),如图1所示.木糖可以进一步经生物化学法转化为燃料或者高附加值产品.低聚木糖由于其独特的生理功能,已于2008年被中国卫生部批准为新资源食品.

在后面的酶解工艺研究中,主要考察在不同的条件下对低聚木糖得率的影响。

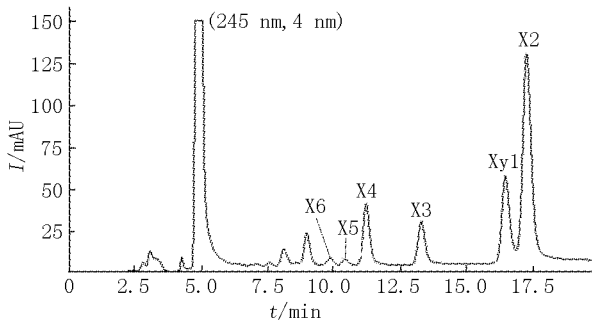


图1 HPLC分析大米草半纤维素酶水解产物

2.3 大米草酶解最佳工艺条件的研究

2.3.1 酶用量对大米草半纤维素木聚糖得率的影响 固定大米草半纤维素含量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、酶解时间为 24 h、酶解温度为 50°C 、pH 值为 5.0, 改变木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品木聚糖酶用量为 $100 \sim 500 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物, 考察酶用量的变化对低聚木糖得率的影响, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 当木聚糖酶 HoXyn11A 和商品半纤维素酶用量为 $300 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物时为最佳, 而木聚糖酶 AnXyn10C 的最佳用量为 $200 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物。

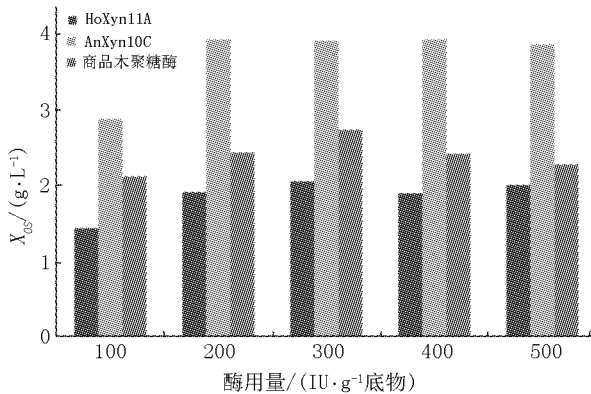


图2 酶用量对低聚木糖得率的影响

2.3.2 酶解 pH 值对大米草半纤维素木聚糖得率的影响 固定大米草半纤维素含量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、酶解时间为 24 h、酶解温度为 50°C , 木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品木聚糖酶用量均为 $200 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物, 改变缓冲溶液 pH 值为 4.0 ~ 6.0, 考察酶用量的变化对低聚木糖得率的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 当木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C、商品木聚糖酶水解的 pH 值分别为 5.5、5.5 和 5.0 时达到最高值, 而木聚糖酶 AnXyn10C 在 pH 值为 4.5 ~ 6.0 时出现平峰。3 种酶降解大米草半纤维素的最适 pH 值为 4.5 ~ 5.5。其中木聚糖酶 HoXyn11A 的最适 pH 值为 4.5 ~ 5.5。木聚糖酶

AnXyn10C 的最适 pH 值为 4.5 ~ 6.0, 商品木聚糖酶的最适 pH 值为 5.0 ~ 5.5。pH 值对酶催化反应的影响原因比较复杂, 目前普遍认为 pH 值从 2 个方面影响半纤维素酶的水解能力: (i) 破坏酶的空间结构, 使酶变性失活; (ii) pH 值改变了酶、底物以及酶-底物络合物的解离状态。

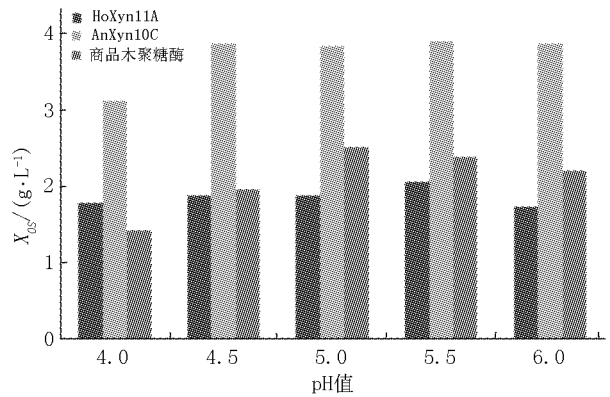


图3 溶液 pH 值对低聚木糖得率的影响

2.3.3 酶解温度对大米草半纤维素木聚糖得率的影响 固定大米草半纤维素含量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、酶解时间为 24 h、木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品半纤维素酶用量均为 $300 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物, 缓冲溶液 pH 为 5.0。改变酶解温度考察酶解温度对低聚木糖得率的影响。对于酶解过程而言, 温度的高低对酶促反应有较大影响, 随着温度的升高, 酶促反应会随之加快, 但是当温度超过一定值时, 酶的活性会受高温影响而降低, 所以需要找到使酶促反应最快同时酶的活性较高的最适温度。本文以 5°C 为梯度, 在 $35 \sim 60^\circ\text{C}$ 之间进行酶解反应, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, 木聚糖酶 HoXyn11A 在 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ 时水解效率较高, 在 40°C 时水解效率最高; 木聚糖酶 AnXyn10C 在 $50 \sim 55^\circ\text{C}$ 时水解效率较高, 在 55°C 时水解效率最高; 商品半纤维素酶在 $45 \sim 55^\circ\text{C}$ 时水解效率较高, 在 50°C 时水解效率最高。

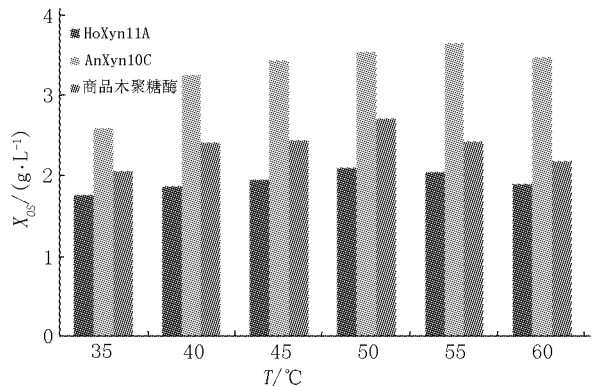


图4 酶解温度对低聚木糖得率的影响

2.3.4 酶解时间对大米草半纤维素木聚糖得率的影响 为了进一步研究各种酶降解壳聚糖过程,在充足的酶用量条件下,在不同酶解时间取样分析其产物中低聚木糖产生的情况.固定大米草半纤维素含量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、水解温度为 50°C 、木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品半纤维素酶用量均为 $300 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物,缓冲溶液 pH 为 5.0,改变酶解时间,考察反应时间对低聚木糖得率的影响,结果如图 5 所示.由图 5 可知,酶解 12 h 后低聚木糖的生成速率变缓.木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品半纤维素分别在 18 h、24 h、24 h 获得较高的水解率.考虑到时间效益,以 12 ~ 24 h 为最优反应时间.从这个方面来看,仅通过简单的浓缩,由黑曲霉 BE-2 主要表达的木聚糖酶 AnXyn10C 就能高效地降解大米草半纤维素,其降解效果甚至优于常规的商品木聚糖酶.

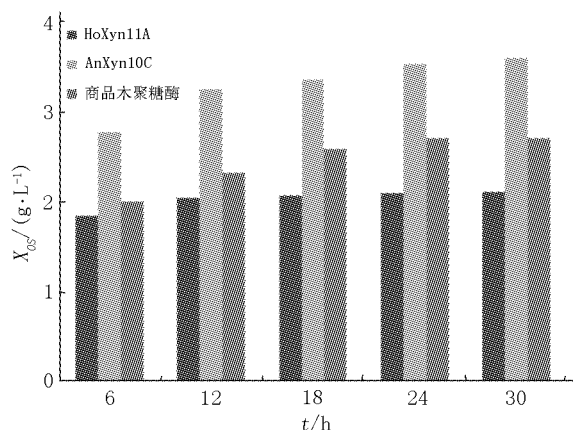


图 5 反应时间对低聚木糖得率的影响

3 结论

当以大米草半纤维为底物时,东方肉座菌 EU7-22 和黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 HoXyn11A、AnXyn10C 和商品木聚糖酶的最佳酶解条件为:酶解时间 12 ~ 24 h、酶解温度 $45 \sim 55^\circ\text{C}$, pH 值 4.5 ~ 5.5, 酶用量 $200 \sim 300 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物.其中黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 获得了较优的水解效果,其最佳酶解条件为酶解时间 24 h、酶解温度 55°C 、pH 值 5.5、酶用量 $200 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物.因此以黑曲霉 BE-2 表达的重组木聚糖酶 AnXyn10C 是大米草半纤维素降解酶的良好来源.重组木聚糖酶 AnXyn10C 比重组木聚糖酶 HoXyn11A 在水解大

米草半纤维时能释放更多的 XOS,甚至优于商品木聚糖酶,这表明重组木聚糖酶 AnXyn10C 具有更高的水解效率.这可能是 GH10 家族木聚糖酶相比 GH 家族木聚糖酶在促进纤维素酶水解预处理生物质时效率更高的潜在原因^[15].

4 参考文献

- [1] Saha B C. Hemicellulose bioconversion [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30 (5): 279-291.
- [2] Peng Feng, Peng Pai, Xu Feng, et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(4): 879-903.
- [3] Lavarack B P, Griffin G L, Rodman D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products [J]. Biomass and Bioenergy, 2002, 23(5): 367-380.
- [4] Pell G, Taylor E J, Gloster T M, et al. The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(10): 9597-9605.
- [5] Zhan Junhua, Tang Ming, Viikari L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases [J]. Bioresource Technology, 2012, 121: 8-12.
- [6] Zhan Junhua, Viikari L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase from *hermoascus aurantiacus* [J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 286-291.
- [7] Lavarack B P, Griffin G L, Rodman D, et al. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products [J]. Biomass and Bioenergy, 2002, 23(5): 367-380.
- [8] Carvalho A F A, de Oliva Neto P D O, da Silva D F, et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 75-85.
- [9] Yang Haiyan, Chen Qian, Wang Kun, et al. Correlation between hemicelluloses-removed-induced hydrophilicity variation and the bioconversion efficiency of lignocelluloses [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 539-544.
- [10] 李建武, 余瑞元, 袁明秀. 生物化学实验原理和方法

- [M]. 北京:北京大学出版社,1994.
- [11] 谢茹胜,刘健,龙敏南. NREL 法测定大米草原料组分的含量[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(5):43-46.
- [12] Li Hailong, Wu Jinlian, Jiang Fengjiao, et al. Functional expression and synergistic cooperation of xylan-degrading enzymes from *Hypocrea orientalis* and *Aspergillus niger* [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2014,90(11):2083-2091.
- [13] Bailey M J, Beily P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. Journal of Biotechnology, 1992,23(3):257-270.
- [14] Li Hailong, Long Chuannan, Zhou Juan, et al. Rapid analysis of mono-saccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC [J]. Biotechnology Letters, 2013,35(9):1405-1409.
- [15] Hu Jinguang, Arantes V, Pribovo A, et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate specific [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013,6(1):112.

The Study on Selective Enzymatic Hydrolysis of Hemicellulose from *Spartina anglica*

XIE Rusheng¹, LI Meng^{1,2}, LONG Minnan^{1,2}

(1. Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou Fujian 350002, China;

2. College of Energy, Xiamen University, Xiamen Fujian 361102, China)

Abstract: The xylanase enzyme including xylanase HoXyn11A produced from *Hypocreaorientalis* EU7-2, xylanase AnXyn10C produced from *Aspergillusniger* BE-2 and commodity xylanase are respectively used to degrade hemicellulose of *Spartina anglica*. And its best condition of process is also explored. The result shows that the most suitable pH value of the 3 species enzyme is from 4.5 to 5.5, the best reaction temperature is from 45 °C to 55 °C, the suitable enzyme dosage is 200 IU · g⁻¹ to 300 IU · g⁻¹ substrate, the best reaction time is 12 h to 24 h. The comparison results show that the recombinant xylan AnXyn10C expressed by aspergillus Niger b-2 can degrade hemicellulose into xylose oligosaccharide within 24 h, with a much higher efficiency than commercial enzymes and xylanase HoXyn11A produced from *Hypocreaorientalis* EU7-2. Hence, the recombinant xylan AnXyn10C expressed by *Aspergillusniger* BE-2 b-2 is an excellent source of enzymatic degradation of hemicellulose from *Spartina anglica*, which have great significance.

Key words: hemicellulose of *Spartina anglica*; xylanase; *Hypocreaorientalis* EU7-22; *Aspergillusniger* BE-2; enzymic degradation

(责任编辑:刘显亮)