

黑曲霉产木聚糖酶的分离纯化与鉴定研究

高月淑¹, 许敬亮², 袁振宏², 蒋剑春^{1*}, 何敏超², 张宁¹

(1. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所, 江苏 南京 210042; 2. 中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640)

摘要 木聚糖酶的分离纯化是对其进行酶学研究和分子改良研究的基础。利用实验室选育的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* SM24/a 进行木聚糖酶发酵, 粗酶液经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Bio-Gel P6 除盐、UNO sphere Q 阴离子交换和 Enrich SEC70 凝胶色谱层析四个步骤的分离纯化, 成功获得了 3 种木聚糖酶蛋白定义为 X-I、X-II 和 X-III。随着纯化步骤的增加, 各组酶比活力得到显著提高, 其数值分别为 37.41、34.56 和 53.96 U/mg, 纯化倍数分别为 3.96、3.66 和 5.72。经质谱分析和蛋白氨基酸序列比对, 初步认定 X-I 属于糖基水解酶第十家族内切- β -1,4-木聚糖酶, X-II 和 X-III 均属于糖基水解酶第十一家族木聚糖酶。

关键词 黑曲霉; 木聚糖酶; 分离纯化; 鉴定

中图分类号 Q554 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2017)03-0016-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2017.03.003

Isolation, Purification, and Identification of Xylanase from *Aspergillus niger* SM24/a

GAO Yue-shu¹, XU Jing-liang², YUAN Zhen-hong², JIANG Jian-chun¹, HE Min-chao², ZHANG Ning¹

(1. Inst. of Chem. Indust. of Forest Products, Chinese Acad. of Forestry, Nanjing 210042;

2. Guangzhou Inst. of Energy Conversion, Chinese Acad. of Sci., Guangzhou 510640)

Abstract Separation and purification of xylanase are the base of carrying out its enzymological study and molecular improvement. Xylanase fermentation was carried out using *Aspergillus niger* SM24/a bred in the lab. The crude enzyme solution was fractionally precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, desalinated by Bio-Gel P6, separated and purified with UNO sphere Q anion exchange and Enrich SEC70 gel chromatography, these four steps, and successfully obtained three kinds of xylanase, and named as X-I, X-II, and X-III. As the increment of purification steps, the specific activity of each component was significantly improved, their numerical value respectively were 37.41 U/mg, 34.56 U/mg and 53.96 U/mg, and the purification folds were 3.96, 3.66, and 5.72 respectively. Through mass spectrometry and amino acid sequence comparison, it was initially confirmed that X-I belonged to endo- β -1,4-xylanase of glycosyl hydrolase family 10, and both X-II and X-III belonged to xylanase of glycosyl hydrolase family 11.

Keywords *Aspergillus niger*; xylanase; separation and purification; identification

植物半纤维素的主要组分是木聚糖, 主链由 β -1,4-糖苷键连接吡喃型木糖残基构成。木聚糖主链的降解至少需要木聚糖酶(endo-xylanase, EC 3.2.1.8)和 β -木糖苷酶(β -xylosidase, EC 3.2.1.

37) 协同作用, 其中木聚糖酶作用于木聚糖主链骨架, 将其降解为木寡糖, 同时伴有少量木糖、阿拉伯糖和甘露糖, 是降解木聚糖的关键酶^[1-2]。另外, 外切木聚糖酶(endo-xylanase, EC 3.2.1.37)对

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20160150); 中国林科院林业新技术所基本科研业务费专项(CAFYBB2017SY034); 中国科学院可再生能源重点实验室开放基金项目(y507k71001)

作者简介: 高月淑 女, 助理研究员, 博士。主要从事生物质生化转化技术研究。Tel: 025-85482436, E-mail: gaoyueshu2199@163.com

* 通讯作者。男, 博士, 研究员, 博士生导师。主要从事林产化学工业加工和生物质能源开发技术研究。Tel: 025-85482488, E-mail: bio-energy@163.com

收稿日期: 2016-07-13; 修回日期: 2016-09-09

木聚糖到木糖的降解过程也有明显促进作用^[3]。木聚糖酶可广泛应用于生物转化、食品、饲料、造纸等行业^[4-6], 尤其随着人们对生物质能源的关注, 对包括木聚糖酶在内的纤维素酶系研究日益增多^[7-9]。木聚糖酶的分离纯化可以为其酶学性质及分子克隆研究奠定基础。本研究选用黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* SM24/a 进行木聚糖酶发酵, 通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Bio-Gel P6 除盐、UNO sphere Q 阴离子交换和 Enrich SEC70 凝胶色谱, 分离纯化到 3 种木聚糖酶, 并通过蛋白质谱与 NCBI 数据库比对, 初步鉴定酶蛋白类型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 黑曲霉 *Aspergillus niger* SM24/a, 由中国科学院广州能源研究所生物质生化转化实验室自行筛选, 最高木聚糖酶活力可以达到 9 100 U/g 干曲。

1.1.2 试剂 BCA 法蛋白定量试剂盒 购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 木聚糖酶活测定 取适当稀释的酶液 0.5 mL, 加入质量分数 1% 的木聚糖溶液 1 mL 混匀, 50 °C 保温 30 min, 用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖(以木糖为标准)含量, 以 1 min 释放 1 μmol 木糖的酶量为 1 个酶活力单位^[10]。

1.2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析分级沉淀 取 100 mL 木聚糖粗酶液置于冰浴中, 按照不同饱和度缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末, 12 000 r/min 冷冻离心 15 min, 用 0.2 mol/L、pH 为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液复溶沉淀, 上清液继续追加到相应饱和度, 重复磁力搅拌、冷冻、离心复溶步骤, 至不再有沉淀产生为止。复溶的液体置于 4 °C 冰箱中保藏备用。

1.2.3 Bio-Gel P6 凝胶过滤除盐 取上述步骤浓缩后的 1 mL 蛋白清液上样至 Bio-Gel P6 层析柱中, 以 pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液平衡并洗脱, 洗脱速度 2 mL/min, 收集对应各峰的蛋白酶液进行酶活性及蛋白含量的测定。

1.2.4 UNO sphere Q 阴离子交换层析 将除盐浓缩后的 1 mL 蛋白清液上样于经醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)平衡好的 UNO sphere Q 阴离子交换柱, A 液用醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)作为起

始缓冲液, B 液用外加 1 mol/L NaCl 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)作为洗脱缓冲液, 按照 0 ~ 1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱蛋白质, 洗脱速度 2 mL/min, 收集所有出峰酶液, 对其进行酶活性及蛋白含量的测定。

1.2.5 Enrich SEC70 凝胶排阻层析 将经过阴离子交换层析初步纯化后的 0.25 mL 蛋白清液上样于经醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)平衡好的 Enrich SEC70 凝胶柱中, 洗脱速度 1.5 mL/min, 收集所有出峰酶液, 对其进行酶活性及蛋白含量的测定。

1.2.6 SDS-PAGE 蛋白电泳 采用 SDS-PAGE 不连续垂直凝胶电泳, 电极液采用 Tris-甘氨酸缓冲体系, 分离胶缓冲液 pH 8.8, 浓度为 10%, 浓缩胶缓冲液 pH 6.8, 浓度为 5%, 70 V 恒压电泳 2.5 h^[11]。

1.2.7 木聚糖酶酶谱分析 琼脂糖板的制备: 准确称取 20 mg 木聚糖、400 mg 琼脂, 溶于 20 mL 蒸馏水中, 电炉加热溶解后, 灌入已预热到 60 °C 左右模板中, 冷凝后去掉玻璃板即得木聚糖胶板。在样品制备、分离胶、buffer 中不加 SDS 与巯基乙醇。采用 1.2.6 中电泳操作方式进行凝胶活性电泳后, 将凝胶铺在含木聚糖的胶板上, 50 °C 恒温箱中保温 1 h。电泳胶进行染色、脱色, 木聚糖胶用 0.1% 刚果红染色 0.5 h 后, 再用 1 mol/L NaCl 漂洗脱色、扫描仪扫描成像^[12]。

1.2.8 蛋白质谱检测 利用德国布鲁克(Bruker Dalton) Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析。UV 波长为 355 nm, 重复速率为 200 Hz, 加速电压为 20 000 V, 最优质量分辨率为 1 500 Da。扫描质量范围为 700 ~ 3 200 Da, 收集信号。胰酶自切峰为内标校正质谱仪。利用软件 flexAnalysis(Bruker Dalton) 过滤基线峰、识别信号峰。利用 BioTools(Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库, 寻找匹配的相关蛋白质, 具体操作由广州辉骏生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶谱和 PAGE 图谱

黑曲霉菌株 SM24/a 木聚糖酶酶谱如图 1 所示。该菌株所产粗酶液蛋白条带复杂, 但经木聚糖凝胶板孵育后, 木聚糖酶谱图上有 3 条清晰的

透明条带即木聚糖酶条带,可以推断该粗酶液中至少有3种木聚糖酶,按照分子量大小依次命名为X-I、X-II、X-III。

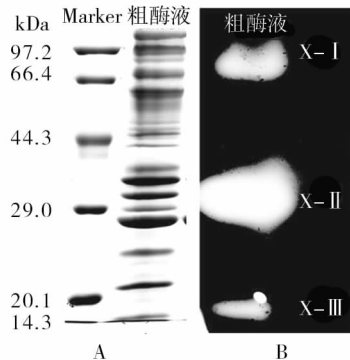


图1 木聚糖酶 SDA-PAGE(A) 和活性酶谱(B) 分析
Fig. 1 SDS-PAGE(A) and Zymogram(B) of culture filtrate

2.2 硫酸铵分级沉淀

沉淀用 0.2 mol/L、pH 为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液复溶到 10 mL,测定其木聚糖酶活力以及蛋白量。随着硫酸铵饱和度的增加,沉淀中的蛋白量以及木聚糖酶活力都呈现先升高后降低的趋势。当硫酸铵饱和度低于 40% 时,酶活力和蛋白量都很低;当饱和度在 50% ~ 70% 时,沉淀中蛋白量以及木聚糖酶活力达到最高;当饱和度高于 70% 时,蛋白量继续增加但是酶活力却明显下降,说明在此饱和度下杂蛋白开始逐渐增多;当饱和度超过 80% 时,蛋白量比例继续增大,酶活力降得很低。为了提高蛋白纯化的效果和得率,确定最佳硫酸铵饱和度为 40% ~ 80%。

2.3 Bio-Gel P6 脱盐

经硫酸铵分级沉淀后酶液脱盐结果如图 2 所示。由于蛋白分子量较大,在经过 Bio-Gel P6 脱盐柱时,只是在填料颗粒间隙中流动,所以很快被洗脱下来,而小分子物质和盐则会通过大量微孔,需在柱内停留更长的时间才被逐渐洗脱。图 2 中有两个主要的峰,大部分酶蛋白在第一管 A1 中洗脱下来,此时电导率较低,而小分子的盐逐渐在后面洗脱,电导率逐渐升高后降低。

2.4 UNO sphere Q 阴离子交换层析

脱盐后的酶液经过阴离子交换层析的洗脱图谱如图 3 所示。图 3 中出现 3 个比较明显的洗脱峰,取 A1、A9 和 A14 管,分别记为 Q1、Q9 和 Q14,进行酶谱和凝胶电泳检测,结果见图 4、5。

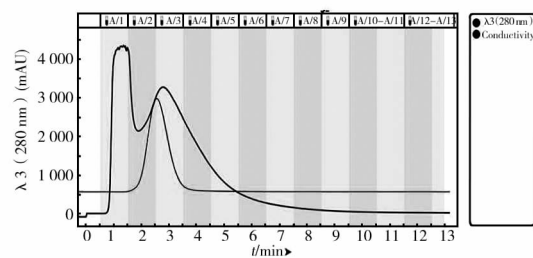


图2 Bio-Gel P6 脱盐图谱

Fig. 2 Bio-Gel P6 desalting chromatogram

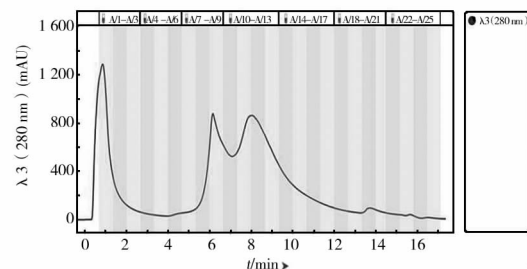


图3 UNO sphere Q 阴离子交换层析图谱

Fig. 3 UNO sphere Q ion exchange chromatogram

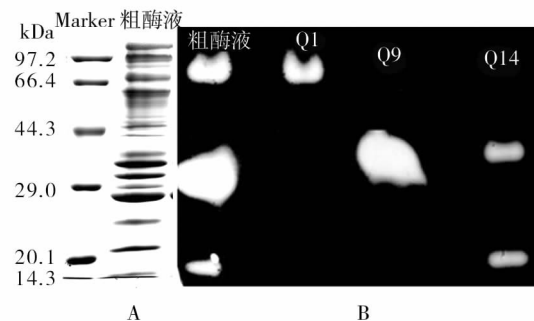


图4 木聚糖酶 SDA-PAGE(A) 和离子交换后组分活性酶谱分析(B)

Fig. 4 SDA-PAGE(A) and Zymogram(B) of xylanases separated by ion exchange chromatogram

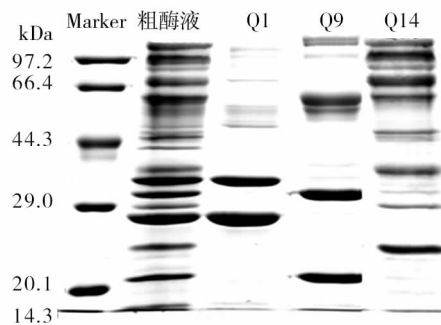


图5 离子交换后组分 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of different compositions separated by ion exchange chromatogram

从图 4 的活性酶谱分析可以看出,Q1 与 Q9

分别含有一个木聚糖酶蛋白分子 X-I 与 X-II , Q14 中含有两个木聚糖酶蛋白 , 其中一个分子量大小与 X-II 相近 , 推断二者为同一蛋白 , 而另一个木聚糖酶蛋白分子为 X-III。同时图 5 中 SDS-PAGE 结果显示这三个洗脱峰中含有其他杂带 , 因此 , 为达到纯化分离效果需进一步的色谱层析。

2.5 Enrich SEC70(10 × 300) 凝胶色谱层析

凝胶过滤层析是根据蛋白质分子大小不同而达到分离效果 , 高分子量的蛋白质在填料颗粒间隙中流动 , 比小分子量蛋白更早被洗脱下来。为了实现进一步的分离纯化 , 对 Q1、Q9 和 Q14 中的酶液进行凝胶色谱层析 , 结果如图 6、7 和 8 所示 , Q1 蛋白成分相对简单 , 得到两个主要的峰 , 记为 Q1-S11 和 Q1-S12; Q9 中出现 3 个峰 , 取对应的洗脱液记为 Q9-S5、Q9-S7 和 Q9-S8 , Q1 和 Q9 都很好地实现了基线分离; Q14 的蛋白成分复杂 , 前面几个峰相互重叠 , 仅取最后一个单一峰记为 Q14-S13 , 同时将所有出峰位置对应洗脱液组分收集进行酶活测定 , 最后测得 Q1-S12、Q9-S8 和 Q14-S13 三个组分有木聚糖酶活力。将这 3 个组分进行木聚糖酶谱和 SDS-PAGE 验证 , 结果如图 9 和 10 所示 , 在 Q1-S12、Q9-S8 和 Q14-S13 中获得纯度较高的不同蛋白条带 , 分别对应粗酶液酶谱上的木聚糖酶蛋白分子 X-I、X-II 和 X-III。

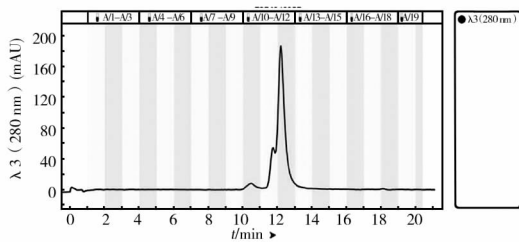


图 6 Q1 样品的 Enrich SEC70 凝胶色谱图
Fig. 6 Enrich SEC70 size exclusion chromatogram of Q1

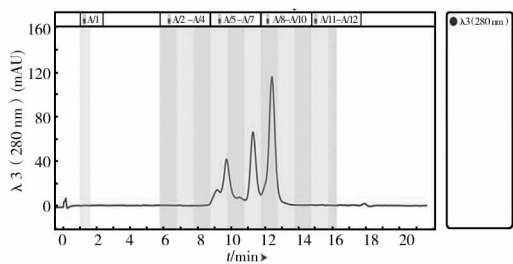


图 7 Q9 样品的 Enrich SEC70 凝胶色谱图
Fig. 7 Enrich SEC70 size exclusion chromatogram of Q9

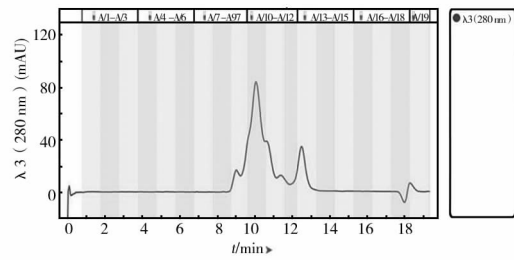


图 8 Q14 样品的 Enrich SEC70 凝胶色谱图
Fig. 8 Enrich SEC70 size exclusion chromatogram of Q14

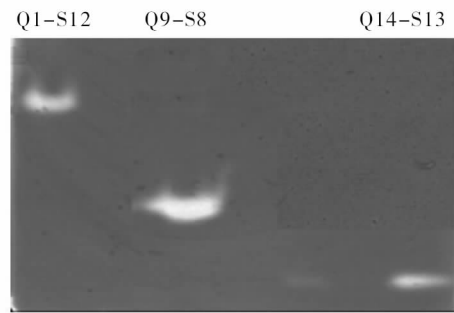


图 9 Q1-S12、Q9-S8 和 Q14-S13 木聚糖酶活性酶谱
Fig. 9 Xylanase zymogram of Q1-S12、Q9-S8 and Q14-S13

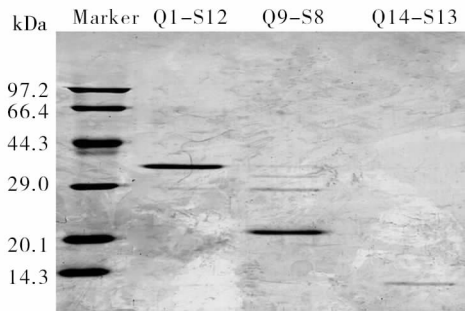


图 10 Q1-S12、Q9-S8 和 Q14-S13 SDS-PAGE 图谱
Fig. 10 SDS-PAGE of Q1-S12、Q9-S8 and Q14-S13

2.6 3 种木聚糖酶的质谱检测

将纯化后的 3 条木聚糖条带从电泳胶板切下 , 进行蛋白质谱检测 , 利用 BioTools(Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库 , 寻找匹配的相关蛋白质 , 明确鉴定的蛋白质类型。质谱所得肽段与多肽蛋白数据库中已知蛋白质的氨基酸序列比对 , 发现 X-I 蛋白与 *Aspergillus kawachii* IFO 4308、*Aspergillus niger* CBS 513. 88 等菌株所产木聚糖酶系中内切-β-1, 4 木聚糖酶同源性较高 , 属于糖基水解酶中的第 10 家族; X-II 蛋白与 *Aspergillus niger* 某些菌株

所产木聚糖酶系中木聚糖酶同源性较高,属于糖基水解酶中的第 11 家族; X-III 蛋白与 *Aspergillus niger* 某些菌株所产木聚糖酶系中木聚糖酶同源性较高,属于糖基水解酶中的第 11 家族。

2.7 纯化回收率的计算

通过几种纯化方法的结合可以顺利实现粗酶液整个纯化过程。将 100 mL 粗酶液各个纯化步骤所得组分用标准曲线法和 DNS 法分别进行蛋白质和酶活力的测定,比酶活、纯化倍数及回收率结果见表 1。分析表中数据可知, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀会造成部分木聚糖酶蛋白损失,同时也有一定纯化效果,经过分级沉淀后木聚糖酶纯化倍数为 1.8 倍。经过 Bio-Gel P6 脱盐步骤,蛋白损

失相对较少,沉淀后的酶液获得进一步的纯化,纯化倍数为 2.13 倍。经过阴离子柱 UNO sphere Q 和凝胶色谱柱 Enrich SEC70 后,各个收集管中的木聚糖酶蛋白组分得到更进一步的提纯。由于粗酶液中还有其他内切酶组分,而实验只选取其中酶活较高、杂蛋白较少的组分进行重点分析,其他组分均被去除,酶的损失很大。分离纯化后获得了 3 种木聚糖酶组分,各组分酶比活力得到显著提高,其数值分别为 37.41、34.56 和 53.96 U/mg,其纯化倍数分别为 3.96、3.66 和 5.72。同时单一酶组分的回收率均较低下,这与覃拥灵等^[13]和杨云龙等^[14]纯化结果相似,其原因可能是由于纯化过程操作步骤较繁琐,导致木聚糖酶部分失活^[15-16]。

表 1 *Aspergillus niger* SM24/a 的木聚糖酶纯化结果

Table 1 Purification of xylanase of *Aspergillus niger* SM24/a

操作步骤		酶活力/U	蛋白量/mg	比酶活/(U · mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液		28 924.18	3 066.24	9.43	1.00	100.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀		10 562.77	621.63	16.99	1.80	36.52
Bio-Gel P6 脱盐		8 096.85	402.70	20.11	2.13	27.99
阴离子色谱	Q1	515.64	20.41	25.27	2.68	1.78
	Q9	437.54	17.56	24.91	2.64	1.51
	Q14	1 096.93	35.18	31.18	3.31	3.79
凝胶色谱	Q1-S12	382.74	10.23	37.41	3.96	1.32
	Q9-S8	187.07	5.41	34.56	3.66	0.65
	Q14-S13	498.48	9.24	53.96	5.72	1.72

3 讨论

本文研究了黑曲霉 *Aspergillus niger* SM24/a 所产木聚糖酶的纯化体系,经过饱和度 40% ~ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、Bio-Gel P6 除盐、UNO sphere Q 阴离子交换和 Enrich SEC70 凝胶色谱层析,成功实现了其粗酶液中 3 种木聚糖酶蛋白 X-I、X-II 和 X-III 的分离纯化。经过质谱分析和蛋白氨基酸序列比对,初步认定 X-I 属于糖基水解酶第十家族内切- β -1,4 木聚糖酶, X-II 和 X-III 均属于糖基水解酶第十一家族木聚糖酶。研究结果为研究其酶学性质和分子改良提供材料,同时为进一步利用该酶进行木质纤维素酶解及低聚木糖制备奠定基础。

参考文献:

- [1] 孙雷,朱孝霖,李环,等. 木聚糖酶分离纯化技术[J]. 生物技术通报, 2005, 5: 52-54.
- [2] L. R. S. Moreiral, E. X. F. Filho. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100: 5205-5214.
- [3] Veeresh Juturu, Jin Chuan Wu. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174: 81-92.
- [4] Chutani, Preeti, Sharma, et al. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 127: 54-63.
- [5] Didem Sutay Kocabaş, Sevgi Güder, Neslihan özbenc. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase

- and its application in agricultural waste biomass hydrolysis [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* 2015, 115: 66-75.
- [6] P Sá-Pereira, H Paveia, M Costa-Ferreira, et al. A new look at xylanases [J]. *Molecular Biotechnology* 2003, 24: 257-281.
- [7] An J, Xie Y, Zhang Y, et al. Characterization of a thermo-stable, specific GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii* with high catalytic activity [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* 2015, 117: 13-20.
- [8] Juturu Veeresh, Wu Jin Chuan. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2013, 88: 353-363.
- [9] Diogo JA, Hoffmam ZB, Zanphorlin LM, et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 69: 31-37.
- [10] Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- [11] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [12] 丁长河. 链霉菌高产木聚糖酶及其酶学性质的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [13] 覃拥灵, 何海燕. 米曲霉耐热木聚糖酶纯化及酶学特性研究 [J]. *工业微生物* 2011, 41(4): 77-82.
- [14] 杨云龙, 黄彩梅, 白植成, 等. 金针菇菌糠中木聚糖酶的分离纯化及其酶学性质研究 [J]. *江西农业大学学报* 2015, 37(6): 1094-1099.
- [15] 孙宪昀. 斜卧青霉木质纤维素酶系的合成调控研究 [D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [16] 王希国. 梅林青霉对纤维素降解特性及机制的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.

• 写作常识 •

本刊常用的计量单位

为了更好地执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 根据国标(GB3100~3102-93)标准, 单位符号一般用英文小写(正体), 来源于人名的单位, 其符号的首字母大写, 只有体积单位升例外, 它的符号用“L (l)”, 推荐采用 L。现将本刊常用计量单位符号及与之容易混淆的符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 年用 a, 不用 y; yr; 星期、周(无符号)不用 wk; 月(无符号)不用 mo; 日用 d, 不用 day; 小时用 h, 不用 hr; 分钟用 min, 不用 m; 秒用 s, 不用 sec 表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M(克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

百分浓度: 务必注明是重量百分浓度, 还是体积百分浓度。

面积: 公顷用 hm², 不用 ha, 亩或公亩, 换算因数为 1hm² = 15 亩。

旋转速度: 用 r/min, ×g, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示, 不用大气压 at, kg/m² 或 kg/cm² 等。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 u 或 ku, 核酸用 bp 或 kb 表示。