

# 读书报告

汇报人：郭祥瑞

日期：2016-11-26



## Research Article



Received: 8 August 2014

Revised: 5 November 2014

Accepted article published: 13 November 2014

Published online in Wiley Online Library: 8 December 2014

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.4589

# Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification

Antonella Amore,<sup>a</sup> Binod Parameswaran,<sup>b</sup> Ramesh Kumar,<sup>b</sup> Leila Birolo,<sup>a</sup> Roberto Vinciguerra,<sup>a</sup> Loredana Marcolongo,<sup>c</sup> Elena Ionata,<sup>c</sup> Francesco La Cara,<sup>c</sup> Ashok Pandey<sup>b</sup> and Vincenza Faraco<sup>a\*</sup>

影响因子: 2.738



# 摘要

**背景介绍：**纤维素酶和木聚糖酶是将木质纤维素转化为可发酵糖的关键酶。 Western Ghat region（印度）是分离新微生物的活跃地区。这项工作目的是分离产生纤维素酶和木聚糖酶的微生物，主要应用在啤酒糟的糖化过程中。



**结果：**分离了93种微生物，筛选出了14种产纤维素酶和7种木聚糖酶的微生物，主要集中在XR44A菌株，产生的木聚糖酶活性高达10.5 U mL<sup>-1</sup>。

- 通过酶谱分析和蛋白质组学鉴定，XR44A木聚糖酶活性主要由一种新型的内切-1,4-β木聚糖酶发挥作用。
- 通过氨水浸泡预处理，应用在啤酒糟的糖化过程中。



**结论：**具有木聚糖酶活性的解淀粉芽孢杆菌XR44A上清液在啤酒糟的糖化过程中允许回收约43%木糖，与来自绿色木霉属的商业木聚糖酶获得的值类似，并且最大阿拉伯糖产率为92%，比商业木聚糖酶获得的产量高约2倍。



01

# 介绍



- 用于燃料生产的可发酵糖，优先通过用纤维素酶和半纤维素酶进行水解，产生的多糖对生物量的预处理来完成对木质纤维素的转化。丝状真菌是纤维素酶和半纤维素酶的主要来源。与真菌相比，研究细菌纤维素酶和半纤维素酶较多，因为细菌具有更高的生长速率等。



- 在这项研究中，解淀粉芽孢杆菌XR44A产生木聚糖酶活性，通过氨水浸泡预处理来水解啤酒糟的能力。显示新的木聚糖酶活性能够在相同的反应条件下，产生与应用预处理的BSG商业酶获得的木糖量水平相当。应用新的木聚糖酶活性产生的最大阿拉伯糖产量比应用商业酶获得的产量高约2倍。





02

## 材料与amp;方法



腐殖土

岩石

样品的分离

岩石表面

草地内部



分离

稀释、纯化、保存

筛选

CMC、木聚糖、0.1%刚果红、  
5 mol L<sup>-1</sup> NaCl

接种

单菌落、3mL、37°C

测酶活

发酵

37°C、125 rpm、  
OD<sub>600nm</sub>



# 木聚糖酶测定

- 反应混合物由1.8 mL 1.0% (w / v) 桦木木聚糖在50 mmol L<sup>-1</sup>柠檬酸钠 (pH5.3) 和0.2 mL 酶稀释液在50°C下温育5分钟。释放的还原糖通过加入3mL的3,5-二硝基水杨酸溶液，然后在95°C下温育混合物5分钟来测定，在540nm测量吸光度。定义为每分钟释放1 μ mol木糖的酶量为一个酶活单位。



# 微生物分离株的表型特征

- 每个细菌菌株的菌落的形态学分析观察形状（规则/不规则/假茎/点状/纤维状），边缘（整齐/波状），表面（干/粘性/粉状），高度（平面/凸起）和菌落的颜色。



# 阿拉伯呋喃糖苷酶活性测定

- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性，用对硝基苯基  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷（pNPA）作为底物。一个单位的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性定义为反应混合物在这些测定条件下每分钟释放  $1 \mu\text{mol}$  的对硝基苯酚中的酶量。



# 蛋白分离

- 在粗酶液中加入80%的硫酸铵，通过在4℃、7500rpm离心45分钟，回收蛋白质，加入20mmol L<sup>-1</sup> pH 7 Tris-HCl 透析。



# 酶谱分析

- 电泳后，将凝胶浸泡在缓冲液中轻轻振荡除去SDS并复性蛋白质凝胶。然后将含1%木聚糖铺在1.5%琼脂凝胶的上部，在40℃温育1小时后，用0.1%刚果红水解木聚糖。





## 最适的温度和耐热性

- 测定24小时温育后含有木聚糖酶活性的菌株XR44A的上清液以研究最适温度和耐热性。为了确定最适温度，将用于活性测定的底物（桦木木聚糖）溶解于50 mmol L<sup>-1</sup>柠檬酸钠，在40°C，50°C，60°C和70°C下进行温育（5分钟）。取出样品测定残余的木聚糖酶活性。

## 最适的pH和pH抗性

- 为了测定XR44A木聚糖酶活性的最适pH，使用溶解在50mmol L<sup>-1</sup>柠檬酸磷酸盐缓冲液中的底物桦木木聚糖进行木聚糖酶活性测定，pH值为3.0-9.0，温育5分钟，通过将其在pH 3-9柠檬酸磷酸盐缓冲液中稀释，并在25℃下温育来研究含有木聚糖酶活性的菌株XR44A的上清液的pH抗性。



## 预处理和化学成分的测定

- 由供应商提供的BSG，在实验室进行氨水溶液预处理。根据 Maurelli *et al.*所描述的，将板栗壳研磨成细粉末，添加量为10%，浸泡在5% (v / v) 氨水溶液中，然后在70°C，25mL具塞试管中温育22小时以减少蒸发。将碱性混合物以800×g离心，并用50mmol L<sup>-1</sup>乙酸钠缓冲液充分洗涤残余物，直到获得酶促糖化过程所需的pH值 (pH5.0)。



- 未处理和预处理的生物样品的碳水化合物组成根据Davis的方法测定。该方法涉及两个步骤，进行酸水解以将多糖分离成它们相应的单糖。首先，将10%样品在30°C、72%v / v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浸泡1小时；然后将混合物用蒸馏水稀释至4% (v / v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，在加入岩藻糖作为内标后，在120°C下进行第二次水解1小时。在通过0.45 μm滤膜过滤后，通过高效液相色谱法分析产物。



03

## 结论



# 分离和筛选分解木聚糖酶和纤维素酶的微生物

- 使用50个不同性质的样品，例如腐殖土，草地，岩石内部，岩石表面，排泄物，红土，用于分离细菌和放线菌。分别通过刚果红染色筛选具有木聚糖酶和纤维素酶活性的93种微生物。其在平板上显示透明圈，直径大于5mm。基于形态学分析，这些微生物主要被分为芽孢杆菌和放线菌。



# 木聚糖和纤维素分离菌的 16S rRNA基因的测序

通过16S rRNA测序

鉴定21种微生物。15种属于芽孢杆菌属，4种属于链霉菌属，1种属于嗜酸芽孢杆菌属，1种属于类芽孢杆菌属。



**Table 1.** Similarity analyses and accession number to EMBL nucleotide sequence database of the new isolates by BLAST analyses

Microorganism code	Percentage identity with other sequences	Accession number to EMBL nucleotide sequence database
Cellulolytic microorganisms		
R7A	<i>Streptomyces sp.</i> (100%)	HG975526
R10B	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975527
R13A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975528
R13B	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975529
R14B	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975530
R21A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975531
R43B	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975532
R77A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975533
R79A	<i>Streptomyces griseoruber</i> (100%)	HG975534
R79C	<i>Streptomyces costaricanus</i> (100%)	HG975535
R79A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975536
R103A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975537
R5A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975538
R55B	<i>Paenibacillus sp.</i> (100%)	HG975539
Xylanolytic microorganisms		
XR13A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975540
XR18B	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975541
XR24A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975542
XR44A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975543
XR84A	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (100%)	HG975544
XR84A	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	HG975545
XR80B	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (100%)	HG975546

在液体培养基

进一步

CMC的降解

R10A,

范围从0.4

XR76A和

0.4至0.6

为了提高

50m L,

XR18B和

别达到9

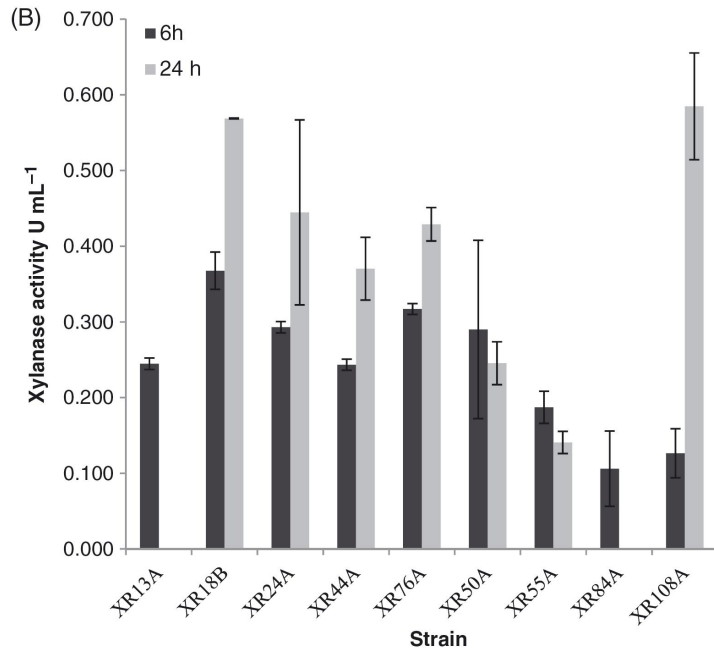
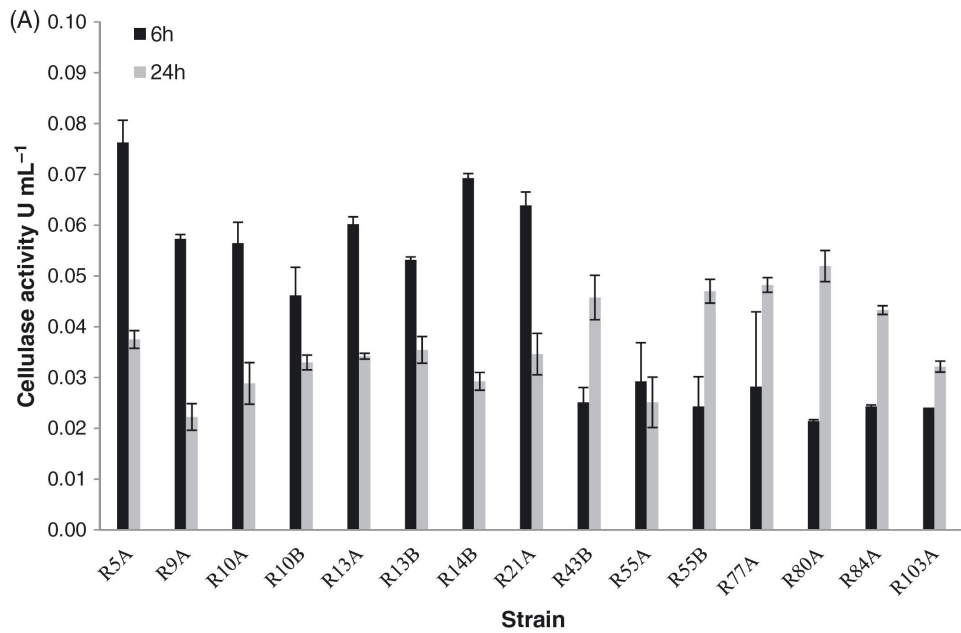


Figure 1. Screening of cellulolytic (A) and xylanolytic (B) strains in liquid medium.

%  
A,  
性  
性  
至  
于  
分



木

•

S

品

册

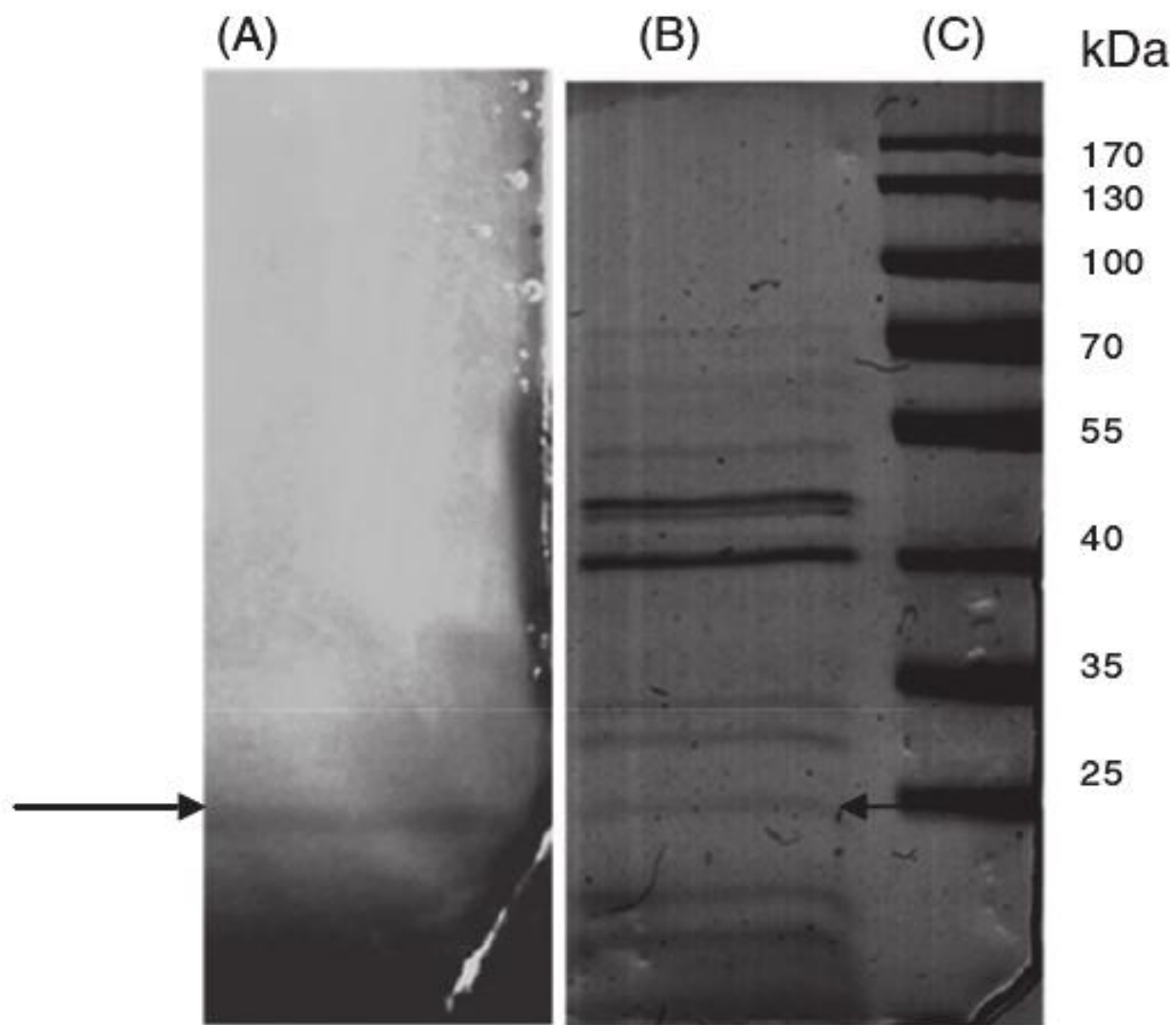
粉

禾

河

工

学

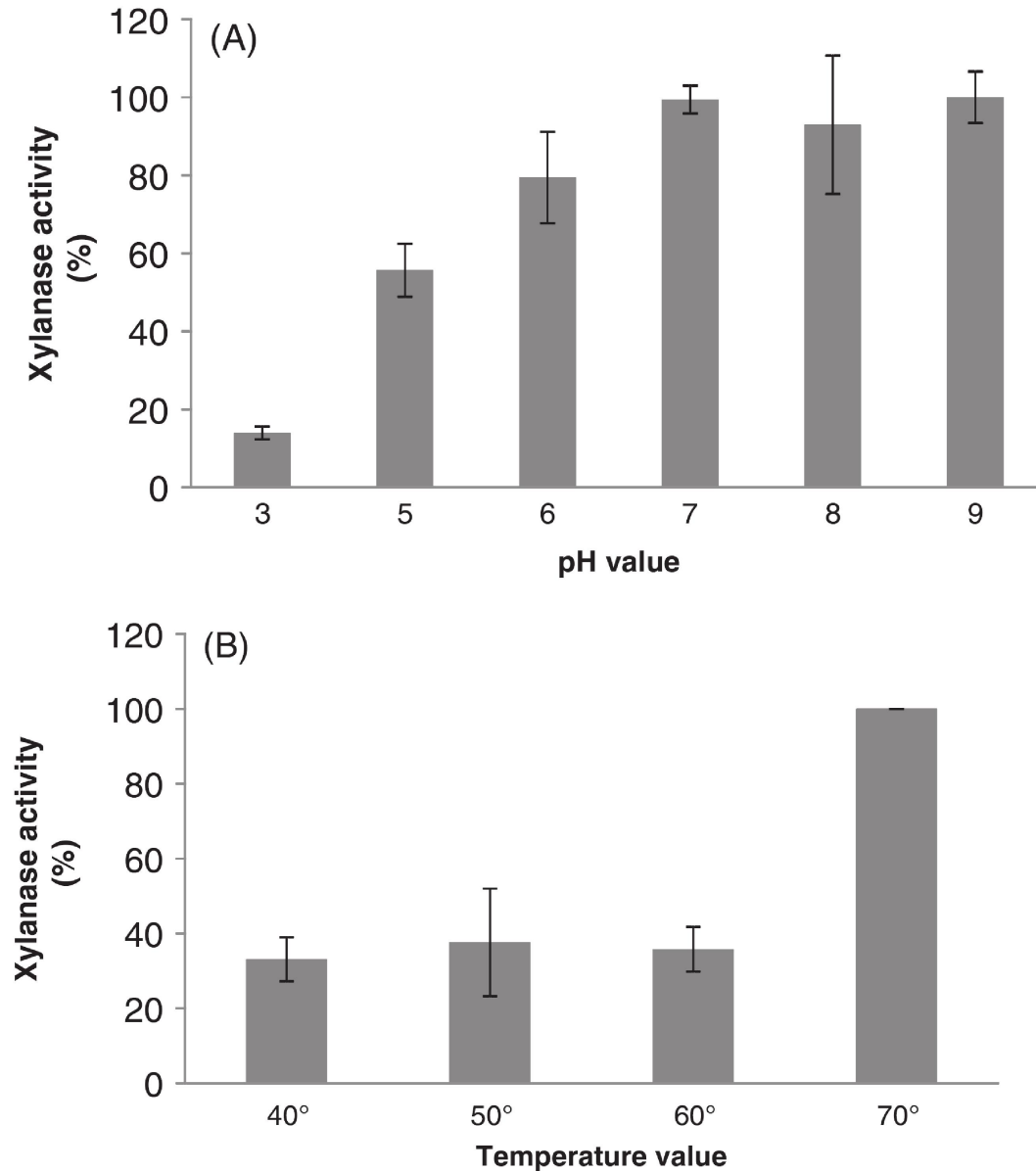


**Figure 2.** Detection of xylanase activity produced by XR44A after SDS-PAGE. Lane A: XR44A (0.25 U total xylanase activity); Lane B: XR44A (10  $\gamma$  of total protein loaded); Lane C: Markers.

性  
样  
沸  
聚  
GE  
检  
色  
鉴

# 木聚糖酶应

- XR44A木聚糖酶在50°C和60°C下至少保持90%的活性。在较宽的温度下立即失活。XR44A木聚糖酶不同pH下的活性。XR44A木聚糖酶在pH 7, pH 8



**Figure 3.** Optimum pH (A) and temperature (B) of xylanase activity produced by *B. amyloliquefaciens* XR44A.



E  
C下  
的  
的木  
90  
示较  
,

# 木聚糖酶在谷物酿造预处理中的糖化作用

**Table 3.** Macromolecular composition of BSG before and after aqueous ammonia soaking (AAS) pretreatment

	SR <sup>a</sup> (%)	Solid composition <sup>b</sup>			
		Lignin (%)	Glucan (%)	Xylan (%)	Arabinan (%)
BSG untreated	-	12.8	27.5	28.8	4.32
BSG AAS	59.96	2.09	25.9	23.3	3.26

<sup>a</sup> Solid remaining after reaction.

<sup>b</sup> Solid percentage composition based on oven dry untreated biomass.



Table 4. Results of saccharification with sigma enzymes—cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC26921 (5.4 U g<sup>-1</sup> of pretreated biomass); cellobiase from *Aspergillus niger* (145 U g<sup>-1</sup> of pretreated biomass); xylanase from *Trichoderma viride* (1.5 U g<sup>-1</sup> of pretreated biomass); -xylosidase, thermostable (0.5 U g<sup>-1</sup> of pretreated biomass) – and xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A (1.5 U g<sup>-1</sup> of pretreated biomass)

Composition	Glucose yield (%)			Xylose yield (%)			Arabinose yield (%)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Cellulase</b> Cellobiase Xylanase $\beta$ -Xylosidase	35.3	47.9	51.5	30.5	40.0	43.8	52.4	56.1	56.4
<b>Cellulase</b> Cellobiase Xylanase ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XR44A) $\beta$ -Xylosidase	35.1	74.3	79.8	24.2	43.2	43.7	48.1	70.0	92.3

# 结论

- 具有木聚糖酶活性的解淀粉芽孢杆菌XR44A的上清在啤酒糟糖化过程中可回收约43%木糖，与来自绿色木霉属的商业木聚糖酶获得的值类似，并且最大阿拉伯糖产率为92%，比商业木聚糖酶获得的产量高约2倍。

敬请各位老师同学  
批评指正

THANKS

