

密级：

论文编号：

中国农业科学院

硕士学位论文

高比活木聚糖酶 XYN-W 的高效表达 及其性质改良

Overexpression of Xylanase XYN-W with High Specific Activity and Its Improvement of Enzymatic Property

申 请 人： 王亚茹

指 导 教 师： 范云六 院士

申 请 学 位 类 别： 理学硕士

专 业： 微生物学

研 究 方 向： 微生物饲料工程

培 养 单 位： 研究生院

生物技术研究所

饲料研究所

提交日期 2006 年 5 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences

Master Dissertation

Overexpression of Xylanase XYN-W with High Specific Activity and Its Improvement of Enzymatic Properties

Candidate: Wang Yaru

Advisor: Academician Fan Yunliu

Major: Microbiology

Specialty: Microbial Feed Engineering

Chinese Academy of Agricultural Sciences

May 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名： 时间： 年 月 日

导师签名： 时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	高比活木聚糖酶 XYN-W 的高效表达及其性质改良				
论文作者	王亚茹	指导教师	范云六	培养单位	生物技术研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评 阅 人	伍宁丰	研究员	硕导	中国农业科学院生物技术研究所	分子生物学
	章引梅	副研究员	硕导	中国科学院遗传	微生物学
	李俊	副研究员	硕导	中国农科院农业资源与农业区划研究所	微生物学
答辩主席	宋未	教 授	博导	首都师范大学生物学 院	分子生物学
答 辩 委 员	张志芳	研究员	博导	中国农科院生物技术研究所	分子生物学
	张杰	研究员	博导	中国农科院植物保护研究所	微生物基因工程
	王琦	教 授	博导	中国农业大学植物病理系	微生物学
	朱昌雄	研究员	博导	中国农科院农业环境与可持续发展研究所	微生物学
答辩时间、地点		2006年5月26日, 中国农业科学院饲料研究所			
记 录		罗会颖			

摘要

木聚糖是一种由 β -1,4-木糖苷键连接形成并带有多种取代基的多聚糖，大量存在于饲料植物的细胞壁中。木聚糖可以增加单胃动物消化道内的食糜粘性，降低动物对营养的吸收和饲料消化率，是重要的抗营养因子。木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的水解酶。内切 β -1,4-木聚糖酶以内切方式水解木聚糖分子中的 β -1,4 糖苷键，是一类重要的半纤维素酶，在饲料中应用可消除饲料中木聚糖的抗营养作用，同时它还广泛应用于纸浆工业、食品工业及能源工业等众多领域。通过重组微生物反应器高效表达木聚糖酶，尤其是高比活木聚糖酶，提高其发酵效价，以进一步降低生产成本是目前木聚糖酶研究的热点之一。另外，通过对木聚糖酶蛋白进行分子改良，以提高其比活性也是进一步提高木聚糖酶应用潜力的有效途径。

瘤胃微生物 *Neocallimastix frontalis* 来源的木聚糖酶是目前发现的比活性最高的天然木聚糖酶。我们将本实验室前期克隆到的来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶基因 *xyn-w* (Genbank注册号: DQ517887) 按正确的阅读框架整合到毕赤酵母表达载体 pPIC9 上，通过电击转入毕赤酵母 GS115 中，得到重组子。重组子中表达蛋白的 SDS-PAGE 分析和酶活性测定表明，木聚糖酶基因 *xyn-w* 得到了高效分泌表达。重组菌株在 5 L 发酵罐中的高细胞密度发酵实验结果表明，木聚糖酶 XYN-W 蛋白表达量达到 1 mg/mL 发酵液，酶活性达到 13000 IU/mL 发酵液以上，比目前文献报道的木聚糖酶最高表达量高近 4 倍。表达产物经纯化后进行了酶学性质测定，结果表明，以 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan 为底物，纯化的 XYN-W 蛋白的比活性为 13795.3 IU/mg, k_{cat} 值为 2717.1 s⁻¹, K_m 值为 2.5 mg/mL, V_{max} 为 5000 μ mol/(mL · min)，最适反应温度和 pH 值分别为 60 °C 和 pH 5.6，同时各类金属离子和化学试剂对木聚糖酶 XYN-W 的酶活性影响不大。从 XYN-W 的酶学性质来看，它是一种酸性木聚糖酶，且对胰蛋白酶有很好的抗性，这一性质使其有望作为饲料添加剂应用于饲料工业中。另外，该酶对作用环境中的各种离子、表面活性剂、螯合剂不敏感，也有利于此酶在工业上的实际应用。

对 XYN-W 蛋白结构分析结果表明其 C 端 57 个氨基酸序列为连接序列和锚定区域，我们利用 PCR 方法将此段序列去除，得到截短的木聚糖酶基因序列 *xyn-m*。将重组表达载体 pPIC9-xyn-m 转化进入毕赤酵母，并筛选获得阳性重组子。摇床水平上的 SDS-PAGE 分析和表达产物的酶学测定研究表明，木聚糖酶基因 *xyn-w* 得到分泌表达。表达产物 XYN-M 经纯化后进行酶学性质测定，结果表明： XYN-M 的 K_m 值为 4 mg/mL, V_{max} 为 10000 μ mol/(mL · min)，比活为 19856.6 IU/mg, k_{cat} 值为 4433.8 s⁻¹。与纯化的亲本 XYN-W 蛋白相比，其比活性及 k_{cat} 值分别提高了 43.9% 和 63.2%。酶学性质测定结果表明， XYN-M 蛋白最适反应温度为 60 °C，最适 pH 为 5.6。与 XYN-W 相比， XYN-M 的最适 pH、pH 稳定性和最适温度无显著变化，而热稳定性略有提高。部分金属离子对 XYN-M 活性有一定影响， Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活有 10~20% 的增强作用，而 Cu^{2+} 会抑制 50% 的酶活性。 XYN-M 比活性达到 19856.6 IU/mg，高于目前报道的木聚糖酶，为木聚糖酶进一步的高效表达和降低生产成本提供了良好的材料。同时，本实验也为有针对性地进行酶分子性质改良提供了新的思路和经验。

关键词：木聚糖酶 高比活性 高效表达 毕赤酵母 性质改良

Abstract

Xylan is a polysaccharide composed of β -1,4 linked D-xylose backbone with several substituent groups, which widely presents in plant cell wall. As a kind of anti-nutritional factor, xylans can increase the viscosity of the contents of the intestinal tract of monogastrics by impeding the digestion of the nutrients for animals and lower the availability of feedstuff. Xylanase is a kind of hydrolase that can produce oligoxylose and xylose by breaking down xylan. β -1,4-endoxylanase, an important hemicellulase that cleave the internal β -1,4 linkage of the xylan, has been widely applied in feed additive industry to eliminate the anti-nutritional effect of xylan, pulp production, food industry and energy filed. Expression xylanases, especially xylanases with high specific activity by improvement their fermentation potency in recombinant microbial reactors, is one of the hotspots of research on xylanase. Additionally, developing xylanase with higher specific activity through protein engineering technique is an effective method to application of the enzyme.

Xylanase from rumen *Neocallimastix frontalis* is believed as a natural xylanase with the highest specific activity of all. *xyn-w*, a xylanase gene from *Neocallimastix frontalis*, was cloned into expression vector pPIC9. The recombinant plasmid is transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation and the resultant recombinants were obtained. It is shown that the recombinant xylanase was overexpressed by the analysis of SDS-PAGE and the determination of enzyme activity. The expression level of the recombinant xylanase is 1 mg protein and 13000 IU per milliliter of fermenter supernatant, respectively, which is 4-fold higher than that of the xylanase that was reported to be the highest expression level. The specific activity and k_{cat} value of purified recombinant xylanase are 13795.3 IU/mg and 2717.1 s^{-1} , respectively and the K_m and V_{max} are 2.5 mg/mL and 5000 μ mol/(mL \cdot min) against 4-o-Me-D-glucurono-D-xylan as substrate. The optimal temperature and pH are 60°C and 5.6, respectively. The various ions and chemicals have little effects on activity of the recombinant xylanase XYN-W. XYN-W is an acidic xylanase which is resistant to trypsin. The fine properties make it is possible that XYN-W can be used in the feedstuff as an additive. In addition, the enzyme is insensitive to various ions, detergents and chelates, which are very advantageous to be practically used in industry.

Structural prediction for the xylanase XYN-W indicated that 57 amino acids at the C-terminus of the protein were binding domain and anchored domain of the enzyme. The truncated gene *xyn-m* was obtained by a 171-nucleotide deletion at the 3' terminus of the *xyn-w* using PCR. The strains with the high-level expression of xylanase XYN-M were engineered as the method above. The specific activity and k_{cat} of the purified recombinant XYN-M were 19856.6 IU/mg and 4433.8 s^{-1} , which increased 43.9% and 63.2% compared to those of the purified XYN-W. The studies on the enzymatic properties indicated the optimal temerature and pH of XYN-M are also 60°C and 5.6, which were identical to those of the xylanase XYN-W. The thermostability of XYN-M increased a little. Some metal ions have substantial effect on the xylanase XYN-M activity. Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} increased the enzyme activity of XYN-M up to 10~20% while 50% was inhibited by Cu^{2+} . The specific activity of XYN-M was up to 19856.6 IU/mg, which is higher than the highest specific activity of xylanases ever reported. This work

lays the solid foundations for further constructing over-producing xylanase engineering strain and lowering the product cost. Meanwhile, this study provides a novel idea for the improvement of xylanases.

Key words: Xylanase, High specific activity, Overexpression, *Pichia postoris*, Improvement of enzymatic properties

目 录

第一章 综述-----	1
1. 木聚糖的分子结构-----	1
2. 木聚糖的分子生物学-----	2
2.1 概况-----	2
2.2 酶的分子结构区域 -----	4
2.3 酶的家族-----	5
2.4 酶的理化性质-----	5
2.5 酶的催化机制-----	5
2.6 酶的基因工程-----	5
3. 瘤胃微生物来源的酶-----	12
3.1 瘤胃微生物基本情况及分类-----	12
3.2 瘤胃微生物来源的酶-----	13
4. 木聚糖酶的应用-----	13
4.1 在饲料行业中的应用-----	13
4.2 在造纸工业中的应用-----	13
4.3 在食品和医药行业中的应用-----	13
4.4 在酿酒行业及其它领域中的应用-----	14
5. 巴斯德毕赤酵母表达系统-----	14
5.1 优越性-----	14
5.2 受体菌和载体-----	15
5.3 影响外源基因表达的因素及表达条件的优化-----	16
本研究的目的和意义-----	19
第二章 木聚糖酶 XYN-W 在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究-----	20
2. 1 实验材料-----	20
2. 1. 1 菌株与质粒 -----	20
2. 1. 2 试剂盒、工具酶和生化试剂-----	20

2.1.3 溶液	20
2.1.4 培养基	21
2.1.5 实验仪器	22
2.2 方法	22
2.2.1 木聚糖酶基因 $xyn-w$ 的克隆	22
2.2.2 高效表达木聚糖酶基因的重组酵母的构建	25
2.2.3 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵	27
2.2.4 木聚糖酶的纯化	28
2.2.5 木聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性的测定	28
2.2.6 木聚糖酶最适反应温度和热稳定性的测定	28
2.2.7 金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响	28
2.2.8 木聚糖酶反应初速度的测定	28
2.2.9 木聚糖酶 K_m 值及 V_{max} 的测定	29
2.2.10 木聚糖酶比活性测定	29
2.2.11 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力	29
2.3 结果	29
2.3.1 木聚糖酶酶活性测定标准曲线的绘制	29
2.3.2 木聚糖酶基因 $xyn-w$ 的克隆和表达重组质粒 pPIC9- $xyn-w$ 的构建	30
2.3.3 木聚糖酶基因 $xyn-w$ 在毕赤酵母中的表达	33
2.3.4 重组酵母在 3L 发酵罐中的细胞高密度发酵	34
2.3.5 木聚糖酶 XYNW 的纯化	35
2.3.6 最适 pH 和 pH 稳定性	36
2.3.7 XYNW 酶反应最适温度及热稳定性	37
2.3.8 不同化学试剂对 XYN-W 酶活的影响	38
2.3.9 木聚糖酶 XYN-W 的 K_m 值及 V_{max} 的测定	38
2.3.10 比活性测定	38
2.3.11 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力	39

第三章木聚糖酶 XYN-W 比活性改良-----	40
3. 1 材料及方法-----	40
3. 1. 1 材料-----	40
3. 1. 2 木聚糖酶 <i>xyn-w</i> 基因的改造-----	40
3. 1. 3 表达载体 pPIC9- <i>xyn-m</i> 的构建-----	40
3. 1. 4 <i>xyn-m</i> 在毕赤酵母中的表达-----	40
3. 1. 5 表达的木聚糖酶的纯化与酶学性质测定-----	40
3. 2 结果-----	40
3. 2. 1 木聚糖酶 <i>xyn-w</i> 基因的比活性改良-----	40
3. 2. 2 木聚糖酶高效表达重组酵母的筛选-----	41
3. 2. 3 摆床水平木聚糖酶的表达-----	41
3. 2. 4 木聚糖酶 XYN-M 的酶学性质测定-----	42
3. 2. 5 XYN-W 和 XYN-M 的性质比较-----	46
第四章 木聚糖酶 XYN-W 的饲喂试验-----	48
4. 1 木聚糖酶 XYN-W 对肉仔鸡生产性能的影响-----	48
4. 1. 1 试验方法-----	48
4. 1. 2 试验结果与分析-----	50
4. 1. 3 小结-----	53
4. 2 木聚糖酶对肉仔鸡表观代谢能和养分消化率的影响-----	53
4. 2. 1 材料与方法-----	53
4. 2. 2 试验结果-----	54
4. 2. 3 小结-----	55
第五章 结论与讨论-----	56
5. 1 结论-----	56
5. 2 讨论-----	57
参考文献-----	60
致谢-----	71
作者简历-----	72

第一章 综述

木聚糖是一种五碳糖，是植物细胞中重要的结构多聚糖，在植物细胞壁中的含量仅次于纤维素，约占细胞干重的 35%。木聚糖是半纤维素的重要组分，它是自然界中含量仅次于纤维素的第二丰富的多聚糖，几乎占地球可更新有机碳含量的三分之一 (Prade, 1995)。

木聚糖广泛存在于农业副产物如玉米芯、麦麸、米糠、秸秆、甘蔗渣等中，但这一重要的可再生资源一直难以得到有效的利用；而在造纸制浆过程中富含木聚糖的工业废料往往直接排入水体，导致水质富营养化从而严重破坏生态环境，这些现象在我国尤为突出 (孙迅等, 1998)。而另一方面，作为木聚糖水解产物主要成分的低聚木糖是一种附加值高，市场前景看好的功能性食品添加剂，目前已成为国内外竞相研究开发的功能性低聚糖之一 (许正宏等, 2001)。因此对木聚糖的有效利用和深层开发已成为目前国内外的研究热点。

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一类酶的总称，它作为一种多酶体系广泛存在于各种微生物中。在近四十年的研究历程中，各国科学家们已从不同来源的微生物中分离到大量的不同类型和功能的木聚糖酶 (孙迅等, 1998；杨瑞鹏等, 1990)，并对其酶学性质、催化机制以及分子结构有了比较详尽的研究。随着生物技术的不断发展和进步，特别是基因工程技术和蛋白质工程技术的广泛应用，对木聚糖酶的了解更加深入，已经分离出多种木聚糖酶基因，并有多种木聚糖酶产品已得到应用 (刘相梅等, 2001)。其中，木聚糖酶在饲料工业、造纸工业、能源工业以及食品医药领域的应用价值，在科学界中已引起广泛关注。

1. 木聚糖的分子结构

木聚糖是一种杂合多糖，是半纤维素的主要组成成分。其主链由多个吡喃木糖基通过木糖苷键相连。根据糖苷键的类型，木聚糖可分两种， $\beta-1,4$ -木聚糖和 $\beta-1,3$ -木聚糖。前者存在于陆生植物细胞壁中，它的主链由以 $\beta-1,4$ -糖苷键相连的 $\beta-D$ -吡喃木糖残基聚合而成；而后者存在于海洋藻类的细胞壁中，其主链由 $\beta-D$ -吡喃木糖残基通过 $\beta-1,3$ -糖苷键聚合而成 (Yamaura I, 1990)。木聚糖侧链上的取代基主要有乙酰基、 $4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸$ 残基、 $\alpha-D-阿拉伯糖$ 残基等。这些侧链以共价或非共价形式与木质素、纤维素及其他聚合物相连接，组成植物细胞重要的结构—细胞壁 (Gregory *et al.*, 1998)。不同来源的木材中，木聚糖以不同形式存在。在阔叶树中木聚糖以 $O-乙酰-4-O-甲基葡萄糖醛酸$ 木聚糖形式存在，聚合度为 150~200，且具有高度的乙酰化；在针叶树中木聚糖是非乙酰化的，以 $D-阿拉伯糖-4-O-甲基葡萄糖醛酸$ 木聚糖形式存在，聚合度为 70~130；而一年生植物及草中的木聚糖是阿拉伯木聚糖。同型线性木聚糖主要存在于茅草、烟草和海藻中。不同植物或同一植物不同的生长阶段，木聚糖的组成成分及其多聚化程度都有所不同，由于其异质性和复杂性，木聚糖的完全水解需要多种不同类型酶的协同作用 (Collins, 2004)。不同植物中木聚糖的含量也有所差别，一般硬材中所含木聚糖比软材中多，硬材中木聚糖能占到干重的 15%~30%，软材中一般占干重的 7%~10%。在某些一年生植物如小麦、甘蔗、棉子壳中，木聚糖含量非常高，一般含量能达 30%以上 (Prade, 1995)。

图 1-1 所示是木聚糖的主要结构特征 (朱静等, 1996)。可以看出，木聚糖的主链与纤维素很类似，只是其单体为 D-木糖而非 D-葡萄糖。一般在 C-2、C-3 位上易乙酰化，葡萄糖醛酸

残基则以 O—键连在 C—2 位上, 阿拉伯糖残基多出现于 C—2、C—4 位上。这些侧链类型及杂合程度的不同直接影响木聚糖的溶解性、天然构象及与其它结构多糖分子的结合情况, 因而也极大影响了木聚糖酶的作用方式及效率 (Kuldarni *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000)。

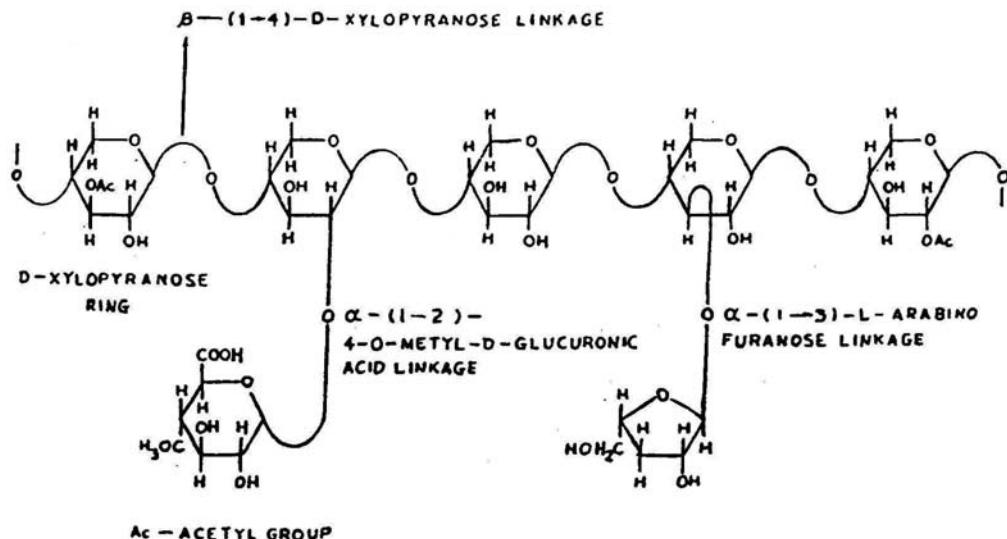


图 1-1 木聚糖的结构

Fig. 1-1 Structure of Xylan

2. 木聚糖酶的分子生物学

2.1 概况

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一类酶的总称。由于木聚糖分子结构的复杂性, 要将其完全水解需要多种酶的参与: 如内切-1, 4- β -木聚糖酶 (EC3.2.1.8) 作用于木聚糖主链, 随机的切开木聚糖内部的木糖苷键, 将其分解为低聚糖; β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37) 作用于木寡糖的非还原性末端, 释放出木糖及木二糖。同时由于木聚糖多为异聚多糖, 主链和侧链上均有多种取代基团, 因此将它彻底水解还需要一些特异性酶的作用, 如木聚糖侧链的水解需要 α -L-阿拉伯呋喃糖酶 (EC3.2.1.55)、 α -D-葡萄糖醛酸酶 (EC3.2.1.139)、乙酰木聚糖脂酶 (EC3.1.1.72)、阿魏酸酯酶 (EC3.1.1.73) 等多种水解酶的共同作用 (Collins, 2004)。另外在海洋微生物中还存在一种 β -1, 3-木聚糖酶 (1, 3- β -D-xylanohydrolase: EC3.2.1.32) (Yamaura I, 1990)。图 1-2 为不同木聚糖酶的作用位点。

自然界中多种生物可产木聚糖酶, 包括细菌、真菌、放线菌、海藻、原生动物、腹足动物和人。重要的产木聚糖酶微生物包括: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*)、粪肥杆菌 (*Cellulomonas fimi*)、简青霉 (*Penicillium simplicissimum*) 等。细菌与真菌所产的木聚糖在性质上有一定的差异 (Subramaniyan, 2002)。细菌所产的木聚糖酶具有较好的耐温和耐碱性, 同时其所产的木聚糖酶的纤维素酶活性较低。例如: *Bacillus circulans* 所产的一种木聚糖酶其最适 pH 值为 7.0, 同时在 pH 9.2 时仍具有 40% 的活性 (Ratto, 1992); *Dictyoglomus* sp. 所产木聚糖酶其最适反应温度为 90°C, 在 pH 5.5~9.0 的范围内

都具有较高酶活性 (Mathrani, 1992)；*Streptomyces cuspidosporus* 在含有木聚糖的培养基中木聚糖酶的表达量可达到 40~49U/mL, 但它的纤维素酶活性只有 0.29 U/mL (Masheshwari, 2000)。而真菌所产的木聚糖酶其产量一般较细菌的木聚糖酶高，在酸性条件下有较高的酶活性，耐受的 pH 范围一般在 4.0~7.5 之间，同时它的纤维素酶活性较高。例如 *Streptomyces cuspidosporus* 所产木聚糖酶活性可达 1244 U/mL 但同时其纤维素酶活性也可达 65.3 U/mL (Steiner, 1987)。除了不同的木聚糖酶以外，许多微生物还可以产生复合木聚糖酶，它们具有不同的物理化学性质、结构、比活性和产量；复合木聚糖酶的底物结合位点不同，对多糖骨架上连续的未取代木糖残基的数目要求不同，同时又具有重复却不相同的特性，从而提高了水解的效率并扩大了水解范围。例如 *Aspergillus niger* 可产 15 种胞外的木聚糖水解酶，*Trichoderma viride* 可产 13 种木聚糖水解酶 (Biely, 1985)。造成木聚糖酶多型性的原因很多，或是由于蛋白酶的部分水解，或是由于不同程度的糖基化和酰胺化，或者它们根本就是不同基因的产物 (朱静等, 1996)。

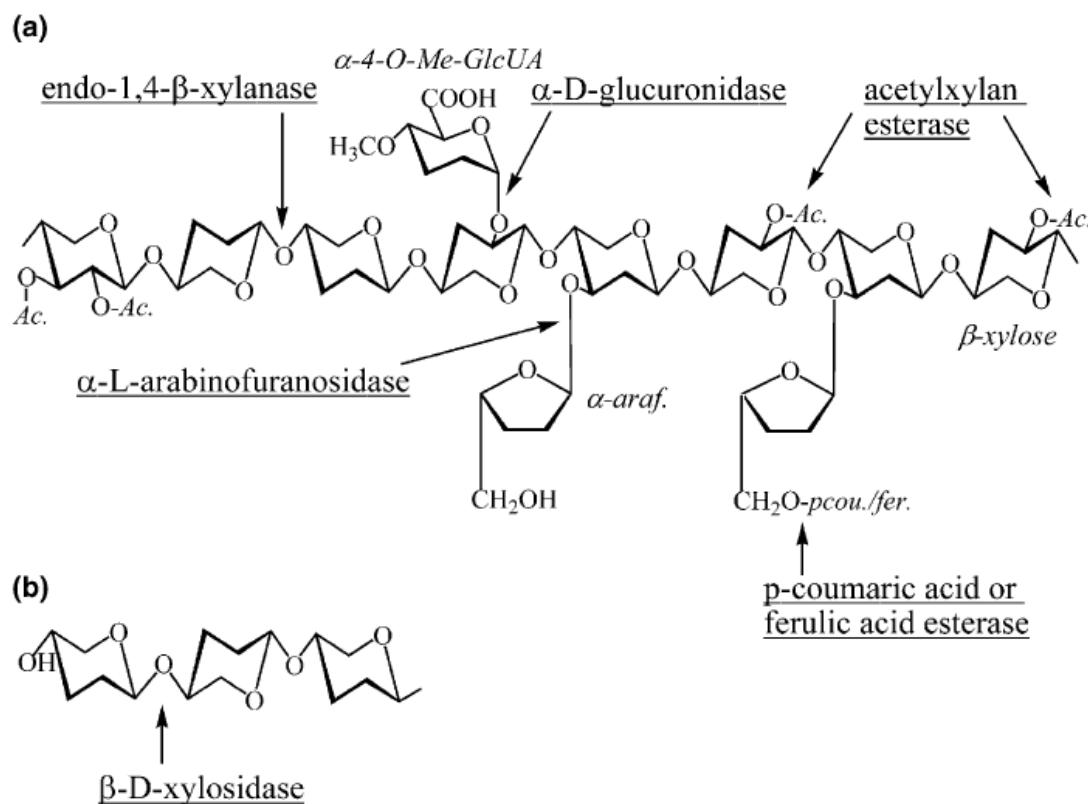


图 1-2 不同木聚糖酶的作用位点

Fig. 1-2. The sites of xylan attack by xylanolytic enzymes.

木聚糖酶一般在木聚糖及木聚糖水解物的诱导下表达，而受到葡萄糖的抑制，但也有组成型表达的木聚糖酶。不同的诱导底物及培养基的组成成分都会影响到木聚糖酶的活力及其产物成分 (刘超钢等, 1999; 孙迅等, 1999; 洪枫等, 1998; Shamala *et al.*, 1986)。在研究 *Trichoderma* 及 *Aspergillus* 的产酶情况时发现，如果用木聚糖作为唯一碳源，它们就会选择性地只产生木聚糖

酶, 当用纤维素作为碳源时, 则更多地产纤维素酶。

同一种酶作用于不同的底物, 得到的产物也不同。如橄榄绿链霉菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 产生的木聚糖酶以玉米芯作为诱导底物时, 得到的产物主要有阿拉伯木二糖, 阿拉伯木三糖, 阿拉伯木四糖 (Shigeki *et al.*, 1990)。而用米糠作诱导底物时, 得到的产物主要有阿拉伯木二糖, 阿拉伯木三糖, 葡糖醛酸木三糖和甲基葡糖醛酸木三糖 (Shigeki *et al.*, 1990; Shigeki *et al.*, 1994; Shigeki *et al.*, 1994)。一些农业副产物玉米芯、麦麸、米糠、秸秆、甘蔗渣等是很多微生物产酶的适宜底物, 这为它们的工业应用奠定了基础。

2. 2 酶的分子结构域

不同微生物产生的木聚糖酶在结构和性质上有很大的差别。木聚糖酶有的只含有单一区域即催化区, 也有的同时具备催化区和多种非催化区。多区域木聚糖酶分子结构中含有催化区 (Catalytic Domain, CD)、纤维素结合区 (Cellulose-Binding Domain, CBD)、木聚糖结合区 (Xylan-binding Domain, XBD)、锚定区 (Dockerin Domain, DD)、连接序列 (Linker Sequence)、重复序列 (Repeated Sequence)、热稳定区 (Thermostabilising Domain) 及其它未知功能的非催化区等, 这些区域担负着不同的生理功能。不同木聚糖酶所包含的区域差别较大, 有的仅具有其中的一种或几种, 有的则包含以上所有区域 (刘瑞田等, 1998; Gilkes *et al.*, 1991)。

木聚糖酶的催化区承担着酶的水解功能, 并作为该酶分类的基础。虽然不同木聚糖酶分子在其氨基酸组成的数目和种类上相差很大, 但它们的催化区在大小上比较一致, 在催化区特定位置的谷氨酸和天冬氨酸对催化特性是非常关键的。同一族的木聚糖酶的催化结构域具有序列同源性, 11 家族木聚糖酶分子有 40%~90% 的相似性, 而 11 家族和 10 家族之间木聚糖酶催化区的氨基酸序列和催化基团的周围序列无有意义的同源性, 这表明两个家族在进化上来源于不同的基因, 并具有不同的折叠方式。有些木聚糖酶分子中含有两个 CD 区域, 如琥珀酸纤维杆菌 (*Fibrobacter succinogenes*) S₈₅ 的分子量为 66.4 kDa 的木聚糖酶中含 A、B 两个催化区域, 两区域有 56.5% 的同源性。B 区域属于 10 族木聚糖酶的催化区, A 区域属于 11 族木聚糖酶的催化区。对 10 族和 11 族木聚糖酶催化区晶体结构的分析表明, 第 10 族木聚糖酶催化区形成 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 而第 11 族木聚糖酶形成 β -折叠结构 (Neeta Kulkarni, 1999)。到目前为止, 有六种以上第 10 族木聚糖酶的催化区取得了高清晰度的 X-Ray 结构 (Zui *et al.*, 2000; Zui *et al.*, 1997)。

木聚糖酶的底物结合区差异较大。一些木聚糖酶的底物结合区对木聚糖有特异性, 所以又称之为木聚糖结合区 (XBD) (Schmidt *et al.*, 1999)。一般这些底物结合区并不影响酶的催化活性, 但对不溶性底物有着特殊作用。如 *Streptomyces Olivaceovividis* E-86 中的 FXYN 酶, 它包含有催化区域及 XBD, 在天然状态下, 它既能分解可溶性木聚糖, 也能分解不溶性木聚糖, 而如果人工除去 XBD, 它就不能降解不溶性木聚糖, 但不会影响对可溶性木聚糖的降解效率。所以 XBD 对降解不溶性底物是必不可少的 (Zui *et al.*, 2000)。

在木聚糖酶分子中常含有一种独立的无催化功能的区域, 即纤维素结合结构域 (CBD)。根据氨基酸序列的同源性, 木聚糖酶及纤维素酶可分为 10 多种类型的纤维素结合区, 该区域可以和结晶纤维素结合, 其主要特征是: (1) 在靠近 N2 末端和 C2 末端分别有一个 Cys; (2) 除 Gly 和 Asp 之外还含有 4 个很稳定的 Trp; (3) 带电氨基酸的含量低。将 CBD 或 CBD 中间区域、连接序列一并

除去, 仅影响酶与纤维素的结合能力, 但酶的底物特异性、酶活性和 K_m 值, 以及对可溶性的木聚糖酶的水解能力不变(刘瑞田等, 1998)。

木聚糖酶分子中的功能区域之间由连接序列相连, 此序列的长度变化很大, 一般为 6~59 个氨基酸。该序列中或含有较多的丝氨酸残基, 或含有较多的脯氨酸和苏氨酸, 不同来源木聚糖酶的连接序列之间同源性一般不高。木聚糖酶的连接序列的组成和功能与某些免疫球蛋白、核糖体蛋白、丙酮酸脱氢酶复合物中的连接序列相似, 将酶的不同功能区域分开可使酶具有较高的柔韧性、伸展性, 使酶和底物能够更有效地结合 (Black *et al.*, 1994)。

在许多木聚糖分子中都含有重复序列, 其长度为 20—150 个氨基酸残基, 至于其功能, 有人认为它是连接序列的一部分或担负有其它功能 (刘瑞田等, 1997)。

另外, 在某些微生物中的木聚糖酶中有某些区段可增加相应酶的最适作用温度, 可称为热稳定区 (Fontes *et al.*, 1995; Saul *et al.*, 1995)。这方面的报道还不算太多, 有待更多研究证实。

2. 3 酶的家族

Wong 等按照木聚糖酶的物理化学性质例如酶的分子量和等电点将微生物来源的木聚糖酶分成两个组群。一个组群由高分子量(>30kDa)低等电点的酶组成, 另一个组群则为低分子量(<30kDa)高等电点的酶(Wong, 1998)。但是这种分组方法不能包括所有的木聚糖酶, 有大约 30% 的木聚糖酶特别是真菌来源的酶不能按此方法归类。

Henrissat 等在 1989 又发展了另一种分类方法, 可以将常见的木聚糖酶和糖苷酶分为不同的家族。这种方法按照酶的催化结构域的初级结构的不同将酶分为不同的家族(Henrissat, 2001)。最初时将纤维素酶和木聚糖酶分为了 6 个家族(Henrissat, 1989), 随着糖苷酶序列的不断发现, 到 1999 年这一分类系统已经包含有 77 个不同家族(Henrissat, 2001), 到 2005 年达到 96 个家族。由于酶的高级结构和分子机制是与初级结构密切相关的, 所以这种分类系统也反映了不同家族的酶在分子结构和机制上的不同特点。同一家族的酶具有相似的三维结构和分子机制。在这一分类系统中, 一般认为木聚糖酶仅局限于家族 10 和 11, 但近年来的研究发现在 5、7、8、16、26、43、52 和 62 家族中也有一些酶具有木聚糖酶活性, 然而只有 5、7、8、10、11 和 43 家族的木聚糖酶具有真正严谨的内切-1, 4- β -木聚糖酶催化结构域。16、52 和 62 家族的木聚糖酶是双功能酶: 具有一个木聚糖酶催化结构域和一个糖苷酶催化结构域。而 26 家族的木聚糖酶是内切-1, 3- β -木聚糖酶 (Collins, 2005)。

在这一分类系统中, 10 和 11 家族是最主要的木聚糖酶家族。10 家族不仅包括内切-1, 4- β -木聚糖酶, 还包括内切-1, 3- β -木聚糖酶和纤维二糖水解酶等其他酶系。这一家族的酶具有高分子量和低等电点, 分子结构中有 $(\alpha / \beta)_8$ 桶状结构(Lo Leggio L, 1999)。10 家族木聚糖酶一般具有 4 到 5 个底物结合位点(Biely, 1997; Derewenda U, 1994), 主要作用于非还原末端的取代基或者 1, 3- β 键。第 11 家族的酶都是木聚糖酶, 这一家族的酶具有低分子量和高等电点, 分子结构中有 β 折叠结构。与 10 族木聚糖酶相比较, 11 家族的酶具有较多的底物结合位点, 例如来源于 *Schizophyllum commune* 和 *A. niger* 的 11 家族木聚糖酶最少具有 7 个底物结合位点(Vrsanska M, 1982; Bray, 1992)。11 家族木聚糖酶主要作用于长链的木寡糖, 其作用产物可以被 10 家族木聚糖酶进一步分解(Biely, 1993)。

2. 4 酶的理化性质

微生物木聚糖酶是分子量在 8~145kDa 的单亚基蛋白质，无论是来源于真菌中还是从细菌中，内切型木聚糖酶最适温度一般在 40℃~60℃之间。一般细菌来源的木聚糖酶比真菌来源的木聚糖酶热稳定性好，但真菌来源的木聚糖酶也有耐高温的，如 *Ceratocystis paradoxa* 产生的木聚糖酶能在 80℃下存活 1 小时。不同微生物所产木聚糖酶所能耐受的 pH 值范围一般是 3~10，最适 pH 值一般为 4~7。一些真菌如 *Aspergillus Kawachii* 和 *Penicillium herpue* 产生的木聚糖酶最适 pH 值可以是 2~6。不同木聚糖酶的等电点在 3~10 之间 (Kuldarni *et al.*, 1999; 日下部功等, 1969)。

根据多种木聚糖酶的氨基酸组成及其三维结构分析可以看出，谷氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸对其催化特性及耐碱、耐热性等是非常关键的。在许多真核微生物所产木聚糖酶中发现糖基化的现象是很普遍的，如耐温真菌 *Talaromyces byssochlamydooides* YH-50 木聚糖酶的糖基组成为甘露糖、葡萄糖和岩藻糖。另外一些来源于 *Clostridium stercorarium*, *Streptomyces* sp. 和碱性耐温 *Bacillus* sp. 等原核微生物的木聚糖酶已被证实是糖蛋白。通常认为糖基化与酶抵御极端环境维持其稳定性相关，不同的糖基化作用是木聚糖酶多样性的主要原因之一。

2. 5 酶的催化机制

关于木聚糖酶的催化机理，人们通常认为水解作用会导致糖的还原及糖单体异构中心的转化或保留，这说明在水解过程中包含一步或两步的化学转化状态。糖基转移通常会导致异构中心的饱和碳会被保留或转化的异构结构亲核取代。大多数的多聚糖水解酶，例如纤维素酶和木聚糖酶，对底物的水解都伴随着 C1 异构结构的保留。Leggio 等在对来源于 *Pseudomonas fluorescens* 的木聚糖酶 A 的晶体学研究的基础上，结合前人的理论和自己的研究结果，提出了目前被广为认可的酶催化机理：(1) 木聚糖被木聚糖酶识别并以三折叠左手螺旋的方式与之相连；(2) 处于-1 位的木糖残基被扭曲并拉向催化残基，糖苷键被拉紧并断裂，形成酶-底物中间体；(3) 被激活的水分子攻击中间体，经过异构结构的亲核取代，形成最后的水解产物 (Leggio, 2000)。

2. 6 酶的基因工程

2. 6. 1 木聚糖酶基因的克隆及表达

自七十年代末，八十年代初开展木聚糖酶基因的研究工作以来已有三百多种来自细菌和真菌的木聚糖酶基因被克隆，上百种基因在不同宿主菌中得到表达。不同种类微生物编码木聚糖酶的基因有所不同，即使是同种微生物也常常编码多种木聚糖酶基因。如 2004 年 Chang P 等从一株碱性芽孢杆菌 *Bacillus firmus* 中克隆到两个编码木聚糖酶的基因 (*Xyn10A*, *Xyn11A*)，它们分别编码 45 和 23 kDa 的木聚糖酶，两个木聚糖酶基因都在大肠杆菌中得到了表达。表 1-2 列举了部分克隆到的木聚糖酶基因。

表 1—1 微生物来源的部分木聚糖酶性质

Table 1-1 Properties of Xylanases from Microorganism

菌 株 来 源	分子量 (kDa)	等电点 pI	最适 pH	最适温 度(℃)	Km (mg/mL)	Vmax (umol/min/mg)	参考 文献
细菌							
<i>Aeromonas caviae</i>	20	7.1	7	50	9.4	4330	Kubata,K.B. 1992
<i>ME1</i>							
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	18.5~19.6	10.1	6.8~7.0	80	-	-	Breccia,J.D. 1998
<i>Bacillus sp. Strain SPS-0</i>	99	-	6.0	75	0.7	145	Esteban,R.1982
<i>Bacillus sp.</i>	21.5	8.5	6	65	4.5	-	Akiba,T.1988
<i>W1(JCM2888)</i>	49.5	3.7	7.9	70	0.95	-	
<i>Bacillus sp. Strain 41-1(36)</i>	36	5.3	9	50	3.3	1100	Nakamura,S.1993
<i>Bacillus sp. Strain TAR-1</i>	40	4.1	6	75	-	-	Nakamura,S.1994
<i>Bacillus stearothermophilus T-6</i>	43	9	6.5	75	1.63	288	Khasin,A.1993
<i>Streptomyces T-7</i>	20.643	7.8	4.5~5.5	60	10	7600	Kesker,S.S.1989
<i>Streptomyces</i>	50	7.1	5.5~6.5	60~65	9.1	-	Nakanishi,K.1992
	25	10.26	5.0~6.0	60~65	-	-	
	25	10.26	5.0~6.0	60~65	11.2	-	
<i>Thermotoga thermarum</i>	266	-	6	80	0.36	1.18	Bergquist,P.2001
	35	-	7	90~100	0.24	19.5	
真菌							
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	-	7.0	55	16~40.91	-	Salles,B.C. 2000
<i>Aspergillus awamori</i>	39	5.7~6.7	6	56	1.0	10000	Kormelink,F.J.M.1993
	23	3.7	5.0	60	0.33	3333	
	26	3.3~3.5	5.5	50	0.09	455	
<i>Aspergillus nidulans</i>	34	3.4	6	56	0.97	1091	Fernandez-Espinar M.T.1994
<i>Aspergillus sojae</i>	32.7	3.5	5.0	60	-	-	Kimura,I. 1995
	35.5	3.75	5.5	50	-	-	
<i>Aureobasidium pullulans Y-2311-1</i>	25	9.4	4.8	54	7.6	2650	Li,X.l.1993
<i>Aureobasidium pullulans ATCC 42023</i>	21	-	3~4.5	35	2.93	866	Vadi,R.M.1996
<i>Cephalosporium sp. strain RYM-202</i>	35	6.3	7.5~8.0	50	5.26	118.4	Kang,M.K.1996
	24	4.4	7.5~8.0	50	4.16	145.2	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33	8.6	7.0	60	-	-	Belancic,A.1995
	23	5.9	3.5	50	-	-	
<i>Penicillium SP.40</i>	25	4.7	2.0	50	-	-	Kimura.2000
<i>Aspergillus niger</i>	23	-	5.5	50	7.1	3881	Levasseur A.2005
<i>Phanerochaete</i>	52	-	4.5	70	3.71	-	Decelle.2004
<i>Neocallimastix frontalis</i>	67	-	7	55	6.1	-	Huang.2005
	37	-	7	60	6.4	-	

表 1-2 克隆出的部分木聚糖酶基因

Table 1-2 Summary of gene cloning of xylanase

菌株来源	基因名称	参考文献
<i>Thermotoga neapolitana</i>	<i>xynA</i>	Zverlov <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>xynA, B</i>	Jung <i>et al.</i> , 1998
<i>Trichoderma iongibrachiatum</i>	<i>xyn</i>	Bedford <i>et al.</i> , 1997
<i>Thermomyces ianuginosus</i>	<i>xyn</i>	Hansen <i>et al.</i> , 1998
<i>Fibrobacter succinogens</i>	<i>xynC</i>	Paradis <i>et al.</i> , 1993
<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>xynC</i>	Clarke <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhodothermus marinus</i>	<i>xynI</i>	Nordberg <i>et al.</i> , 1997
<i>Caldicellulosiruptor Rt69B</i>	<i>xynA, B, C, D</i>	Morris <i>et al.</i> , 1999
<i>Cellulomonas sp.</i>	<i>Xcs16</i>	Chaudhary <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptomyces halstedii</i>	<i>xysI</i>	Alberto <i>et al.</i> , 1997
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	<i>xynB</i>	Morris <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus strain N137</i>	<i>xyA</i>	Tabernero <i>et al.</i> , 1995
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>xynA</i>	Winterhalter <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>xynA</i>	Cho <i>et al.</i> , 1999, Gat <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus sp.</i>	<i>XynB</i>	Jeong <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	<i>xynA</i>	Liu <i>et al.</i> , 1996; Lee <i>et al.</i> , 1993
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	<i>xynA</i>	Ernst <i>et al.</i> , 1990
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>xynD</i>	Flint <i>et al.</i> , 1993
<i>Cochliobolus carbonum</i>	<i>xylI</i>	Apel <i>et al.</i> , 1993
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>xynB</i>	Lin <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>xynA, B, C</i>	Moreau <i>et al.</i> , 1994
<i>Penicillium sp.40</i>	<i>xynA</i>	Kimura <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus sp.BT-7</i>	<i>bXI, 2, 3</i>	汤海妹等, 1999
<i>Streptomyces olivaceoviridis E-86</i>	<i>fxyn</i>	Atsushi, <i>et al.</i> , 1998 Atsushi, <i>et al.</i> , 1999; Satoshi <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Xyn11A</i>	Martinez, <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>xynA</i>	Huang, <i>et al.</i> , 2005
<i>Lentinula edodes</i>	<i>Xyn11A</i>	Lee CC, <i>et al.</i> , 2005
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>xynA, B, C</i>	Decelle B, <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Xyn10A, xyn11A</i>	Chang P, <i>et al.</i> , 2004

1) 木聚糖酶基因在原核生物中的表达

自从 1983 年, Panbangred.W 等科学家首次利用大肠杆菌表达矮小芽孢杆菌 (*Bacillus.pumilus* IOP) β -木聚糖酶以来 (Panbangred W, 1983), 已有数十种不同来源的木聚糖酶基因在原核生物表达系统中实现了表达。由于克隆的木聚糖酶基因表达水平往往比在原始菌株中低, 许多研究者尝试通过改变宿主菌和使用具有高效表达启动子的载体构建新型高效表达基因工程菌, 这不仅提高了酶的表达量而且使一些木聚糖酶能分泌到胞外。1990 年 Luthi 等用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为受体菌尝试表达来源于 *Caldocellum saccharolyticum* 的耐热木聚糖酶基因 *xynA*, 控制 *xynA* 的启动子采用表达载体 pJLA602 上的温度诱导的 pR 和 pL 启动子, 结果显示表达产物 XYNA 的表达量可达到细胞总蛋白的 20% 以上, 并且表达的 XYNA 具有正常的生物学活性, 与原始天然酶无显著差异 (Ernst *et al.*, 1990)。1990 年 Whitehead 使用大肠杆菌-类菌体穿梭载体将栖瘤胃拟杆菌的木聚糖酶基因结合转移至脆弱拟杆菌和单型拟杆菌中, 该基因在这两种菌中都能表达, 粗酶液的酶活分别是原始菌株的 1400 倍和 1600 倍 (Whitehead TR, 1990)。2006 年 Ruller 将来源于 *Bacillus* 的木聚糖酶基因及其启动子 BsXA 一起整合到大肠杆菌表达载体 pT7T3 上, 构建了重组表达载体 pT7BsXA 并在大肠杆菌 DH5 α 中得到了表达, 表达量比原菌中提高了 19 倍 (Ruller, 2006)。

表 1-3 部分在大肠杆菌中表达的木聚糖酶基因

Table 1-3 Expression of xylanase genes in *E. coli*

菌株	载体	宿主菌	参考文献
<i>Aeromonas</i> sp. no. 212	pBR322	<i>E. coli</i> HB101	Kudo T <i>et al.</i> , 1985
<i>Anaerocellum thermophilum</i> Z-1320	pUC18	<i>E. coli</i>	Bolshakova <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus circulans</i>	pUC19	<i>E. coli</i> HB101	Yang <i>et al.</i> , 1989
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c	pLS206	<i>E. coli</i> C600	Lin <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus lyticus</i>	pHB 201	<i>E. coli, Bacillus subtilis</i>	Srivastava <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus pumilus</i>	pBR322	<i>E. coli</i> C600	Panbangred <i>et al.</i> , 1983
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	T-7	<i>E. coli</i>	Lapidot <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus</i> sp. strain C-125	pBR322	<i>E. coli</i> HB101	Honda <i>et al.</i> , 1985
<i>Bacteriodes ovatus</i>	pUC18	<i>E. coli</i> JM83	Whitehead <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacteroides ruminicola</i> 23	pVAL-1	<i>E. coli, B. fragilis</i>	Whitehead <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacteroides succinogenes</i>	pBR322	<i>E. coli</i> HB101	Sipat <i>et al.</i> , 1987
<i>Chainia</i>	gt10 pUC8	<i>E. coli</i>	Chauthaiwale <i>et al.</i> , 1992
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	pJLA602	<i>E. coli</i>	Luthi E <i>et al.</i> , 1990
<i>Clostridium stercorarium</i> F-9	pBR322 pUC118	<i>E. coli</i> JM109	Fukumura <i>et al.</i> , 1995
<i>Clostridium thermocellum</i>	pUC19	<i>E. coli</i> HB101	Grepinet <i>et al.</i> , 1988
<i>Dictyoglomus thermophilum</i> Rt46B.1	pJLA602	<i>E. coli</i> JM101	Morris <i>et al.</i> , 1998
<i>Fibrobacter succinogenes</i> 135	GtWES pBR322	<i>E. coli</i> ED8654	Hu <i>et al.</i> , 1991
<i>Neocallimastix patriciarum</i> 27	pUC18 pUC19	<i>E. coli</i> HB101	Lee <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp	pUC18	<i>E. coli</i> JM83	Gilbert <i>et al.</i> , 1988
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-11543	pUC19	<i>E. coli</i> DH5 α F'	Basaran <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	pUC8	<i>E. coli</i>	Srivastava <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptomyces thermophilus</i> OPC-520	pUC18, pIJ702	<i>E. coli</i> JM109	Tsujibo <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> A1	PET-22(+)	BL21	张红莲等, 2003
<i>Thermomonospora fusca</i>	Δ gWES, λ B, pBR322	<i>E. coli, S. lividans</i>	Ghangas <i>et al.</i> , 1989
<i>Vibrio</i> sp. strain XY-214	PBluescript II KS(−)	<i>E. coli</i> DH5	Toshiyoshi <i>et al.</i> , 2000

尽管已有许多不同来源的木聚糖酶基因在大肠杆菌中获得了表达,但许多问题影响了外源木聚糖酶基因在大肠杆菌中的有效表达,如:有的基因含有稀有密码子,蛋白合成后需要特殊的折叠和修饰,寄主细胞无法识别外源基因启动子和信号肽,另外以及大肠杆菌中蛋白酶对目的蛋白有降解作用等。而利用同源宿主来表达外源基因,使这些问题得到了有效地解决。实验证明,来源于芽孢杆菌的木聚糖酶在同源宿主中的表达量远高于大肠杆菌(Panbangred.W, 1985)。Mondou.F.利用多拷贝质粒 PIJ702 将 *S.lividans*#1326 木聚糖酶基因克隆进木聚糖酶缺陷型 *S.lividans* 菌株中,不仅实现了分泌表达,表达量也较原始菌株提高近 60 倍,达到 380U/mL (Mondou.F, 1986)。而另一来源于 *Streptomyces* sp 的木聚糖酶基因在 *S.lividans* TK21 中的表达量达到 2839 U/mL (Iwasaki.A, 1986)。

2) 木聚糖酶基因在真核生物中的表达

目前,在真核基因的表达系统中应用最普遍的是酵母表达系统、昆虫细胞表达系统、动物乳腺表达系统、丝状真菌外源表达系统、植物基因表达系统以及 T7RNA 聚合酶-Φ10 启动子偶联表达系统等。迄今为止,已有多种不同来源的木聚糖酶在酵母中实现了高效表达。

1992 年 Alain Moreau 首先将微白色隐球菌 (*Cryptococcus albidos*) 木聚糖酶的编码基因序列插入到 pVT100 上,分别使用原基因的启动子和乙醇脱氢酶 (ADH1) 启动子尝试在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中进行表达(Moreau A et al., 1992)。1996 年 Daniel C 报道了将 *Trichoderma reseesi* QM 6a β -1,4 木聚糖酶基因 *XYN2* 克隆进多拷贝穿梭质粒 *URA3* 中,分别使用乙醇脱氢酶 II (ADH2) 和磷酸甘油激酶 (PGK) 的启动子和终止子在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中实现了该酶的表达,表达量分别为 72 U/mL 和 9.6 U/mL(la Grange DC et al., 1996)。2003 年来源于橄榄绿链霉菌 A1 (*Streptomyces olivaceoviridis* A1) 的木聚糖酶基因 *Xynb* 在毕赤酵母中进行了高效表达,在 5 L 发酵罐中木聚糖酶 XYNB 的绝对表达量达到 1.4 mg/mL 发酵液,酶活性达到 1200 U/mL 发酵液(何永志, 2004)。

近几年来随着基因工程技术的飞速发展,科学家们也成功的在植物和哺乳动物中表达了木聚糖酶基因。Herbers 等首先将来源于 *Clostridium thermocellum* 和 *Ruminococcus flavefaciens* 的木聚糖酶基因在烟草中实现了表达(Herbers et al., 1995),两种木聚糖酶都具有活性。2003 年日本科学家 Kimura T 等用植物表达系统表达了微生物来源的木聚糖酶基因(Kimura T, 2003)。他们把耐热型梭状芽孢杆菌 (*Clostridium thermocellum*) 木聚糖酶催化域的编码序列转入水稻中,利用花椰菜花叶病毒 35S 启动子的控制在水稻秆和种子中得到了木聚糖酶的稳定表达,并且表达对转基因水稻植株的表型没有影响。2005 年杨培龙等将来源于橄榄绿链霉菌 (*Streptomyces olivaceoviridis*) A1 的木聚糖酶 XYNB 在烟草中进行了表达,他们利用携带双 35S 启动子和 AMV 增强子的表达载体,在烟草中高效表达了 XYNB,表达的 XYNB 约占叶片总蛋白含量的 6%,酶活性约为 170 IU/g 鲜叶片(杨培龙, 2006)。1999 年 Carlos M.G.A.Fontes 将来源于 *Clostridium thermocellum* 的木聚糖酶基因 *XYLY* 转入哺乳动物细胞 MDCK 和转基因小鼠的胰脏中实现了该木聚糖酶的表达(Fontes CM, 1999)。

表 1-4 在酵母中表达的部分木聚糖酶基因

Table 1-4 Expression of xylanase genes in yeast

菌株	载体	寄主菌	参考文献
<i>Aspergillus nidulans</i>	Yelic 181	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OL1	Perez-Gonzalez <i>et al</i> ,1996
<i>Aspergillus nidulans</i>	PCWK1	<i>wine yeast</i>	Ganga MA <i>et al</i> , 1999
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO4308	Yep352'	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y294	Crous JM <i>et al</i> ,1995
<i>Aureobasidium pullulans</i>	PYES2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	Li XL <i>et al</i> ,1996
<i>Bacillus pumilus</i> PLS	PRLR1 pJC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y294	Nuyens F <i>et al</i> ,2001
<i>Cryptococcus albidus</i>	pJHS	<i>Pichia stipitis</i> PJH53	Morosoli R <i>et al</i> ,1993
<i>Cryptococcus albidus</i>	pVT100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T109-3C	Moreau A <i>et al</i> ,1992
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	PCWK1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 1065	Bergquist P <i>et al</i> ,2002
<i>Dictyoglomus thermophilum</i> Rt46B	PKD1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 1065	Wash DJ <i>et al</i> ,1997
<i>Neocallimastix</i>	pSPGK1	<i>Kluyveromyces lactis</i> MG1/2	Durand R <i>et al</i> ,1999
<i>Penicillium purpurogenum</i>	pJC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chavez R <i>et al</i> ,2002
<i>Thermotoga</i> sp strain Fjiss3B.1	pKD1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 1065	Walsh DJ <i>et al</i> ,1998
<i>Trichoderma reesei</i> QM	PDLG1 pJC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	la Grange DC <i>et al</i> ,1996
<i>Trichoderma reesei</i>	pPIC9	<i>Pichia stipitis</i>	Den Haan <i>et al</i> ,2001
<i>Thermotoga maritime</i> MSB8	pPICK	<i>Pichia pastoris</i>	Yang MH <i>et al</i> ,2005
<i>Rhodothermus marinus</i>	pPICZaB	<i>Pichia pastoris</i>	Ramchuran <i>et al</i> ,2005
<i>Lentinula edodes</i>	pGAPZaA	<i>Pichia pastoris</i>	Lee CC <i>et al</i> ,2005

2. 6. 2 木聚糖酶的基因改良

木聚糖酶在造纸、食品、能源、饲料以及环境等领域的应用价值, 已经得到了肯定, 然而由于木聚糖酶在天然材料中表达水平低, 难以大规模生产, 并且产物难以纯化以及木聚糖的一些性质不能完全满足应用的要求, 目前为止木聚糖酶并没有得到广泛的推广应用。随着基因工程技术的发展, 通过基因工程这一手段, 利用生物反应器提高它的表达量并在分子水平上对木聚糖酶基因进行改造以解决一些木聚糖酶性质上(如抗逆性、pH值、热稳定性、比活性等)的应用缺陷已成为目前的研究热点。

为了提高木聚糖酶的活性, 2002 年陆建等运用PCR介导的定点突变技术将来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的木聚糖酶XynF1 中与作为酸碱催化质子供体的 155 位谷氨酸相邻的异亮氨酸I¹⁵⁶ 突变为结构简单的极小氨基酸A¹⁵⁶, 使其侧链的疏水性降低。从而改变了酶的反应活化能。并将突变基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达。突变株培养上清液中的酶活单位较亲本提高了 1000 倍, 两者的K_m值相差约一倍, 而其他酶学性质基本不变(陆建等, 2002)。2005 年, Huang 等将来源于*Neocallimastix frontalis*的木聚糖酶Xyn11A和Xyn11B的锚定区域去除后酶的比活性分别提高了 64% 和 330%, 达到 6517.1 IU·mg⁻¹ 和 16309 IU·mg⁻¹ (Huang,2005)。

大多数木聚糖酶的最适温度在 50℃~60℃之间, 耐热性差, 迄今为止, 只发现 20 余种细菌和不足 10 种真菌能产耐热木聚糖酶。嗜热真菌比嗜热细菌产生的木聚糖酶耐热性差, 只有 *Gloephylum trabeum* 产生的木聚糖酶最适温度为 80℃。而嗜热细菌产生的木聚糖酶的最适温度有的(如栖热孢菌属)高达 100℃以上。由于纸浆处理通常是在高温下进行, 而在饲料制粒加工中需要短暂的高温处理, 因此科学家们希望运用突变技术提高木聚糖酶的最适温度和耐热性。现已发

现的耐热木聚糖酶中只有 *Thermomonospora fissa* 的 XynA 属于 G/11 族糖苷水解酶, 其它都属于 F/10 族(江正强等, 2003)。杨浩萌等人总结了影响木聚糖酶热稳定性的几种蛋白质的内在因素: 1) 热稳定区 TSD, 2) 盐桥, 3) 二硫键, 4) 芳香族氨基酸, 5) 蛋白质表面的精氨酸含量, 6) 脯氨酸的含量, 7) 一些保守的氨基酸(杨浩萌, 2005)。 1994 年 Wakarchuk 等在木聚糖酶中引入丝氨酸 (Ser), 形成不影响其活性的二硫键, 使其耐热性提高了 15°C (Wakarchuk *et al.*, 1994)。1999 年 Sung 等对来源于 *Trichoderma reesei* 的 XYNII 和 *Bacillus circulans* 的木聚糖酶进行了改良, 通过点突变、取不同木聚糖酶的片段组成杂合酶或在酶 N 端加氨基酸等方法, 将酶的耐热性提高了 28°C 之多 (Sung *et al.*, 1999)。杨浩萌等通过定点突变技术, 对来自 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶基因 *xynB* 进行定点突变, 突变后的木聚糖酶在热稳定性上得到改良, 在 80°C 和 90°C 分别处理 1min, XYNB 剩余酶活性分别为 98.07% 和 34.39% (杨浩萌等, 2005)。2005 年, Huang 等将来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶 Xyn11A 和 Xyn11B 的锚定区域去除后, 酶的最适反应温度分别从 55°C 和 60°C 提高到 60°C 和 65°C (Huang, 2005)。

在木聚糖酶最适 pH 值改造方面, YEW-loom chen 等人用随机突变的方法研究来自 *Neocallimastix patriciarum* 的木聚糖酶 *xyn*-CD/WT。先将 *xyn*-CD/WT 的基因克隆在 pGEX-4T-1 载体上, 用 PCR 的方法构建随机突变库, 并用含有木聚糖的高 pH 值的平板筛选出耐碱突变株 (YEW-loom chen, 2001)。在造纸工业中, 生物漂白剂的作用范围要求在 pH7.0~9.0, 因此该突变酶更适用于纸浆漂白工作中。

3. 瘤胃微生物来源的酶

3.1 瘤胃微生物基本情况及分类

反刍动物如牛、羊等的瘤胃中栖息着复杂多样的微生物种群, 这些微生物均为非致病性的, 主要包括瘤胃原虫、瘤胃细菌和厌氧真菌, 还有少数噬菌体。按照它们在瘤胃中的主要功能, 瘤胃细菌可分为纤维降解细菌、淀粉降解菌、半纤维素降解菌、蛋白降解菌、脂肪降解菌、酸利用菌、乳酸产生菌和其它瘤胃细菌 (冯仰廉, 2004)。

真菌广泛存在于食草动物的消化道中, 目前从瘤胃中分离得到的真菌共计五个属十余个种之多, 其五个属分别为 *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* 和 *Aaecomyces*。它们有溶解纤维的特性, 并且都具有降解植物细胞壁中结构性碳水化合物的能力。现从瘤胃中分离的真菌分为单中心类型真菌和多中心类型真菌两大类。前者包括 3 个属 (*Neocallimastix*, *Piromyces* 和 *Aaecomyces*) 的 12 种真菌; 后者包括两个属, 即 *Aaecomyces* 和 *Orpinomyces* 的 3 种真菌 (于长青, 2004)。在单中心类型中, 菌丝体通常形成单个孢子囊, 而在多中心类型中, 菌丝体形成多个孢子囊。瘤胃真菌的生活周期主要有两个阶段构成, 即具有鞭毛和运动能力的游离孢子阶段和附着在消化碎片上的不运动的营养体阶段。游离孢子可存活 24~32 h。随着孢子在孢子囊内逐渐成熟, 孢子囊破裂释放出孢子, 游离孢子附着在植物组织上生长, 逐渐形成新的菌丝体。所有瘤胃真菌均生长在一狭窄的温度范围 (33~41 °C), 最适 pH 为 6.5~6.8, 严格厌氧。由于缺少细胞色素、萘醌及线粒体 RNA, 瘤胃真菌没有电子传递系统, 只能靠发酵过程提供能量。发酵基质为多种碳水化合物, 包括有直链和支链淀粉、羧甲基纤维素、晶体纤维素等。Bauchop 利用显微镜技术研究指出, 真菌是瘤胃微生物中的一类功能菌, 它们广泛地集群于植物纤维上, 绝大多数为纤维分解菌 (Bauchop, 1982)。此外, Wallace 和 Jobjin 发现瘤胃真菌还具有降解蛋白质和淀粉能力

(Wallace, 1985)。

3.2 瘤胃微生物来源的酶

瘤胃微生物产生多种类别的水解酶如纤维素酶、木聚糖酶、 β —葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶、果胶酶、蛋白酶及鞣酸酶等 (Selinger, 1996)，研究最多的当属纤维素酶、半纤维素酶以及降解植物细胞其它多聚体的酶。主要的纤维素分解细菌包括 *Fibrobactor succinogenes* , *Ruminococcus albus* 和 *Ruminococcus flavefaciens* (Forsberg 和 Cheng, 1992)。高活性的瘤胃真菌纤维水解酶类可以快速降解植物细胞壁中抗性最强的多聚体组分 (Forsberg 和 Cheng 1992 ; Forsberg et al, 1993; Wubah et al, 1993; Trinci et al, 1994)。已分离的5个属瘤胃真菌所产生的纤维素酶和木聚糖酶是迄今所记载的活力最高的纤维水解酶类。Huang等克隆到的来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶Xyn11A和Xyn11B的比活性分别达到3964IU/mg和3756IU/mg(Huang, 2005)。

4. 木聚糖酶的应用

4.1 在饲料行业中的运用

富含于饲料中的非淀粉多糖 (Non-starch Polysaccharides, NSPs) 是重要的抗营养因子，其中含量较高的木聚糖的抗营养作用主要表现为木聚糖本身难以被单胃动物消化，同时结合大量的水，使采食动物消化道中食糜的体积增大、粘度增加、养分与消化道内源酶的作用降低，从而阻碍营养物质，尤其是脂肪和蛋白质的消化吸收，降低饲料的转化率。研究结果表明，饲料中如果添加木聚糖酶，就可显著降低阿拉伯木聚糖分子大小，将其分解成较小聚合度的低聚木糖，从而改善饲料性能，消除或降低因粘度增加而引起的抗营养作用 (卢建军, 1999; 刘强等, 1999; 郝波等, 2000)。因此，木聚糖酶在饲料资源开发和提高廉价副产品的利用率方面，具有广阔前景。

4.2 在造纸工业中的运用

在化学或机械制浆过程中，大部分的木质素可从木材或其它粗原料的纤维素纤维中除去，但仍残留 3%~12%，这部分残留的木质素会造成纸浆呈褐色，并降低纸张的强度。传统的化学漂白法是采用酸性漂白剂如氯气、二氧化氯来去掉木质素。这就会使造纸废水中含有大量的、有毒的、强烈致癌致畸的物质，造成环境的严重污染。1986 年 Viikaru 首次提出用半纤维素酶处理纸浆，可以使氯气等化学漂白剂更好地渗透到纸浆里面从而减少漂白过程中氯的需求量。

木聚糖酶可作为生物漂白剂用于造纸工业。其漂白作用在于切开木质素和糖之间的键，打开纸浆结构。扫描电镜研究显示，用木聚糖酶预处理后的纸浆在纸浆纤维的孔隙上有所提高，有助于其与起漂白作用的化合物的亲和(吴淑芳, 1998)。木聚糖酶在造纸和纸浆工业中的重要性在于其取代了有毒的化学物质，同时通过预处理可以回收该行业中有用的副产品。

4.3 在食品和医药行业中的运用

木聚糖的水解产物 (木糖和低聚木糖) 可应用在食品行业，作为增稠剂、脂肪代替物和抗冻食品添加剂；在制药工业中木聚糖与其它物质结合使用，可以延缓药物成分的释放。木聚糖的水解产物还可以进一步转化为液体燃料、单细胞蛋白、溶剂和低热量甜味剂。在面包配方中加入一

定量的低聚木糖糖浆,可以赋与面包良好的色泽,增强其香味同时,容易保持面包水分(Pedersen *et al.*, 2000)。在饮料中添加一定量的低聚木糖,可以提高饮料的稳定性。在奶油和果冻生产中,加入适量的低聚木糖,可得到提高产品乳化性的良好效果。木聚糖的选择利用性也高于其它功能性低聚糖,而且附加值和售价也最高,有着极大的开发价值和推广潜力(王凤翼等, 2000)。

4.4 在酿酒行业及其它领域中的应用

十年前,日本研究人员将 *A.kawachii* 所产的耐酸性木聚糖酶 XylC 应用于日本大麦烧酒酿造中,结果发现该木聚糖酶有助于提高发酵效率,增加酒精的产率,原因在于木聚糖酶对谷物细胞壁中木聚糖的作用有助于加快淀粉酶的作用(Ogasacara H, 1991)。2001 年 Jose V 等利用转基因葡萄酒酵母表达木聚糖酶,并应用于葡萄酒的酿造中,发现木聚糖酶不仅能改善葡萄酒的色泽而且还能增加香味(Jose V, 1991)。

造纸工业废料及农业废弃物中的木聚糖可被转化为 D-木糖单体,而 D-木糖又可被细菌、酵母及真菌转化成有价值的燃料(Burchhardt *et al.*, 1992)。因此,木聚糖酶在能源工业中的应用在不久的将来也会显示其巨大的潜力。

5. 巴斯德毕赤酵母表达系统

酵母是单细胞低等真核生物,兼具有分子遗传的可操作性和原核生物易培养、繁殖快、便于生产的优点。另一方面,酵母具有真核细胞的亚细胞结构,能够使外源基因正确翻译和进行翻译后加工、修饰,这对于一些外源蛋白正常功能的发挥是非常重要的(Schekman *et al.*, 1982)。因此酵母是一个非常理想的外源基因表达寄主。

5.1 优越性

毕赤酵母(*P.pastoris*)表达系统为 80~90 年代发展起来的优良酵母表达系统(Cregg *et al.*, 1993)。由于该系统较原核生物及其它真核生物表达系统有众多优点(彭毅, 2000),已被广泛地用于外源蛋白的表达,其优点为:

- (1) 具有强乙醇氧化酶(Alochol oxidase, *AOX1*)基因启动子,可严格调控外源蛋白的表达;
- (2) 作为真核表达系统,可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰,从而使表达出的蛋白具有生物活性;
- (3) 营养要求低、生长快、培养基廉价,便于工业化生产;
- (4) 具有强烈的好氧生长偏爱性,可进行细胞高密度培养,在发酵罐中细胞干重甚至可达 120 g/L 以上;
- (5) 外源基因单拷贝或多拷贝定点整合入基因组中,遗传稳定,表达量高,许多蛋白表达量可达到 g/L 以上水平;
- (6) 在 *P.pastoris* 中表达的蛋白既可存在于细胞内,又可分泌到胞外,自身分泌的蛋白非常少,十分有利于纯化;
- (7) 糖基化程度低,其糖基化位点与哺乳类细胞的相同,所分泌的糖蛋白的免疫原性较低,而且表达产物不含有毒物质和致热原,更利于临床应用(Montesino R, 1998; Gemmill T R, 1999)。

5.2 受体菌和载体

毕赤酵母表达宿主菌于 80 年代初开发获得，大多应用宿主菌是通过野生型石油酵母 Y11430 进行突变改造而来。大多数受体菌都是组氨酸缺陷型，如果表达载体上携带有组氨酸基因，则可以补偿宿主的组氨酸缺陷，因此可以在不含 His 的培养基上筛选转化子。也有其它类型的生物合成基因突变或营养缺陷型的菌株，但使用的较少。目前主要有 3 种表达宿主菌，它们之间的区别在于一个或两个 *AOX* 基因的缺失而造成对甲醇利用能力高低的变化。目前使用最广泛的毕赤酵母受体菌是 Cregg 1985 年建立的 GS115 (Cregg JM, 1985)，表型为 *Mut⁺*，转化后可能为 *Mut⁺* 也可能是 *Mut^s*，可以在 MM、MD 平板上鉴定表型。上述宿主菌的进一步改造，还可得到其它衍生的宿主菌，目前已有十几种不同基因型。SMD1163 (*his4pep4prb1*)，SMD1165 (*his4prb1*) 和 SMD1168 (*his4pep4*) 是最近开发的一类蛋白酶缺失的宿主菌，可减少表达的外源蛋白的降解，有广泛的应用价值 (James M. Cregg, 1985; 章如安, 2000)。KM71 的 *AOX1* 基因被来自酿酒酵母的 *ARG4* 基因替换，其在甲醇的培养基上生长只能依靠 *AOX2* 基因，利用甲醇能力很弱，故其表型为 *Mut^s*。MC100-3 的两个 *AOX* 基因均被删除，不能在含有甲醇的培养基上生长，因此其表型为 *Mut⁻*。

毕赤酵母表达载体包括自我复制型的游离载体和整合型载体，但以整合型载体为主。常见的整合型载体又分为胞内表达和分泌表达两类，表达胞内蛋白的载体有：pPIC3、pPIC3K、pHIL-D2、pPICZA(B, C) 等；分泌表达的载体有：pPIC9、pPIC9K、pHIL-S1、pACO815、pPICZ α A(B, C) 等 (马孟根, 2001)。通用的整合载体多含有 *AOX1* 启动子，具有多种共同特性。一般都有一个外源基因表达框和 *AOX1* 启动子、多克隆位点 (MCS) 和一个从 *AOX1* 基因上拷贝下来的终止序列 (TT)；同时，作为筛选标记的 *HIS4* 基因和在细菌中进行复制起始点和选择标记 (如 *ColE1* 复制起始点和抗氨苄基因)；同时也含有 *AOX1* 3' 的非编码区序列，使外源基因能以同源重组的方式整合到染色体的 *AOX1* 部位 (表 1-5)。Liu Z 等还设计并建构了一个可以在哺乳动物细胞和毕赤酵母中生产重组蛋白的新的表达载体 (Liu Z, 1998)。

分泌型表达载体具有信号肽序列，有来自酿酒酵母的 α-因子的信号序列、蔗糖酶基因 *SUC2* 的信号序列、酸性磷酸酶基因 *PHO1* 信号序列及间质金属蛋白酶 (MMP) / 间质金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 信号肽序列 (Sreekrishna K, 1997)。

表 1-5 毕赤酵母表达宿主菌

Table 1-5 *P. pastoris* host strains for expression

菌种名称	遗传型	表型
Y-11430		野生型
GS115	<i>his4</i>	<i>Mut⁺ His⁻</i>
KM71	<i>aox1Δ::SARG4his4arg4</i>	<i>Mut^s His⁻</i>
MC100-3	<i>aox1Δ::SARG4aox2Δ::Phis4his4arg4</i>	<i>Mut^s His⁻</i>
SMD1168	<i>pep4Δhis4</i>	<i>Mut⁺ His⁻</i> , 蛋白酶缺陷型
SMD1165	<i>prb1his4</i>	<i>Mut⁺ His⁻</i> , 蛋白酶缺陷型
SMD1163	<i>pep4prb1his4</i>	<i>Mut⁺ His⁻</i> , 蛋白酶缺陷型

表 1-6 毕赤酵母表达载体

Table 1-6 *P. pastoris* expression vectors

载体名称	蛋白靶向	选择标记	载体特征
PHIL-D2	胞内	<i>His4</i>	有一个 <i>NotI</i> 位点, 通过其实现 <i>AOX1</i> 基因的替换。
PAO815	胞内	<i>His4</i>	表达盒两侧为 <i>BamHI</i> 和 <i>BglII</i> 位点, 可酶切后再次插入已含有一个拷贝的载体中, 产生多拷贝的表达载体。
pPIC3k	胞内	<i>His4, Kan^r</i>	有多克隆位点; 能通过抗 G418 筛选多拷贝转化子。
pPICZ	胞内	<i>ble^r</i>	有多克隆位点; 通过 Zeocin 筛选多拷贝转化子, 外源蛋白与 <i>His6</i> 和 <i>myc</i> 融合。
pHWO10	胞内	<i>His4</i>	表达受 GAPp 调控。
pGAPZ	胞内	<i>ble^r</i>	有多克隆位点; 表达受 GAPp 调控; 通过 Zeocin 筛选多拷贝转化子, 外源蛋白与 <i>His6</i> 和 <i>myc</i> 融合。
pHIL-S1	分泌	<i>His4</i>	<i>AOX1</i> 与 <i>PHO1</i> 分泌信号肽融合, 通过 <i>xholI</i> 、 <i>EcoRI</i> 、 <i>BamHI</i> 位点插入外源基因。
pPIC9	分泌	<i>His4</i>	有 α -MF 信号序列; 有多克隆位点。
pPIC9k	分泌	<i>His4, Kan^r</i>	有 α -MF 信号序列; 有多克隆位点; 能通过抗 G418 筛选多拷贝转化子。
pPICZ α	分泌	<i>ble^r</i>	有 α -MF 信号序列; 有多克隆位点; 通过 Zeocin 筛选多拷贝转化子, 外源蛋白与 <i>His6</i> 和 <i>myc</i> 融合。
pGAPZ α	分泌	<i>ble^r</i>	表达受 GAPp 调控, GAPp 与 α -MF 信号序列融合; 多克隆位点; 通过 Zeocin 筛选多拷贝转化子, 外源蛋白与 <i>His6</i> 和 <i>myc</i> 融合。

5.3 影响外源基因表达的因素及表达条件的优化

影响外源基因在毕赤酵母中表达的因素主要包括: 外源基因的特性, 启动子的选用, 表达框的染色体整合方式, 宿主菌, 基因剂量, 分泌信号, 产物的稳定性, 翻译后修饰以及培养基、发酵条件等等。要实现目的蛋白在毕赤酵母中的成功表达并兼顾其实用性和安全性, 必须充分考虑影响表达和应用的各种因素并采取有效的优化策略。

5.3.1 目的基因特性的改造

目的基因的特性是决定表达成败的首要因素。许多基因特定的 A+T 富含区可作为多聚腺苷酸转录终止信号, 导致仅产生截短的 mRNA。某些稀有密码子, 尤其是稀有密码子富集区往往也是制约翻译速率的因素。在某些情况下, 可通过定点突变去除成熟前终止结构域和替换稀有密码子以优化目的基因。在基因中存在大量 A+T 富含区和稀有密码子密集区时, 往往需要进行全基因合成, 使编码序列符合毕赤酵母偏爱性密码子用法和具有更高的 G+C 含量 (Withers-Martinez C, 1999)。毕赤酵母对外源基因的表达效率和外源基因密码子的选用有关, 通过按照毕赤酵母密码子的偏向爱性来局部改变外源基因密码子, 已经使外源蛋白的表达量有很大提高 (Yao, 1998; Bei, 2001)。

5.3.2 启动子的选择

乙醇氧化酶 1 启动子 P_{AOX1} 是应用最广泛的甲醇诱导型强启动子。但在某些情况下 P_{AOX1} 的使用受到限制, 例如: 甲醇有毒不适用于食品工业生产, 同时也是一种火灾隐患。故其它非甲醇诱导的启动子也很引人注目。 P_{GAP} (三磷酸甘油醛脱氢酶启动子) 是一种组成型强启动子 (Waterham

H R, 1997)。是用该启动子在发酵时不需甲醇诱导, 也不必更换碳源, 工艺简单。但P_{GAP}不宜于表达对毕赤酵母有毒的蛋白。P_{FLD1}(依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶启动子)在以甲醇为单一碳源或甲胺为单一氮源时, 被强烈诱导。这不仅为启动子的选择提供了灵活性, 也扩大了毕赤酵母的应用范围。

5.3.3 糖基化的消除

毕赤酵母可对分泌蛋白进行O-和N-连接糖基化修饰(Duman J G, 1998)。虽然糖基化程度不高, 但由于毕赤酵母糖蛋白与哺乳动物糖蛋白糖链结构存在差异从而具有潜在的抗原性。为了解决这一问题: 可以尝试胞内表达, 避免目的蛋白的糖基化; 也可通过对活性中心糖基化位点的突变改造, 消除糖基化; 还可共表达糖链加工酶, 使糖链结构更接近哺乳动物, 从而降低免疫原性。

5.3.4 提高产物的稳定性

提高目的蛋白的稳定性, 使之免受蛋白酶降解的常用方法有: 在培养基中加入富含氨基酸和多肽的蛋白胨或酪蛋白水解物等, 增加蛋白酶的底物以减少目的蛋白的降解; 因毕赤酵母可在较宽的pH范围内生存, 可调节培养基的pH值抑制蛋白酶活性; 使用蛋白酶缺陷型菌株, 如SMD1163、SMD1165、SMD1168。此外, 可通过共表达蛋白酶抑制物来抑制蛋白酶活性, 也可尝试将目的蛋白连接上一个过氧化物酶体靶向信号(PTS), 使其被分拣转运如过氧化物酶体贮存起来, 免受蛋白酶降解, 还可减少对宿主细胞的毒害作用(Sreekrishna K, 1997)。

5.3.5 表达框的染色体整合位点和方式

毕赤酵母表达载体一般通过同源重组整合到酵母的染色体上, 整合性载体具有表达框稳定性和可控整合位点等优越性, 并且能发生多位点整合而获得多拷贝。其中AOX1和His4基因位点都已成功用于外源基因整合, 但His基因座的LacZ表达框偶有缺失, 因此, AOX1位点是较为理想的位点。

5.3.6 基因剂量

许多实验表明, 含单拷贝表达框的宿主可以得到较为理想的表达(Loewen, 1997), 而在大多数情况下, 随着拷贝数的增加, 表达产物也会增加。如: 鼠表皮生长因子(mEGF)、人肿瘤坏死因子(TNF)、破伤风毒素片段C(Sreekrishna, 1997)就是通过表达载体的高拷贝实现的。不过, 个别情况下拷贝数的增加对产量也会产生负效应(Fahnestock, 1997; Cregg, 1987)。因此, 基因拷贝数对表达量的影响是无法预测的, 高表达菌株的筛选只应以表达的蛋白量为标准。

5.3.7 信号肽序列

分泌表达是一种理想的蛋白表达方式, 十分有利于纯化, 不同信号肽对外源基因表达分泌水平有明显不同的影响, 但一般不分泌的蛋白很难使其分泌。有些情况下, 外源蛋白自身的信号肽就足以使外源蛋白分泌。通过对自身信号肽、 α -交换因子信号肽及PHO等不同信号肽的分泌效果研究发现(Murasugi, 2001), 酿酒酵母的 α -交换因子(AMF)的信号肽序列分泌效率高, 利用 α -交换因子分泌信号表达外源基因获得成功的可能性大, 尤其对小分子物质, 如: 抑肽酶、表皮生长因子、凝血因子XII等(Sreekrishna, 1997)。通过对信号肽序列进行改造也能提高外源蛋白的表达量(熊爱生, 2003)。

通过对影响外源基因在毕赤酵母中表达的因素的研究，可以指导人们在外源基因的表达过程中避免不良因素、利用有利因素，从而提高外源蛋白的表达量。

毕赤酵母表达系统也有其局限性，例如，信号肽加工不完全、聚合体的存在、内部降解等造成的产物不均一现象等等，但它仍然是各种外源蛋白的表达应用最为广泛的系统。表达量高、使用的安全性等优良特性，使其成为具有良好商业应用前景的表达系统。

本研究的目的和意义

木聚糖酶在造纸、食品、能源、饲料以及环境等领域的巨大应用价值，已在世界范围内得到了肯定。然而由于在天然材料中表达水平低、难以大规模生产、且产物难以纯化以及木聚糖的一些特有性质不能完全满足应用，使得木聚糖酶到目前为止还没有真正得到广泛的推广应用。随着基因工程技术的发展，通过基因工程这一手段，利用生物反应器提高它的表达量并在分子水平上对木聚糖酶基因进行改造以解决一些木聚糖酶性质缺陷（如比活性、抗逆性、pH 值稳定性、热稳定性等）已成为现在的研究热点。

本研究的目的在于通过基因工程技术，利用本实验室克隆的来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的高比活木聚糖酶基因 *xyn-w*，构建高效表达、有效分泌木聚糖酶的重组毕赤酵母生物反应器，以解决木聚糖酶单位产量低、生产成本高的问题，从而利用生物技术开发一条木聚糖酶高效生产的新途径。同时通过分子生物学手段对 *xyn-w* 基因进行分子水平上的改良，以使其具有更加优良的性质。

第二章 木聚糖酶基因在毕赤酵母中的 高效表达及酶学性质研究

2. 1 实验材料

2. 1. 1 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109、质粒 pUC19 由本研究室保存。

酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115 (*His*⁺ *Mut*⁺)，质粒 pPIC9 由本研究室保存。

2. 1. 2 试剂盒、工具酶和生化试剂

DNA 回收试剂盒为 BioDev 产品；限制性内切酶购自 Gibco 和大连宝生物工程公司；T₄DNA 连接酶购自 Promega 公司，T₄ 多核苷酸激酶为 Biolab 公司产品，蛋白低分子量标准购自 Promega 公司；1 kb 和 100 bp DNA 分子量标准购自鼎国公司；DNA 回收试剂盒为 BioDev 产品。

丙烯酰胺、N, N' - 甲叉双丙烯酰胺及无氨基酸酵母氮源 (YNB)、生物素 (Biotin)、琼脂糖购自 Sigma 公司；酵母提取物、蛋白胨购自 Oxford 公司；X-gal、IPTG 购自经科公司，考马斯亮蓝 G-250 购自 Amresco 公司，牛血清白蛋白 (BSA)、底物 Xylan (from oat spelt) 为 Sigma 公司产品。其他化学试剂均为国产分析纯。

2. 1. 3 溶液

(1) 质粒提取所用溶液

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA

溶液 II: 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS (现配现用)

溶液 III: 3 mol/L 醋酸钾, 5 mol/L 醋酸 (pH4.8)

(2) 核酸电泳缓冲液

TAE (50×): 242 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 用无菌水定容至 1000 mL。

(3) 蛋白电泳所用溶液

蛋白上样缓冲液 (2×): 100 mmol/L Tris-HCl (pH6.8), 200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 4% SDS、0.2% 溴酚蓝, 10% 甘油。

30% 丙烯酰胺溶液: 29 g 丙烯酰胺, 1 g N, N' - 亚甲叉丙烯酰胺, 溶于 100 mL 水中。

考马斯亮蓝染液: 0.24 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 90 mL 甲醇:水 (1:1, v/v) 和 10 mL 冰乙酸中。

脱色液: 10% 冰乙酸。

(4) pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1

分别配置 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠母液和 0.1 mol/L 的柠檬酸母液。量取 580 mL 磷酸氢二钠母液和 420 mL 柠檬酸母液，两者混匀后即为 pH 5.6 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。缓冲液 pH 值可在 pH 计上进行测量校正，以确保 pH 值在 5.6±0.01 的范围内，本溶液室温下放置一周内有效。

(5) pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 2

称取 0.5 g Triton X-100, 0.5 g 牛血清白蛋白 (BSA) 于 1000 ml 容量瓶中, 加入 900 ml pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1 将其溶解, 用 0.05 mol/L 柠檬酸调节 pH 至 5.6 ± 0.01 , 并用 pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液定容至 1000 ml, 本溶液室温下存放一周内有效。

(6) 1%燕麦木聚糖

称取 1 g 燕麦木聚糖, 用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1 溶解, 沸水浴中煮沸 10 min, 0.05 mol/L 柠檬酸调节 pH 至 5.6 后, 用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1 定容至 100 ml。此底物溶液在 4°C 时最多保存一周, 或将底物溶液分成等份在-20°C 下保存, 临用前溶解, 搅拌均匀使用。

(7) DNS 试剂

溶解 50 g 3, 5-二硝基水杨酸于 4000 ml 水中, 不断磁力搅拌, 缓缓加入 80 g 氢氧化钠, 使之完全溶解, 再继续磁力搅拌, 将 1500 g 酒石酸钾钠分数次少量加入, 并小心加热, 溶液最高温度不超过 45°C。冷却至室温后定容至 5000 ml。如果溶液不澄清, 用 Whatman1 号滤纸过滤, 室温保存于棕色瓶中。

2.1.4 培养基

(1) LB 培养基

5%酵母提取物, 10%蛋白胨, 10% NaCl, pH 7.0

(2) YPD 培养基

1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖

(3) RDB 固体培养基

1mol/L 山梨醇, 1%葡萄糖, 1.34% Yeast Nitrogen Base With Ammonium Sulfate without amino acids(YNB), 0.00004% Biotin, 0.005%谷氨酸, 0.005%甲硫氨酸, 0.005%赖氨酸, 0.005%亮氨酸, 0.005%异亮氨酸, 1.5%琼脂糖

(4) MM 固体培养基

1.34%YNB, 0.00004% Biotin, 0.5%甲醇, 1.5%琼脂糖

(5) MD 固体培养基

1.34%YNB, 0.00004% Biotin, 2%葡萄糖, 1.5%琼脂糖

(6) BMGY 培养基

1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), 1.34%YNB, 0.00004% Biotin, 1%甘油 (V/V)

(7) BMMY 培养基

除以 0.5%甲醇代替甘油, 其余成份相与 BMGY 相同

(8) 重组酵母发酵培养基

10×Basal Salts: 2.67%磷酸, 0.093%硫酸钙, 1.82%硫酸钾, 1.49%硫酸镁, 0.413%氢氧化钾, 4%葡萄糖

发酵中所用的微量盐溶液 PTM1: 0.6%硫酸铜, 0.008%碘化钠, 0.3%硫酸锰, 0.02%钼酸钠, 0.002%硼酸, 0.05%氯化钴, 2%氯化锌, 6.5%硫酸亚铁, 0.025%生物素, 0.5%硫酸(上述培养基中除酵母氮源 (YNB)、甲醇、生物素、氨基酸、PTM1 需过滤除菌外, 葡萄糖需在 108°C 灭菌 30min

外, 其余均在 121℃灭菌 20min。)

2.1.5 实验仪器

立式高速离心机 (Sorvall 公司), 基因导入仪 (Bio-RAD 公司)、PCR 仪 (Techne 公司)、蛋白电泳仪 (Amersham pharmacia biotech 公司), 5 L 发酵罐 (BIOSTAT B5 型, 德国 Barun 公司)、紫外分光光度计 (Bio-Rad 公司), AKTA FPLC 蛋白纯化系统、分子筛 Superdex _75_ HR_10/30 (amersham pharmacia biotech 预装柱), 超声波细胞破碎仪、小型离心机、水浴锅、核酸电泳仪及真空泵等均为国产。

2.2 方法

2.2.1 木聚糖酶基因 *xyn-w* 的克隆

(1) 木聚糖酶基因 *xyn-w* 的 PCR 扩增

反应体系: 将引物用无菌水溶解, 配成 50 pmol/μL, 备用。

无菌水	适量
10×Buffer	5 μL
dNTP Mixture	4 μL
模板 DNA	1 μL
引物 1	1.5 μL
引物 2	1.5 μL
<i>Taq</i> 酶	1 μL
总体积	50 μL

扩增程序: (A) 除 *Taq* 酶外, 加入上述试剂于 PCR 管中, 95℃变性 2 min, 然后冷却至 4℃。

(B) 加 1 μL *Taq* 酶。

(C) 按下列程序扩增 30 个循环:

- ① 94℃变性 1 min
- ② 60℃退火 1 min
- ③ 72℃延伸 1 min

(D) 72℃保温 10 min 后使温度降至 4℃保存。

(2) 木聚糖酶基因 *xyn-w* PCR 产物和质粒载体 pPIC9 的双酶切

第一次酶切:	无菌水	适量
	DNA	适量
	10×buffer	3 μL
	酶	10 U
总体积		30 μL

37℃保温 1.5 h, 加 1/3 体积 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 及 3×体积无水乙醇, -70℃沉淀 20 min。13000 rpm 离心 15 min, 用 70% 乙醇漂洗 1-2 次, 13000 rpm 离心 5 min。真空干燥 15 min 后, 用 17 μL 无菌水溶解进行第二次酶切。

第二次酶切:	DNA	17 μL
	10×buffer	2 μL
	第二种酶	10 U
	总体积	20 μL

37℃保温 1.5 h, 电泳回收目的条带及质粒载体。

(3) DNA 电泳回收

电泳: 电泳缓冲液 1×TAE, 电压 1-5 V/cm, 时间约 30 min。

回收: (A) 把切胶用的刀片用电泳缓冲液洗净, 切取的胶块应尽量小, 切下的胶块放入备用的新的 Eppendorf 管中, 用 Tip 吸头捣碎, 动作轻柔。

(B) 加入 3 倍体积的溶胶液, 室温下放置 5 min, 其间轻摇 Eppendorf 管几次, 使胶完全溶化。

(C) 加入 10 μL 玻璃奶 (玻璃奶使用前要充分混匀), 颠倒混匀, 冰浴下放置 10 min。并且间隔 2-3 min 混匀一次, 12000 rpm 离心 30 sec, 吸弃上清。

(D) 加 250 μL 漂洗液 (浓缩漂洗液使用前, 按浓缩漂洗液: 无水乙醇=3:7 配成工作浓度), 用加样器吸漂洗液轻柔地将玻璃奶冲散混匀, 12000 rpm 离心 30 sec, 吸弃上清。

(E) 重复上一步。吸取完漂洗液后再离心 10 sec, 用 Tip 头将最后一点漂洗液吸干净, 然后真空干燥 10 min。

(F) 加适量无菌蒸馏水或 TE (10-30 μL, 常规加入 30 μL), 混匀, 60℃水浴 5 min, 12000 rpm 离心 1 min, 回收上清备用。重复这一步, 会提高回收率。

(4) 连接

体系为 30 μL:

无菌水	适量
质粒	0.1 μg
目的基因	0.5 μg
10×T4 DNA 连接酶缓冲液	3 μL
<u>T4 DNA连接酶</u>	<u>3 U</u>
总体积	20 μL

14℃保温 12-16 h。

(5) 大肠杆菌感受态细胞的制备

(A) 挑取大肠杆菌单菌落, 接种于 10 mL LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。

(B) 取 1/100 体积的新鲜过夜培养物, 接种于 500 mL LB 培养至 OD_{600} 0.3-0.4。

(C) 将培养液冰浴 20 min, 以后的步骤尽可能保持在 0℃, 所有的容器在加细胞之前都预冷。4000 g 4℃离心 15 min。

- (D) 用 500 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 动作要轻。4000 g 4℃ 离心 15min, 弃上清。
- (E) 用 250 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 4000 g 4℃ 离心 15 min, 弃上清。
- (F) 用 20 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 转移到 30 mL 无菌离心管中, 4000 g 4℃ 离心 15 min, 弃上清。
- (G) 用 1~2 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 细胞的浓度应为 $1\sim3\times10^{10}$ 细胞/mL。将细胞按每管 40 μ L 分装, -70℃ 保存, 备用。

(6) 大肠杆菌的转化

(A) 重组 DNA 的纯化

取连接后的 30 μ L 溶液, 加 1/10 体积乙酸钠和 3 倍体积无水乙醇, -20℃ 沉淀 20 min, 14000 rpm 离心 15 min。再用 70% 乙醇洗, 14000 rpm 离心 5 min。沉淀真空干燥 10 min 后用 5 μ L 无菌水溶解。

(B) 转化

- ① 于冰上冻融-70℃ 保存的感受态细胞, 把 Eppendorf 管和电转化杯预冷备用;
- ② 将纯化后的 5 μ L DNA 加入到 40 μ L 的感受态细胞中混匀, 冰浴 1 min;
- ③ 将细胞和 DNA 混合液转到电转化杯中, 并将液体敲至杯底。把小杯放入小盒中, 电击;
- ④ 迅速取出小杯, 加入 1 mL LB 培养基, 重悬细胞。把细胞转至一灭菌的离心管中, 37℃ 轻柔振荡 1 h;
- ⑤ 取电击转化培养液, 5000 rpm 离心 3 min, 弃去约 750 μ L 上清后将菌打散, 混匀, 涂平板, 37℃ 倒置培养过夜。

(7) 筛选重组子

(A) 从平板上挑取单菌落, 用装有 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 培养液的玻璃管 250 rpm、37℃ 培养过夜, 加一个带有空质粒 pPIC9 的大肠杆菌作对照。

(B) 小量提取质粒

- ① 取 1.5 mL 摆床过夜培养液 5000 rpm 离心 3 min。
- ② 弃上清, 沉淀中加入 100 μ L 溶液 I, 振荡器混匀, 再加入 200 μ L 溶液 II, 颠倒混匀, 放置 1-2 min, 再加入 150 μ L 溶液 III, 放置 5 min。
- ③ 13000 rpm, 离心 10 min, 取上清, 加 0.6-1 倍体积异丙醇, 室温放置 10 min。
- ④ 13000 rpm, 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇清洗。
- ⑤ 真空干燥, 最后用 30 μ L 无菌水溶解。

(C) 先进行琼脂糖凝胶电泳, 根据质粒大小, 进行初步检测, 然后对有可能是阳性克隆的质粒进行酶切检测, 最后大量提取质粒 DNA 作进一步酶切检测, 确定阳性克隆子。

(8) 质粒 DNA 的大量提取

- (A) 取一管-70℃ 保存的大肠杆菌 (含质粒), 接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 50 mL LB 培养基中, 37℃ 振荡过夜培养;
- (B) 取过夜培养液, 5000 rpm, 4℃ 离心 3 min。

- (C) 弃上清, 倒置离心管于吸水纸上, 吸去多余的液体;
- (D) 将沉淀重悬于 3 mL 溶液 I 中, 剧烈振荡, 充分悬浮;
- (E) 加入 6 mL 新鲜配置的溶液 II, 颠倒混匀, 冰上放置 1 min;
- (F) 加入 4.5 mL 溶液 III, 颠倒混匀, 冰上放置 5 min;
- (G) 13000 rpm, 4℃离心 10 min。移出上清, 用擦镜纸过滤;
- (H) 上清中加入 0.6-1 倍体积的异丙醇, 室温放置 10 min。13000 rpm, 4℃离心 10 min;
- (I) 弃上清, 70%乙醇洗沉淀, 稍离心后倾去乙醇, 将沉淀真空干燥 10 min;
- (J) 在干燥后的离心管中, 每管加入 500 μL TE, 用枪把沉淀打散, 移入 Eppendorf 管中, 加入 10 μL RNase, 37℃保温 15 min;
- (K) 每管加入 500 μL Tris 饱和酚, 混匀, 14000 rpm 离心 3 min;
- (L) 吸取上层水相于新 Eppendorf 管中, 加入 500 μL 酚:氯仿液, 混匀, 14000 rpm 离心 2 min;
- (M) 小心吸取上层水相于新 Eppendorf 管中, 加入 500 μL 氯仿;
- (N) 取上清, 加入等体积 13.3% PEG8000, 冰上放置 15 min, 14000 rpm 离心 15 min;
- (O) 弃上清, 沉淀加 500 μL 70%乙醇洗, 尽量不使沉淀漂起来, 离心 3 min。弃去乙醇, 沉淀于真空干燥器中干燥 10 min;
- (P) 于离心管中加入 50 μL 无菌水或 TE 液, -20℃保存备用。

2.2.2 高效表达木聚糖酶基因的重组酵母的构建

(1) 木聚糖酶活性测定

用国际通用的 DNS 法: 将 1.8 mL 1%的可溶性 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (Sigma 公司, From Oat Spelts) 溶液放入 55℃水浴中预热 3 min。再将 0.2 mL 已经稀释好的酶液加入到试管中, 继续在 55℃水浴中反应 5 min, 向试管中加入 3 mL DNS 试剂终止反应, 将试管在沸水中加热 5 min, 立即用流动水冷却到室温, 10000 rpm 离心 5 min, 去除絮状物。540 nm 处测吸光值。对照为先将 0.2 mL 酶液在 100℃沸水中煮 20 min 灭活, 再加入同体积的底物保温。

(2) 表达重组子 pPIC9-xyn-w 的构建

将检测正确的重组质粒 pUC19-xyn-w 和质粒 pPIC9 同时用 *Eco*R I/*Sna*BI 进行双酶切处理, 电泳回收后, 用 T4DNA 连接酶连接。这样, 利用酶切位点将目的基因定向插入到 pPIC9 上的 *Eco*R I 和 *Sna*BI 位点之间, 形成重组子 pPIC9-xyn-w 从而将目的基因克隆到 *AOX1* 启动子下游, 而且与信号肽编码序列形成正确的阅读框架。

(3) 质粒 DNA 的处理

大量提取重组表达质粒, 取 10 μg 用 2~3 倍过量的 *Bgl* II 作线性化处理, 电泳检测酶切是否完全。酚/氯仿, 氯仿各抽提一次, 乙醇沉淀, 70%乙醇洗两次, 无菌水溶解, -20℃保存备用。

(4) 酵母感受态的制备

- (A) 将毕赤酵母 GS115 接种到含 5 mL YPD 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 28~30℃摇床过夜培养。
- (B) 将过夜培养物按 1/1000~5/1000 的接种量转接到含 500 mL YPD 液体培养基的 1000

mL三角瓶中培养至 $OD_{600}=1.3\sim1.5$ 。

- (C) 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- (D) 用 500 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- (E) 用 250 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- (F) 用 20 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- (G) 用 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀, 按每管 80 μ L 分装成备用的毕赤酵母感受态细胞, 保存于-70℃。

(5) 酵母细胞的转化

- (A) 将 80 μ L 已制备好的感受态细胞与 10 μ L 已制备好的线性化待转化质粒 DNA 混合, 并将其转至 0.2 cm 电转化杯中;
- (B) 将装有混合液的转化杯冰浴 5 min;
- (C) 调整好基因导入仪的参数 (置于毕赤酵母档), 电击一次, 电压 2000 V, 时间一般应约为 5 ms;
- (D) 立即往转化杯中加入 1mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 混匀, 并将其转至灭过菌的离心管中;
- (E) 将混合液涂于 RDB 板上, 每个 RDB 板上约涂 200 μ L~600 μ L 的混合液;
- (F) 将 RDB 板置于 30℃ 培养箱中培养 2~3 天, 直到长出菌落为止。

(6) 转化子的筛选

- (A) 用灭过菌的牙签从长有转化子的 RDB 板上挑取单菌落, 按照编号点到 MM 平板上, 再点到相应编号的 MD 平板上, 每个平板上一般点 100 个单菌落;
- (B) 将点有转化子的 MM、MD 平板置于 30℃ 培养箱中培养 1~2 天, 至菌落长出。阳性转化子应在 MM 平板上不生长或生长缓慢, 而在 MD 平板上能正常生长。

(7) 目的基因在毕赤酵母中的表达检测

- (A) 按编号挑取 MD 平板上的单克隆接种于装有 5 mL BMGY 培养基的 20 mL 离心管中, 30℃、250~280 rpm 摆床培养 2~3 天;
- (B) (2) 将撆床培养 2~3 天的培养液 3000g 离心 15 min, 取沉淀 (尽量将上清除尽), 再往沉淀中加入 4 mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基, 重新在 30℃、250~280 rpm 诱导培养;
- (C) 诱导培养 48 h 后, 每管取出 200 μ L 菌液, 3000 g 离心 5 min, 取上清, 对上清进行初步酶活性检测, 对那些筛选出有酶活性的, 进行进一步的诱导表达;
- (D) 为补偿甲醇的挥发损失, 在筛选出有酶活性的菌液中加入 100 μ L 10×甲醇溶液, 使菌液中的甲醇浓度保持在 0.5%, 以后每隔 12 h 取样一次, 并补加甲醇, 直至 96 h (4 d), 筛选出几株表达量高的准备上发酵罐, 进行发酵工艺研究。

(8) 酵母总 DNA 的提取

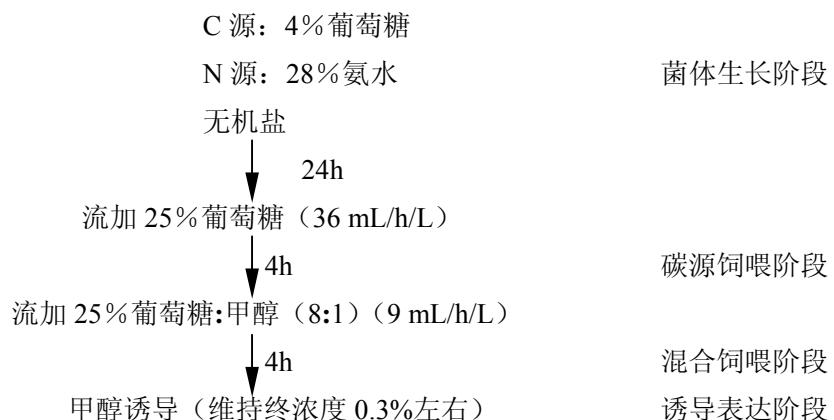
- (A) 在 10 mL MM 培养基中接种, 30℃ 250 rpm 摆床培养, 使 $OD_{600}=5\sim10$ 。

- (B) 1500 rpm 离心 10 min, 收集沉淀。
- (C) 10 mL 无菌水洗涤酵母细胞, 1500 rpm 离心 10 min, 收集沉淀。
- (D) 用 2 mL SCE 缓冲液(pH7.5)悬浮沉淀。[SCE 缓冲液: 1 mol/L 山梨醇, 10 mmol/L 柠檬酸钠, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT]。
- (E) 加 0.1~0.3 mg 细胞溶解酶, 37°C 保温 50 min。
- (F) 加入 2 mL 1% SDS 溶液, 轻轻摇动, 冰上放置 5 min。
- (G) 加入 1.5 mL 5 mol/L KAc(pH8.9)轻轻混匀。
- (H) 12000 rpm 离心 10 min, 弃沉淀。
- (I) 向上清液中加入 2 倍体积乙醇, 室温放置 15 min。12000 rpm 离心 20 min, 弃上清。
- (J) 用 0.7 mL TE 缓冲液轻轻悬浮沉淀, 转移到 Eppendorf 管中。
- (K) 酚/氯仿, 氯仿抽提, 将水相分装到 2 个 Eppendorf 管中。
- (L) 加 1/2 体积 7.5 mol/L NH₄Ac(pH7.5)和 2 倍体积乙醇, -20°C 放置 60 min。
- (M) 12000 rpm 离心 20 min, 以 70% 乙醇漂洗一次, 真空干燥, 存放。

2.2.3 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵

(1) 发酵过程

5%诱导菌体接种 Basal Salts 培养基



发酵过程分为四个阶段:

- (A) 菌株培养阶段。发酵培养基 10×Basal Salts 接种前首先加入 28% 氨水使培养基的 pH 达到 5.0 (氨水同时也作为菌株生长的氮源), 再按每升培养基加 4.37 mL 的量加入 PTM1。5~10% 接种种子液, 通气搅拌培养 18~24 h, 在培养过程中随着菌株的生长, 培养基中的溶氧量由 100 % 逐渐降低。当碳源消耗完后溶氧量会再度升高, 当溶氧升高至 80% 以上时, 开始碳源饲喂阶段。
- (B) 碳源饲喂阶段。流加 25% 葡萄糖 (每升中含 12 mL PTM1), 流加量为 36 mL/h/L, 培养 4 h。调整通气量使溶氧量始终大于 20%。

- (C) 碳源-甲醇混合饲喂阶段。流加 25% 葡萄糖:甲醇 (8:1) 培养 4h, 流加量为 9 mL/h/L, 控制溶氧量始终大于 20%。

(D) 诱导表达阶段。加入诱导剂甲醇（每升中含 12 mL PTM1），使甲醇终浓度维持在 0.3%，溶氧量始终大于 20%。在诱导过程中每 12 h 取样一次测定表达的木聚糖酶积累量并进行表达蛋白的 SDS-PAGE。

(2) 5 L 发酵罐中重组酵母的遗传稳定性

在重组 *P. pastoris* 生长、诱导表达的一个发酵周期结束后，直接取经诱导表达的菌液作为种子液（接种量为 1%）进行下一轮发酵，累计进行 5 轮，在每轮中均对菌株生长的生物量和木聚糖酶表达量进行测定。另外，取每轮发酵完的菌体铺完全培养基平板，挑取 10 个单菌落提取基因组 DNA 进行 *xyn-w* 的 PCR 检测。

2.2.4 木聚糖酶的纯化

毕赤酵母表达的木聚糖酶在发酵液中含量占总分泌蛋白的 90% 以上，在 SDS-PAGE 中只有少量杂带。发酵液 10000 rpm 离心 10 min 取上清，上清用 3 倍体积无水乙醇沉淀 10000 rpm 离心 10 min 取沉淀，沉淀于冻干仪中冻干过夜，冻干粉用 pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液重新溶解，溶液 10000 rpm 离心 10 min，上清经 3kD 超滤管浓缩至酶活 40000 IU/mL，样品再经分子筛 Superdex 75 HR 10/30 (amersham pharmacia biotech 预装柱) 纯化，加样 0.5 mL，用 pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液洗脱，流速为 0.4 mL/min，分部收集洗脱峰，每管 1 mL，得到电泳纯木聚糖酶蛋白 XYN-W。

2.2.5 木聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性的测定

经纯化的木聚糖酶 XYN-W 在不同的 pH 下进行酶促反应以测定其最适 pH。所用缓冲液为 pH 2.2~8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠系列缓冲液及 pH 8.0~9.0 Tris-HCl 系列缓冲液，于 55℃ 下测定酶活性。并绘制最适 pH 曲线。

将 XYN-W 在不同 pH 值的缓冲液中于 37℃ 下保温 30 min 用 pH 5.6 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液适当稀释后再测定酶活性以研究酶的 pH 稳定性。同时以未保温的相应 pH 的稀释酶液为对照。

2.2.6 木聚糖酶最适反应温度和热稳定性的测定

分别测定在柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系及不同温度下木聚糖酶的活力，绘制最适反应温度曲线。

测定木聚糖酶在 60℃、70℃ 温度下分别保温 2 min、5 min、10 min、15 min、20 min、30 min 时的酶相对活力，绘制酶的热稳定性曲线。

2.6.7 金属子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响

在酶促反应中加入不同的金属离子和相关化学试剂（终浓度为 1 mmol/L），研究其对木聚糖酶活性的影响，以未加金属离子和化学试剂的稀释酶液为对照。

2.6.8 木聚糖酶反应初速度的测定

取 9 支试管，每管都加好底物、缓冲液，在 55℃ 预热 3 min，用同一管已稀释好的酶液依次加样，计算好时间，依次在酶作用 1 min、3 min、5 min、7 min、10 min、15 min、20 min、30 min、

60 min时加入DNS试剂终止反应，终止反应的试管马上置于冰浴中，待全部反应完后，全部置于沸水中反应5 min，测OD₅₄₀，计算酶活性，然后算出酶活性与反应时间的比值，在一定时间内比值保持稳定，则在此时间内酶作用为一级反应，此时间即可确定为测K_m值和V_{max}的反应时间。

2.2.9 木聚糖酶K_m值及V_{max}的测定

根据以上所测的XYNW的反应初速度，测定其K_m值及V_{max}的反应时间。用不同浓度的木聚糖底物，在pH 5.6 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系中，55℃下测定酶活性。按双倒数作图法(Lineweaver-Burk法)将米氏方程改写为：

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

实验时选取不同的[S]测定相应的v，求出二者的倒数，以 1/v对 1/[S]作图，绘出直线，横轴截距为 1/K_m，K_m = -1/x。

2.2.10 木聚糖酶比活性测定

(1) 考马斯亮蓝试剂及标准蛋白质溶液的配制

考马斯亮蓝试剂溶液：称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 mL 95%乙醇中，加入 100 mL 磷酸，加水定容至 1000 mL，Whatman1 号滤纸过滤备用，4℃保存。

标准蛋白质溶液：结晶牛血清清蛋白，预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度用 0.15 mol/L NaCl 配制成 0.5 mg/mL 蛋白溶液。

(2) 标准曲线的绘制

取一系列不同体积的 0.5 mg/mL 标准蛋白溶液，与 0.15 mol/L NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，加入 1 mL 考马斯亮蓝试剂，摇匀，室温放置 2 min 后，在 595 nm 处测定光吸收值。以光吸收值为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，绘制标准曲线。

(3) 比活性测定

取合适体积的酶液，与 0.15 mol/L NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，使其测定值在标准曲线的直线范围内。根据所测定的A_{595nm}值，在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量，从而计算出酶蛋白的浓度 (mg/mL)。

2.2.11 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力

0.5 mL 木聚糖酶溶液，分别加入 0.5 mL 胃蛋白酶和 0.5 mL 胰蛋白酶(0.1 mg/mL，用 pH 2.0、0.1 mg/L Gly-HCl 缓冲液配制)，使得蛋白酶/木聚糖酶 (w/w) ≈0.1。于 37℃处理 30 min，稀释后再用常规方法测酶活性。

2.3 结果

2.3.1 木聚糖酶酶活性测定标准曲线的绘制

(1)木聚糖酶活性单位的定义

样品在底物(燕麦木聚糖)浓度为1% (质量体积比)、温度50℃、pH值5.6的条件下,1分钟内从燕麦木聚糖中产生1 μmol木糖所需的酶量,为一个木聚糖酶活性单位(IU)。

(2)标准曲线

制备10 μmol/ml的木糖储备液:准确称取150 mg在105℃烘至恒重的基准木糖,溶解于柠檬酸缓冲液(2)中,并定容至100 ml。储备液可分成小份在-20℃下保存。临用前溶解,搅拌均匀使用。

按下面表1的比例稀释成不同浓度,与试样一起反应测定,以吸光值为横坐标,反应体系中木糖的量(mol)为纵坐标,列出直线回归方程(y=ax+b)。

表 2-1 标准曲线的绘制

Table 2-1 Drawing of standard curve

标准序号	储备液+缓冲液	木糖浓度 (μmol/ml)	反应体系中木糖的量 (μmol)
1	1+0	10	2
2	1+0.5	6.67	1.33
3	1+1	5	1
4	1+1.5	4	0.8
5	1+2	3.33	0.67

$$\text{酶活性(IU/g)} = \frac{c}{M \times 5 \times 0.2} \times F$$

公式中:

c——根据实际样液的吸光值由直线回归方程计算出的y值;

F——试样溶液反应前的总稀释倍数;

0.2——0.2 ml 酶稀释液;

M——样品质量

5——反应时间。

根据标准曲线绘制结果,得出木聚糖酶活单位计算公式:

$$\text{活性(IU/g)} = \frac{(3543.6x+321.07)}{M \times 5 \times 0.2} \times F$$

2.3.2 木聚糖酶基因 *xyn-w* 的克隆和表达重组质粒 pPIC9-*xyn-w* 的构建

xyn-w 基因(Genbank 注册号: DQ517887)由本实验室从瘤胃微生物 *Neocallimastix frontalis* 中克隆得到,该基因全长 897 bp,在 GenBank 中与同样来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶基

因 *xynsk1-20*(Genbank 注册号: AY134031)具有最高的序列同源性, 其核酸序列同源性为 86.0%, 蛋白序列同源性为 84.8%。XYN-W 的成熟蛋白编码基因序列见图 2-1。

```

ACTGTTGCTAAGGCCAATGGGTAGAGGTGCTCCGCTGGTCAGAAGTTGTCCGTCGGT
T V A K A Q W G R G A S A G Q K L S V G
GGTGGTCAGAACCAACACAAGGGTGTCTCCGATGGTTCTCCTACGAAATCTGGTTGGAC
G G Q N Q H K G V S D G F S Y E I W L D
AACACGGGAGGTTCTGGTTATGACCCCTGTGTCTGGTGCACCTCAAGGCTGAGTGG
N T G G S G S M T L C S G A T F K A E W
AATGCTGCTGTCAACAGAGGTAACCTCCTTGCCAGACGTGGTCTGACTTTGGTTCTAGA
N A A V N R G N F L A R R G L D F G S R
AAGAAAGCAACCGACTACTCCTACATCAGATTGGACTACACTGCTACTTACAGACAAACC
K K A T D Y S Y I R L D Y T A T Y R Q T
GCCTCCGCTAGCGTAACCTCCGTTGTGTCTACGGATGGTCCAGAACAGAGGAGTT
A S A S G N S R L C V Y G W F Q N R G V
CAAGGGCTTCTTGTTGAGTACTACATCATTGAAGATTGGTTGACTGGGTTCCAGAC
Q G V P L V E Y Y I I E D W V D W V P D
GCTCAAGGAAAGATGGTACCATGACGGAGCTCAATAACAAATCTCCAAATGGACCAT
A Q G K M V T I D G A Q Y K I F Q M D H
ACTGGCCCAACTATCAACGGTGGTCCGAGACCTTCAAGCAATACTCTCTGTAGACAA
T G P T I N G G S E T F K Q Y F S V R Q
CAAAAGAGAACGTCTGGTCACATTACTGTCTCTGATCACTTCAAGGAGTGGCTAACCAA
Q K R T S G H I T V S D H F K E W A K Q
GGTGGGGTATCGGTAAACCTGTACGAGGTTGCTTGAATGCCAGGGTTGGCAATCTCT
G W G I G N L Y E V A L N A E G W Q S S
GGTATTGCTGACGTACCCAAGTTGACGTTTACACAAACCCAGAAGGGATCTAACCTTACC
G I A D V T K L D V Y T T Q K G S N P T
ACCGCCGCTCGTACCACTAGAACTACTGCCAGAACTACTGCCAGAACTACTACCAAGAACT
T A A R T T R T T A R T T A R T T T R T
AGAACTTTGCCAACCAACAAACAAGTGTCTTCAAGATTACTGCTCAAGGTTACGAATGC
R T L P T N N K C S S K I T A Q G Y E C
TGTTCCTCTCCAAACTGCGAGATTGTCTACACOGATGACGACGGTAAGTGGGGTAAATAA
C S S P N C E I V Y T D D D G K W G K *

```

图 2-1 来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶 XYN-W 成熟蛋白的核苷酸序列及推导出的氨基酸序列

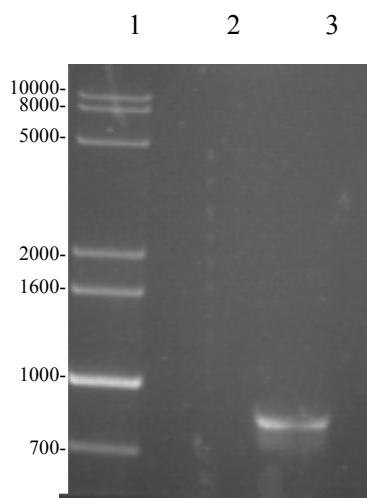
Fig. 2-1 DNA sequence of xylanase gene encoding mature protein of XYN-W from *Neocallimastix frontalis* and its deduced aa sequence

考虑将 *xyn-w* 克隆进适宜的表达载体, 且有正确的起始和阅读框架, 根据已报道的序列设计和合成了两条引物:

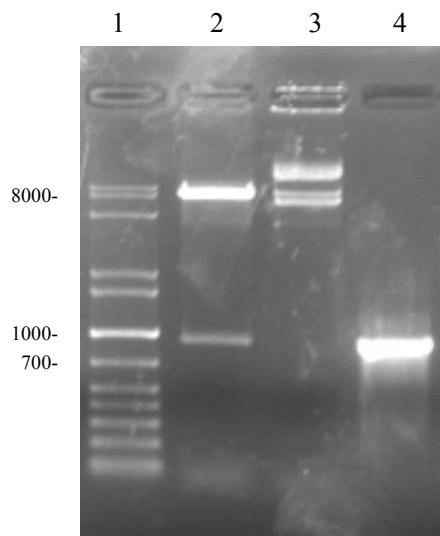
上游引物Z1: 5' AATACGTAACTGTTGCTAAGGCC 3'

下游引物Z2: 5' GGGAATTCTTACCCATTACCAT 3'

在上游引物 Z1 中引入 *SnaBI* 位点(下划线标示), 下游引物 Z2 中引入 *EcoRI* 酶切位点(下划线标示), 以携带 *xyn-w* 基因的质粒 pQE-*xyn-w* 为模板, 用 *TakaRa Taq* 酶进行 PCR 反应, 退火温度为 60°C, 扩增出了目标条带(图 2-2)。

图 2-2 *xyn-w* PCR 扩增产物电泳分析Fig. 2-2 Agarose analysis of PCR product of *xyn-w*1, 1kb Plus Ladder; 2, CK; 3, PCR product of *xyn-w*

PCR 产物经限制性内切酶 *Sna*BI、*Eco*RI 酶切处理后克隆进 pPIC9 质粒载体中，转化大肠杆菌 JM109，涂布 LB（含氨苄 50 μ g/mL）平板。挑选单菌落进行培养，提取培养物的质粒，进行酶切、电泳检测，电泳图显示酶切条带与目的片段大小一致（图 2-3）。对重组子进行了序列测定，证明 PCR 产物的正确性。重组质粒图谱见图 2-4

图 2-3 重组质粒 pPIC9-*xyn-w* 的酶切鉴定Fig. 2-3 Gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pPIC9-*xyn-w* by restriction digestion1. 1kb Plus Ladder, 2. pPIC9-*xyn-w*/EcoRI+SnaBI, 3. pPIC9-*xyn-w*, 4. PCR product of *xyn-w*

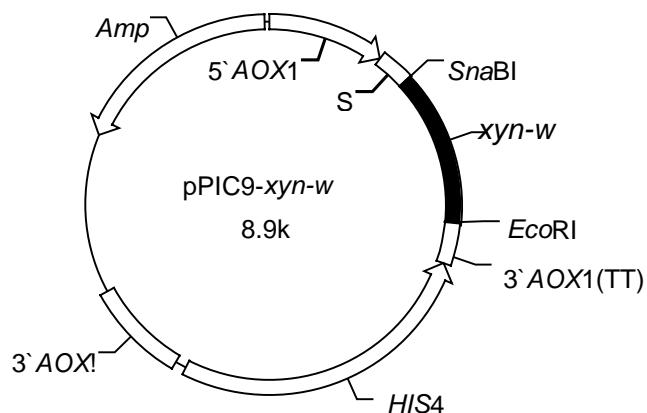


图 2-4 重组表达质粒 pPIC9-xyn-w 的物理图谱

Fig. 2-4 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-xyn-w

2.3.3 木聚糖酶基因 *xyn-w* 在毕赤酵母中的表达

(1) 木聚糖酶高效表达重组酵母的筛选

以毕赤酵母 GS115(*His*⁻, *Mut*⁺)作为表达宿主菌, 经组氨酸缺陷平板初步筛选得到的转化子经甲醇诱导 48 h 后, 测定发酵液上清中的木聚糖酶活性。从 300 个转化子中筛选到 88 株表达木聚糖酶的重组子, 阳性率约为 29.3%。同时, 通过 SDS-PAGE 鉴定木聚糖酶蛋白的表达, 从 SDS-PAGE 电泳上可看到毕赤酵母表达的木聚糖酶的分子量约为 33 kD 左右, 与依据氨基酸序列推断出的理论分子量相当。

表 2-2 摆床水平部分转化子木聚糖酶的表达

Table 2-2 Expression of Xylanase in Shake Flask Culture

诱导时间(h)	酶活(U/mL)	菌株号 [#]						
		16	58	105	106	149	208	256
24	945.5	270.0	393.4	656.2	719.2	476.0	694.3	602.9
48	1264.4	367.0	520.9	920.2	842.3	591.9	829.5	685.6
60	1594.9	520.8	685.2	1591.3	1153.7	870.9	1276.7	932.4

酶活性测定结果(表 2-2)表明, 各重组子在整个诱导阶段酶活一直处于上升趋势, 其中 16[#]转化子在诱导 60 h 后的酶活性最高, 为 1594.9 U/mL。

(2) 重组酵母中木聚糖酶基因的 PCR 分析

为了检测木聚糖酶基因 *xyn-w* 在酵母染色体上的整合, 利用克隆时所用的引物 Z1、Z2, 以重组酵母的染色体为模板进行扩增。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在约 900 bp 处出现了一条带, 与目的基因大小相符, 证实了木聚糖酶基因 *xyn-w* 已整合到酵母染色体上。进一步, 我

我们将扩增产物进行了序列测定,结果表明,整合的序列完全正确。

2.3.4 重组酵母在5L发酵罐中的细胞高密度发酵

(1) 发酵罐水平木聚糖酶的表达

选取在摇床水平上表达量最高的菌株16[#]进行5L发酵罐水平上的研究。在5L发酵罐中,在甲醇未诱导之前,处于菌株培养和碳源饲喂阶段,在这两个阶段内,菌体大量增长,菌体湿重可达192g/L,在发酵液上清中检测不到木聚糖酶活性,SDS-PAGE也表明此时无木聚糖酶蛋白的表达。在甲醇诱导过程中每隔12h取样一次,测定其酶活性(图2-5)并进行表达蛋白的SDS-PAGE分析(图2-6)。诱导120h以后,发酵液上清中的木聚糖酶效价可达13000IU/mL,经SDS-PAGE对表达蛋白进行初步定量,诱导120h后木聚糖酶的表达量为1mg/mL左右。

(2) 5L发酵罐中重组酵母的遗传稳定性

通过设计的引物,分别经5轮发酵及PCR检测结果表明(表2-3),菌株生长的生物量、速度及木聚糖酶的表达量在各轮中基本保持稳定;经过5轮的连续培养, *xyn-w*基因依然稳定整合在*P. pastoris*基因组中。这些结果证明重组*P. pastoris*具有良好的遗传稳定性。

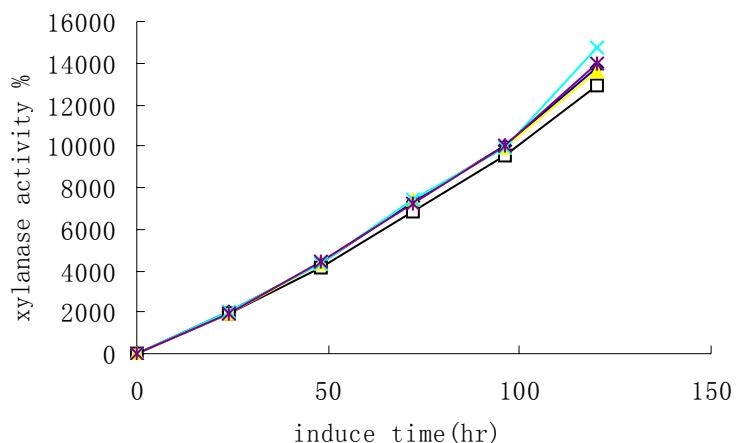


图 2-5 16[#]菌株 5 批次发酵罐水平木聚糖酶活性随诱导时间的积累

Fig. 2-5 Accumulation of enzymatic activity with different induction time in 5 L fermentor for five times

表 2-3 重组毕赤酵母的遗传稳定性

Table 1 Genetic stability of recombinant *P. pastoris*

传种代数	PCR 阳性率 (%)	生长 24h 的生物量菌体湿重 (g/L)	诱导 120 h 后菌体湿重 (g/L)	诱导 120 h 木聚糖酶表达量 (IU)
1	100%	143	332	13098
2	100%	152	319	12899
3	100%	150	341	13132
4	100%	140	330	13969
5	100%	159	329	13568

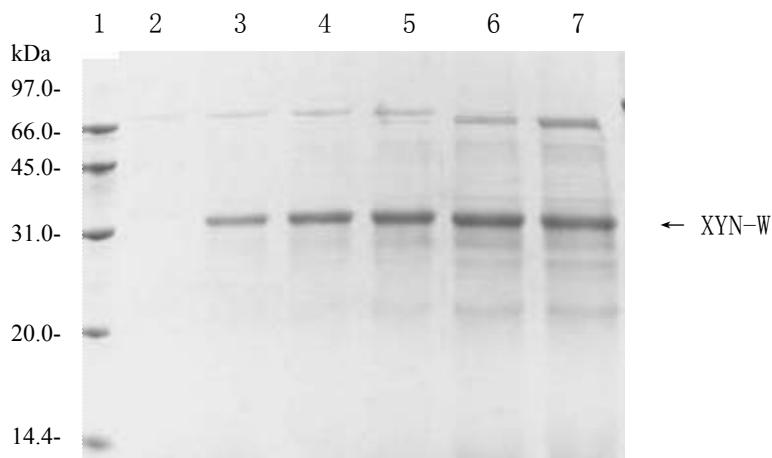


图 2-6. 5L 发酵罐中木聚糖酶 XYN-W 经甲醇诱导不同时间的表达量

Fig. 2-6 SDS-PAGE of expressed xylanase XYN-W in the 5L fermentor with different induction time.

1, Low molecular marker; 2, 3, 4, 5, 6 and 7, Formented broth after induced by methanol for 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 120 h.

2.3.5 木聚糖酶 XYN-W 的纯化

毕赤酵母表达的木聚糖酶发酵液样品经分子筛 Superdex _75_ HR_10/30 (amersham pharmacia biotech 预装柱) 纯化所得到的样品经 SDS-PAGE (图 2-7) 验证, 证明纯化后的木聚糖酶为单一一条带。

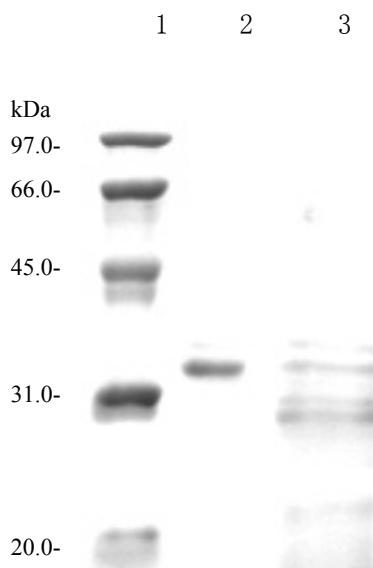


图 2-7 纯化的木聚糖酶 XYN-W 的 SDS-PAGE

Fig. 2-7 SDS-PAGE analysis of the purified xylanases XYN-W

1, Protein marker of Low molecular weight; 1, Purified XYN-W; 2, Crude XYN-W

2.3.6 最适 pH 和 pH 稳定性

纯化的木聚糖酶 XYN-W 在不同 pH 的缓冲体系、55℃下测定的 pH 适性结果 (图 2-8) 表明: XYN-W 的最适 pH 为 5.6, 在 pH5.0~6.6 范围内, 酶活性维持在 80% 以上, pH 在 4.0 以下和 8.0 以上, 检测不到酶活性。

pH 稳定性试验表明 (图 2-9) XYN-W 在 pH 4.6~9.0 之间稳定, 剩余酶活性在 80% 以上, 在 pH3.6 缓冲液中处理 30 min 后仍剩余 40% 以上的酶活。说明此酶的 pH 稳定性较好。

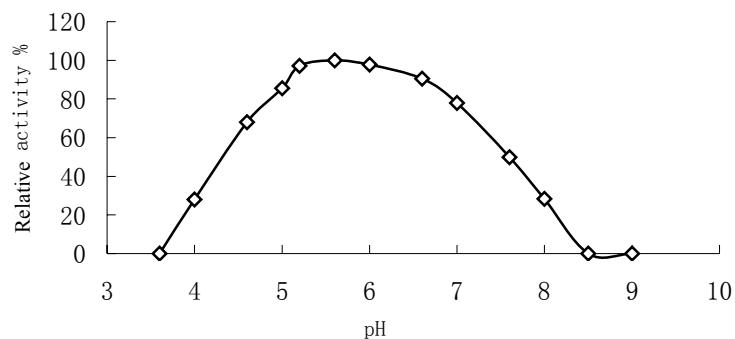


图 2-8 XYN-W 的最适 pH

Fig. 2-8 The Optimum pH of XYN-W

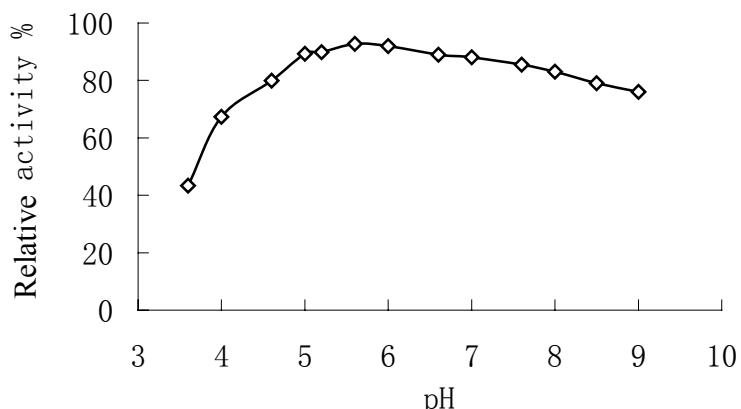


图 2-9 XYN-W 的 pH 稳定性

Fig. 2-9 The pH stability of XYN-W

2.3.7 XYNW 酶反应最适温度及热稳定性

酶反应最适温度测定结果(图 2-10)表明, XYN-W 最适温度为 60℃, 在 50~70℃之间, 酶活性保持在最高酶活的 50%以上。酶的热稳定性试验表明(图 2-11), 在 60℃下保温 5 min, 剩余酶活性为 34%, 保温 10 min 后酶活基本丧失。50℃下保温 30 min, 剩余酶活性为 70.8%, 保温 60 min, 剩余酶活性为 52.2%。

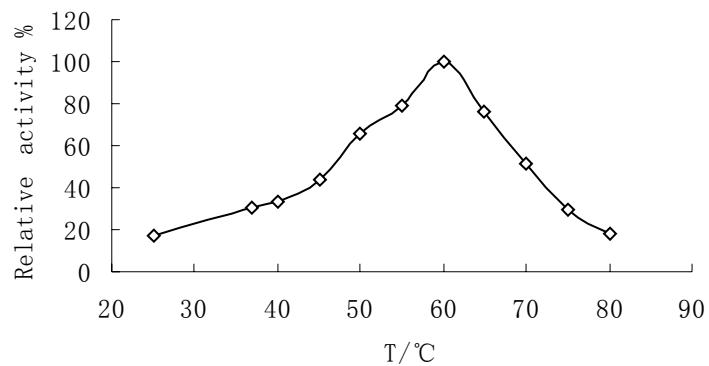


图 2-10 XYN-W 的最适反应温度

Fig. 2-10 The Optimum temperature of XYN-W

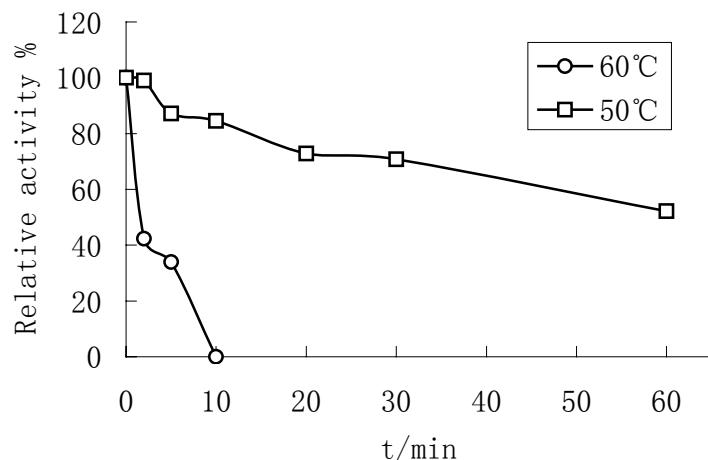


图 2-11 XYN-W 的热稳定性

Fig. 2-11 The thermal stability of XYN-W

2.3.8 不同化学试剂对 XYN-W 酶活的影响

在酶促反应体系中加入不同的化学试剂，然后分别测定酶活性。结果表明，只有 SDS 对 XYN-W 有抑制作用，其余化学试剂对 XYN-W 的酶促反应无显著影响（表 2-4）。

表 2-4 各种化学试剂对木聚糖酶 XYNW 活力的影响

Table 2-4 Effect of various chemicals on the activity of XYNW

试剂	浓度 (mmol/L)	相对酶活 (%)
FeCl3	1	99
NaCl	1	98
MnSO4	1	92
NiSO4	1	96
CuSO4	1	89
CrCl3	1	97
CaCl2	1	97
LiCl	1	97
ZnSO4	1	99
MgSO4	1	98
KCl	1	101
CoCl	1	93
EDTA	1	91
SDS	1	65
CK		100

2.3.9 木聚糖酶 XYN-W 的 K_m 值及 V_{max} 的测定

对木聚糖酶 XYN-W 的反应初速度进行测定，结果在 0~20 min 内酶活性与反应时间的比值保持稳定，其反应初速度为 $811.858 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。根据此数值，确定测定 XYN-W 的 K_m 值及 V_{max} 时的反应时间为 10 min。

根据以上所测定的 XYN-W 的反应初速度，确定测定 XYN-W 的 K_m 值及 V_{max} 时的反应时间为 10 分钟。 XYN-W 以 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (Sigma 公司 From Oat Spelts) 为底物时的 K_m 值为 2.5 mg/mL (因无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度)， V_{max} 为 $5000 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ， K_{cat} 值为 2717.1s^{-1} 。

2.3.10 比活测定

取纯化后的酶液通过考马斯亮蓝法测定酶液中的蛋白含量，再通过木聚糖酶酶活性测定方法，测得其酶活，最后得到木聚糖酶 XYN-W 的比活为 13795.3 IU/mg 。

2.3.11 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力

木聚糖酶 XYN-W 用胃蛋白酶处理 60 min 后, 酶活仅剩余 30%; 用胰蛋白酶处理 60 min 后酶活剩余 95% 以上, 说明木聚糖酶 XYN-W 具有非常好的抗胰蛋白酶水解能力, 而抗胃蛋白酶水解的能力较弱。

第三章 木聚糖酶 XYN-W 比活性改良

3.1 材料及方法

3.1.1 材料

本试验中所用的菌株与质粒、试剂盒、工具酶、生化试剂、溶液、培养基和实验仪器均与第二章中 2.1 相同。

3.1.2 木聚糖酶基因 *xyn-w* 的改造

根据 *xyn-w* 基因序列并加入适当的酶切位点设计 PCR 引物(引物由上海生工生物工程有限公司合成)。通过 PCR 的方法, 将木聚糖酶 *xyn-w* 基因的 3' 端 171 个碱基去掉, 构建一个新的突变基因 *xyn-m*。

3.1.3 表达载体 pPIC9-*xyn-m* 的构建

PCR 产物经相应的酶切后与同样经双酶切处理的 pPIC9 质粒相连, 构建成为酵母表达重组载体 pPIC9-*xyn-m*, 具体方法与第二章中 2.1 相同。

3.1.4 *xyn-m* 在毕赤酵母中的表达

依据第二章中的方法将经过 *Bgl*III 酶切线性化的 *xyn-m* 基因转化进入毕赤酵母 GS115, 通过木聚糖酶活性检测挑选出有表达活性的阳性酵母菌株。选取表达水平较高的转化子研究其摇床条件下木聚糖酶的表达, 具体方法与第二章中 2.1 相同。

3.1.5 表达的木聚糖酶的纯化与酶学性质测定

方法与第二章中 2.1 相同。

3.2 结果

3.2.1 木聚糖酶 *xyn-w* 基因的比活性改良

根据 *xyn-w* 碱基序列并加入适当的酶切位点设计 PCR 引物:

xyl_f:5'-GTA GAA TTC ACT GTT GCT AAGGCC C-3'

xyl_r:5'-TAGCGGCCG CTT AGCGG TGG TAGGAT T-3'

其中下划线部分为引入的 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点。通过 PCR 的方法, 将木聚糖酶 *xyn-w* 基因的 3' 端 171 个碱基去掉, 构建出一个新的突变基因 *xyn-m*。

PCR 产物及表达载体 pPIC9 均用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后连接, 构建成重组表达载体

pPIC9-*xyn-m*。重组质粒转化大肠杆菌 JM109, 涂布 LB (含氨苄 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板。挑选单菌落进行培养, 提取培养物的质粒, 进行酶切、电泳检测 (图 3-1)。电泳图显示酶切条带与目的片段大小一致。对重组子进行了序列测定, 证明了 PCR 产物的正确性。

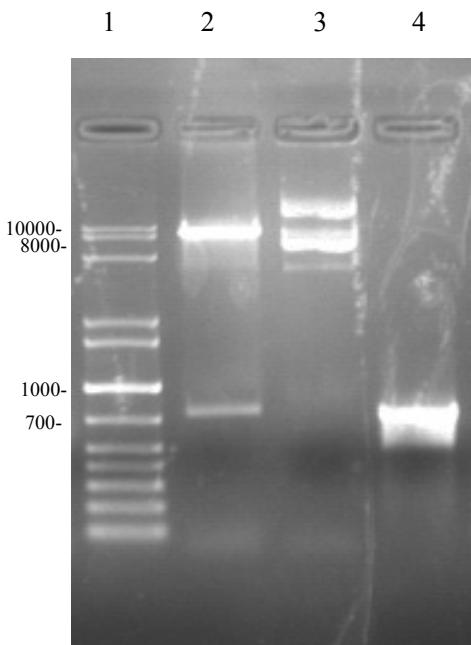


图 3-1. 重组质粒 pPIC9-*xyn-m* 的酶切鉴定

Fig. 3-1 Gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pPIC9-*xyn-m* by restriction digestion

1. 1kb Plus Ladder, 2. pPIC9-*xyn-m*/EcoRI+NotI, 3. pPIC9-*xyn-m*, 4. PCR product of *xyn-m*

3.2.2 木聚糖酶高效表达重组酵母的筛选

重组质粒 pPIC9-*xyn-m* 经 *Bgl*II 线性化处理后电击转化进入毕赤酵母 GS115 (*His*⁻, *Mut*⁺), 经组氨酸缺陷平板初步筛选得到的转化子经甲醇诱导 48 h 后, 测定发酵液上清中的木聚糖酶活性。从 300 个转化子中筛选到 95 株表达木聚糖酶的重组子, 阳性率约为 31.7%。

3.2.3 摆床水平木聚糖酶的表达

将表达水平较高的八株阳性重组子在摇床水平上进行了诱导表达, 试验结果如表所示。表 3-1 说明, 八株菌随时间的增长幅度不同, 但在整个诱导阶段酶活一直处于上升趋势, 其中 2# 转化子在诱导 60 h 后的酶活最高, 为 1051.2 IU/mL。同时, 通过 SDS-PAGE 鉴定木聚糖酶蛋白的表达 (图 3-2), 从 SDS-PAGE 电泳上可看到毕赤酵母表达的木聚糖酶的分子量约为 27 kD 左右, 与依据氨基酸序列推断出的理论分子量相当。

表 3-1 摆床水平部分转化子木聚糖酶的表达

Table 3-1 Expression of xylanase in shake flask culture

诱导时间(h)	酶活 (IU/mL)	菌株号 [#]						
		2	25	81	138	155	198	206
24	443.1	59.0	102.3	112.5	89.3	60.5	200.8	158.5
48	563.8	89.4	225.6	198.6	111.5	186.5	298.7	289.3
60	852.7	115.5	596.5	256.7	153.7	300.7	335.6	489.6
84	906.4	300.5	668.3	400.8	199.7	489.6	419.5	774.3
108	1051.2	414.7	798.4	598.7	265.3	656.7	498.5	906.9

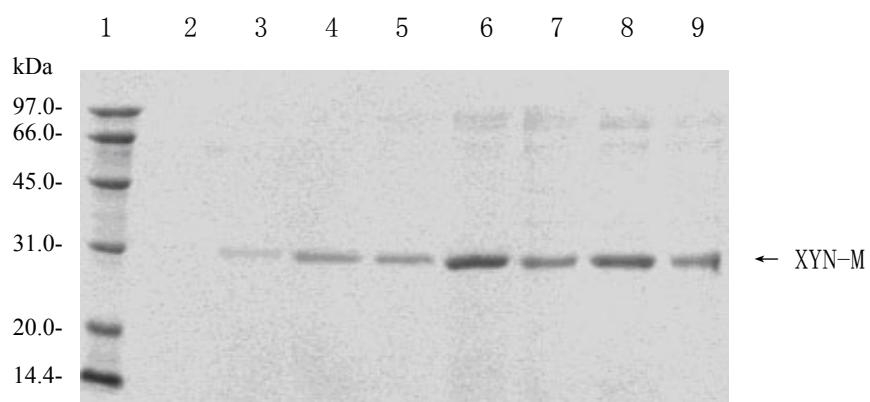


图 3-2 重组酵母 GS115-xyn-m 表达的木聚糖酶 XYN-M

Fig. 3-2 SDS-PAGE of expressed xylanase XYN-M in *P. pastoris* recombinants

1, Protein marker of Low molecular marker; 2, Host *P. pastoris*; 3~9, 7 recombinants of *P. pastoris* GS115-xyn-m

3.2.4 木聚糖酶 XYN-M 的酶学性质测定

(1) 酶的纯化

酶学性质测定方法及所用试剂与第二章 2.2 中相同。经分子筛纯化 SDS-PAGE 电泳检测为单一条带的木聚糖酶 XYN-M(图 3-3)。

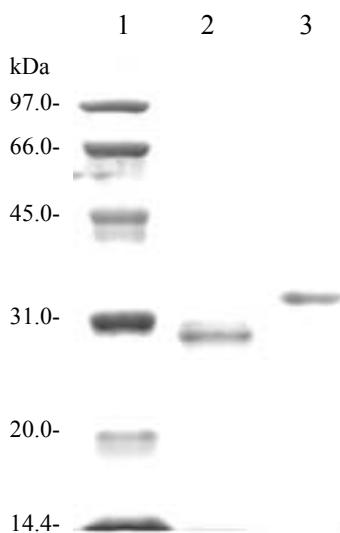


图 3-3 纯化的木聚糖酶 XYN-W 和 XYN-M 的 SDS-PAGE

Fig. 3-3 SDS-PAGE analysis of the purified xylanases XYN-M and XYN-W

1, Protein marker of Low molecular weight; 2, Purified XYN-M; 3, Purified XYN-W

(2) 最适 pH 和 pH 稳定性

纯化的木聚糖酶 XYN-M 在不同 pH 的缓冲体系、55℃下测定的 pH 适性结果 (图 3-4) 表明: XYN-M 的最适 pH 为 5.6, 在 pH 5.0~6.6 范围内, 酶活性维持在 80% 以上, pH 在 3.6 以下和 10.0 以上时检测不到酶活性。

pH 稳定性试验 (图 3-5) 表明 XYN-M 在 pH 4.6~9.0 之间稳定, 剩余酶活性在 80% 以上, 在 pH 3.6 缓冲液中处理 30 min 后仍剩余 40% 以上的酶活。说明此酶的 pH 稳定性较好。

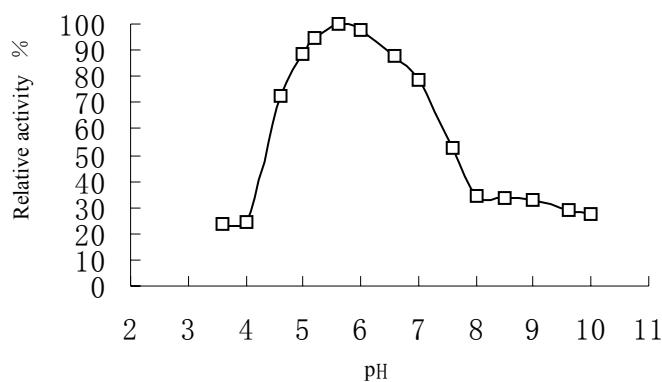


图 3-4 XYN-M 的最适 pH

Fig. 3-4 The Optimum pH of XYN-M

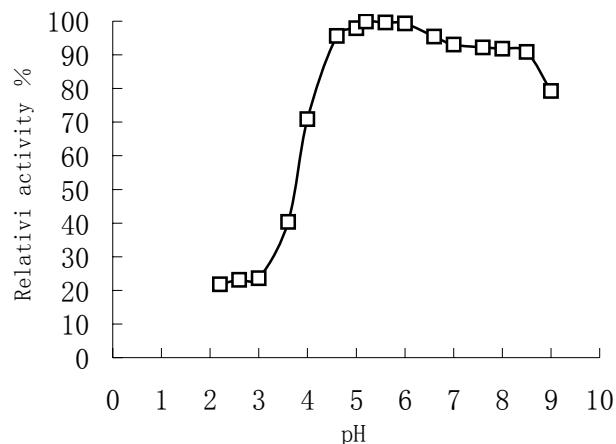


图 3-5 XYN-M 的 pH 稳定性

Fig. 3-5 The pH stability of XYN-M

(3) XYN-M 酶反应最适温度及热稳定性

酶反应最适温度测定结果（图 3-6）表明，XYN-M 最适温度为 60℃，在 50~70℃之间，酶活性保持在最高酶活的 50%以上。酶的热稳定性试验表明（图 3-7），在 60℃下保温 10 min，剩余酶活性为 30%，保温 20 min 后酶活基本丧失。50℃下保温 30 min，剩余酶活性为 67.0%，保温 60 min，剩余酶活性为 49.4%。

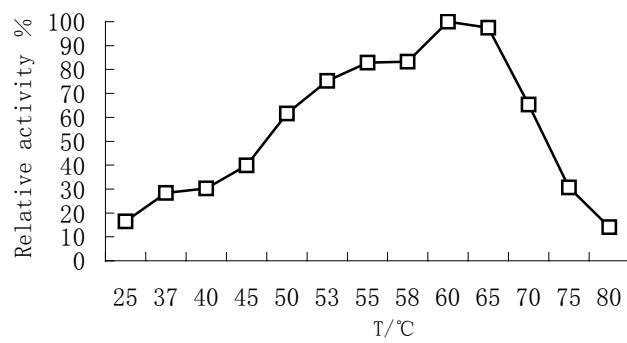


图 3-6 XYN-M 的最适反应温度

Fig. 3-6 The Optimum temperature of XYN-M

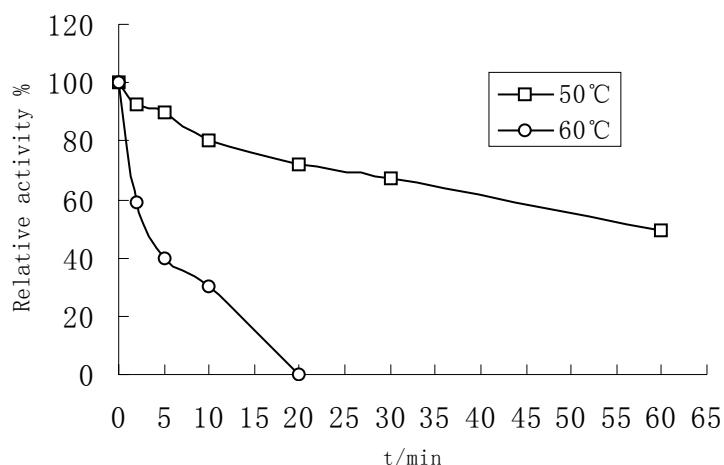


图 3-7 XYN-M 的热稳定性

Fig. 3-7 The thermal stability of XYN-M

(4) 不同化学试剂对 XYN-M 酶活的影响

在酶促反应体系中加入不同的化学试剂,然后分别测定酶活性。结果表明,只有SDS对 XYN-M 有抑制作用。其余化学试剂对 XYN-M 的酶促反应无显著影响(表 3-2)。金属离子对 XYN-M 活性影响较大, Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活有 10~20% 的增强作用,而 Cu^{2+} 会抑制 50% 的酶活。

表 3-2 各种化学试剂对木聚糖酶 XYN-M 活力的影响

Table 3-2 Effects of various chemicals on the activity of XYN-M

试剂	浓度 (mmol/L)	相对酶活 (%)
FeCl_3	1	122.2
NaCl	1	80.6
MnSO_4	1	114.7
NiSO_4	1	95.1
CuSO_4	1	54.2
CrCl_3	1	97.6
CaCl_2	1	88.2
LiCl	1	92.5
ZnSO_4	1	89.9
MgSO_4	1	99.6
KCl	1	83.7
CoCl	1	108.0
EDTA	1	93.0
SDS	1	61.7
CK		100

(5) 木聚糖酶 XYN-M 的 K_m 值及 V_{max} 的测定

对木聚糖酶 XYN-M 的反应初速度进行测定, 结果在 0~20 min 内酶活性与反应时间的比值保持稳定, 其反应初速度为 $1209.33 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。根据此数值, 确定测定 XYN-M 的 K_m 值及 V_{max} 时的反应时间为 10 min。

XYN-M 以 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (Sigma 公司 From Oat Spelts) 为底物时的 K_m 值为 4.0 mg/mL (因无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度), V_{max} 为 $10000 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$, K_{cat} 值为 4433.8 S^{-1} 。

(6) 比活测定

取纯化后的酶液通过考马斯亮蓝法测定酶液中的蛋白含量, 再通过木聚糖酶活性测定方法, 测得其酶活, 最后得到木聚糖酶 XYN-M 的比活为 19856.6 IU/mg 。

(7) 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力

木聚糖酶 XYN-M 用胃蛋白酶处理 5 min 后酶活性剩余 27.7%, 10 min 后酶活性剩余 0; 用胰蛋白酶处理 60 min 后酶活剩余 95% 以上。说明木聚糖酶 XYN-M 具有非常好的抗胰蛋白酶水解能力, 而抗胃蛋白酶水解的能力较弱。

3.2.5 XYN-W 和 XYN-M 的性质比较

从测定的酶学性质结果(表 3-3)可以看出: 1) 两种木聚糖酶在最适 pH 和 pH 稳定性方面基本相同; 2) 两种酶的最适反应温度相同, 在热稳定性方面 XYN-M 略优于 XYN-W; 3) 两种酶的酶动力学参数相比, XYN-W 的比活提高了 43.9%、 K_{cat} 提高了 63.2%、 V_{max} 提高了 1 倍。4) 与 XYN-W 相比, 金属离子对 XYN-M 活性影响较大, Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活有 10~20% 的增强作用, 而 Cu^{2+} 会抑制 50% 的酶活。5) 两种酶均对胰蛋白酶具有很好的抗性。总体来看, 改良后的 XYN-M 其催化效率得到了较大幅度的提高。

表 3-3 木聚糖酶 XYN-W、XYN-M 的酶学性质

Table 3-3 The enzyme characteristics of XYN-W and XYN-M

Properties of enzyme	XYN-W	XYN-M
Optimum pH	5.6	5.6
pH stability (pH range in which the relative activity was above 70%)	5.0~7.0	4.6~7.0
Optimum temperature (°C)	60°C	60°C
Thermostability (Residual activity after incubation at 60°C for 5min)	34%	40%
Thermostability (Residual activity after incubation at 50°C for 60 min)	52%	50%
Specific activity (IU·mg ⁻¹)	13795.3	19856.6
K _m (mg/mL)	2.5	4.0
k _{cat} (S ⁻¹)	2717.1	4433.8
V _{max} (IU/mg · min)	5000	10000
Effect of metal ion and EDTA on enzymatic activity	No effects on activity	Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ activate slightly. Cu ²⁺ inhibit and others show no effects on activity
Effect of SDS on enzymatic activity	Retain above 65% of its activity after incubation for 30 min	Retain above 61% of its activity after incubation for 30 min
Resistance to pepsin	Retain above 30% of its activity after incubation for 10 min and 60 min, respectively	Retain above 27% of its activity after incubation for 5 min
Resistance to trypsin	Retain above 95% of its activity after incubation for 60 min	Retain above 95% of its activity after incubation for 60 min

第四章 木聚糖酶 XYN-W 的饲喂试验

4. 1 木聚糖酶 XYN-W 对肉仔鸡生产性能的影响

4.1.1 试验方法

(1) 试验日粮

(A) 木聚糖酶用量

根据常见饲料原料中总非淀粉多糖 (TNSP)、阿拉伯糖、木糖等的含量 (表 4-1)，以及将要使用的饲料配方 (表 4-2)，计算日粮中 TNSP、阿拉伯糖、木糖的含量 (表 4-3)，根据此计算结果初步设定木聚糖酶的添加量和使用方法。

表 4-1 几种常见饲料原料中 NSP 含量和组成 (g/kg DM)

Table 4-1 NSP content and compose in some feed ingredient (g/kg DM)

饲料原料	TNSP	SNSP	INSP	阿拉伯糖	木糖	葡萄糖	半乳糖	甘露糖	糖醛酸
玉米	90	13	77	18	25	30	5	14	-
小麦	114	24	94	33	48	28	3	-	2
小麦麸皮	416	32	384	98	188	110	7	1	12
大豆	156	-	-	42	11	42	43	14	26

表 4-2 日粮组成及营养水平

Table 4-2 Dietary composition and nutrition level

周齡(w)	1-3	1-3	4-6	4-6
小麦		40		40
玉米	54	18.9	54.53	19.51
原 豆粕	36.17	31	35.55	30.37
料 国产鱼粉	2.0	2.0	1.0	1.0
及 植物油	3.7	4.06	4.92	5.23
配 蛋氨酸	0.26	0.26	0.07	0.06
及 赖氨酸	0.07	0.21	0.03	0.17
配 氯化胆碱	0.1	0.1	0.1	0.1
比 磷酸氢钙	1.5	1.23	1.61	1.29
比 石粉	1.0	1.04	0.9	0.99
比 食盐	0.2	0.2	0.3	0.3
比 预混料*	1	1	1	1
合 计	100	100	100	100
代 谢能, Mkal/kg	2.98	2.95	3.05	3.05
营 粗蛋白, %	21.5	21.5	20.5	20.5
养 钙, %	0.96	0.95	0.88	0.88
组 有效磷, %	0.48	0.48	0.46	0.46
成 赖氨酸, %	1.16	1.14	1.08	1.08
蛋+胱氨酸, %	0.91	0.91	0.70	0.70

*: 每公斤肉小鸡 (0-3 周龄) 预混料中提供: 铜 0.35g, 锰 4g, 锌 5g, 铁 3.5, 碘 0.04 g, 硒 0.02g; 维生素A 1

$\times 10^6$ IU, 维生素D₃ 2×10^5 IU, 维生素E1200 IU, 维生素K₃ 90mg, 维生素B₁ 90mg, 维生素B₂ 0.4g, 维生素B₆ 0.1g, 维生素B₁₂ 1 mg, 叶酸 50mg, 生物素 3mg, 烟酸 2g, 泛酸钙 0.5g。蛋氨酸 130g, 氯化胆碱 40 g。

*: 每公斤肉中鸡 (3-6 周龄) 预混料中提供: 铜 0.35g, 锰 4g, 锌 4.5g, 铁 3.5g, 碘 0.04g, 硒 0.02g, 维生素A8 $\times 10^5$ IU, 维生素D₃ 1.6×10^5 IU, 维生素E960IU, 维生素K₃ 60mg, 维生素B₁ 60mg, 维生素B₂ 0.37g, 维生素B₆ 0.08g, 维生素B₁₂ 0.8mg, 叶酸 40mg, 生物素 2.5mg, 烟酸 1.5g, 泛酸钙 0.4g。蛋氨酸 110g, 氯化胆碱 30g。

表 4-3 根据饲料配方计算日粮中的戊聚糖含量

Table 4-3 Calculated pentosans content in the feed according to the feed formula

饲料原料	TNSP	阿拉伯糖	木糖
0-3 周 玉米-豆粕	119.13	28.71	18.56
0-3 周 小麦-玉米-豆粕	123.06	32.88	28.27
4-6 周 玉米-豆粕	118.40	28.48	18.61
4-6 周小麦-玉米-豆粕	122.38	32.66	28.33

表 4-4 实验处理设置

Table 4-4 Trail design

处理	日粮类型	木聚糖酶添加量
1	玉米-豆粕	0
2	玉米-豆粕	1000 IU/kg
3	小麦-豆粕	0
4	小麦-豆粕	500 IU/kg
5	小麦-豆粕	1000 IU/kg
6	小麦-豆粕	1500 IU/kg

(B) 试验安排

试验尽量使每个重复分开, 六个处理的各重复均匀分布于控制温度的室内。

(C) 试验日粮

试验日粮各处理试验设计见表 4-4, 饲料原料相同。营养指标依据 NRC (1994), 并结合 AA 肉仔鸡饲养手册进行配比。

(2) 饲养管理及试验记录

网上平养, 自由采食, 自由饮水。试验过程中, 每日以重复为单位, 记录死淘鸡数, 记录每次饲料添加总量; 每日清晨 8:30 AM 和下午 2:30 PM 分别记录鸡舍温度和湿度, 定时清扫卫生。每周结料一次, 计算平均采食量、死亡率。分别于 3 周龄和试验末以重复为单位称重, 记录总重量和总鸡数, 计算采食量、日增重、死亡率、饲料转化率等生产性能指标。

试验过程中, 要求饲养管理人员认真负责, 有责任心, 严格按照技术要求和程序进行饲养管理, 认真填写有关表格; 按常规的操作程序进行疫苗接种防疫, 记录防疫情况; 试验场地和鸡舍清洁卫生, 并进行正常消毒; 试验鸡舍通风良好, 并保持所需的温度; 饲料生产要按标准进行, 不受潮, 不结块, 无霉变, 不添加任何其它的抗生素和促生长剂; 饮水水质良好, 无污染; 试用雏鸡健壮, 达到商品雏鸡标准。

(3) 指标及测定方法

4 种配合饲料的粗蛋白、总能、钙、磷测定；
平均采食量、饲料转化率、发病率、死亡率计算；
体增重分别于 1 日龄、21 日龄和试验结束当天以重复为单位称重，计算平均增重。

食糜黏度：21 日龄每个重复取两只鸡，颈部处死，迅速剖开腹腔，将十二指肠、空肠、回肠两端分别结扎后取出全部小肠，轻轻取出食糜，马上置于 12000 g 离心 20min，取上清液用于黏度测定。采用奥式粘度计（Φ0.5-0.6 mm）测定全小肠道食糜相对黏度。测定时将粘度计放入 30 ± 1°C 的恒温水域锅内，预热 5min，然后用吸耳球将离心后的上清液 5 ml 吸入粘度计，以秒表记录液体全部流出需要的时间 (T1)，同样的方法测定同体积的蒸馏水在同一粘度计中流出所需要的时间 (T2)，根据如下公式计算：相对黏度 (%) = 100% * T1/T2。

(4) 统计分析

以重复（栏）为单位，计算各阶段每个处理组日增重、饲料采食量和饲料转化率（采食量/增重），以及腹泻率的数据用 EXCEL 软件进行数据整理，用 SAS8.2 软件 ANOVA 程序进行统计分析。

4.1.2 试验结果与分析

(1) 木聚糖酶对肉仔鸡生产性能的影响

(A) 对体重和平均体增重的影响

日粮中添加木聚糖酶对肉仔鸡体重和平均体增重的影响见表 4-5。从表中可看出向玉米-豆粕型日粮中添加 1000 IU/kg 的木聚糖酶对肉仔鸡 21 和 42 日龄时的平均体重、0~21、21~42 日龄的平均日增重均没有显著影响 (P>0.05)，但是日粮中添加木聚糖酶后对增重指标均有改善作用，因为玉米日粮中也含有一定量的木聚糖，所以日粮中添加木聚糖有一定的作用，并且这种改善作用在前期 (0~3 周龄) 的作用比较明显。

表 4-5 木聚糖酶对肉仔鸡体重和平均体增重的影响

Table 4-5 Effect of xylanase on body weight and average daily gain of broilers

指标	体重 (g/只)		平均日增重 (g/天/只)	
	3 周龄	6 周龄	0~3 周	4~6 周
处理				
玉米	554.6 ± 46.6 ^{aA}	1887.8 ± 117.5 ^A	24.4 ± 2.2 ^{aA}	63.5 ± 4.1 ^{aA}
玉米+1000	577.2 ± 27.4 ^{aA}	1908.3 ± 144.4 ^A	25.5 ± 1.3 ^{aA}	63.4 ± 6.2 ^{aA}
小麦	223.1 ± 40.4 ^{dC}	969.9 ± 186.8 ^C	8.6 ± 2.0 ^{dC}	35.6 ± 8.8 ^{cC}
小麦+500	312.0 ± 24.2 ^{bA}	1233.4 ± 164.3 ^{BC}	12.8 ± 1.2 ^{bB}	43.9 ± 7.2 ^{bcBC}
小麦+1000	290.6 ± 18.7 ^{bcA}	1334.3 ± 94.3 ^{BC}	11.8 ± 0.9 ^{bcB}	49.7 ± 4.3 ^{bB}
小麦+1500	267.5 ± 20.4 ^{cBC}	1285.2 ± 252.1 ^{BC}	10.7 ± 1.0 ^{cBC}	45.6 ± 12.8 ^{bcBC}
SEM	31.37	164.1	1.5	7.8
P 值	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

a, b, c: 同列肩标字母相同者为差异不显著 (p>0.05)，不同者差异显著 (P<0.05)。

A, B, C: 同列肩标字母相同者为差异不显著 (p>0.01)，不同者差异显著 (P<0.01)。

分别向小麦-玉米-豆粕型日粮中添加 500、1000、1500 IU/kg 的木聚糖酶, 相对于对照可以显著提高 21 和 42 日龄肉仔鸡的平均体重 ($P<0.05$)、0~21 和 22~42 日龄的平均体增重 ($P<0.05$); 从表中还可以看出 3 个添加水平之间, 肉仔鸡的生产性能没有显著差异, 这从一个侧面反映出日粮中添加 500 IU/kg 的木聚糖酶已经足够。饲喂小麦日粮的肉仔鸡的生产性能, 比饲喂玉米日粮的差, 这是可能与小麦日粮的抗营养因子除木聚糖酶外, 还含有 β -葡聚糖等其他抗营养因子, 因此小麦日粮中除添加木聚糖酶外, 还需要 β -葡聚糖酶等。

(B) 平均耗料量和饲料效率的影响

日粮中添加木聚糖酶对肉仔鸡平均耗料量和饲料效率的影响见表 4-6。从表中可看出向玉米-豆粕型日粮中添加 1000 IU/kg 的木聚糖酶对肉仔鸡 0~3 周和 3~6 周龄的平均耗料量和饲料效率均无显著影响 ($P>0.05$), 但有增加采食量和改善饲料转化率的趋势。

小麦日粮中添加木聚糖酶提高了肉仔鸡的采食量, 改善了肉仔鸡的饲料转化效率。分别向小麦-玉米-豆粕型日粮中添加 500、1000、1500 IU/kg 的木聚糖酶可以显著改善饲料效率 ($P<0.05$); 向小麦-玉米-豆粕型日粮中添加 500 IU/kg 木聚糖酶时对 22~42 日龄肉仔鸡的平均耗料量和饲料效率没有显著影响 ($P>0.05$), 但是具有提高和改善的趋势; 添加 1000 和 1500 IU/kg 的木聚糖酶与添加 500 IU/kg 的相比具有对 22~42 日龄肉仔鸡的生长性能具有提高和改善的趋势。

采食添加或不添加木聚糖酶的小麦-玉米-豆粕型日粮的肉仔鸡的生产性能 (平均体增重、饲料效率、平均日增重和平均耗料量) 均不如采食玉米-豆粕型日粮的肉仔鸡 ($P<0.05$)。小麦-玉米-豆粕型日粮的三个木聚糖酶的添加水平之间差异不显著, 从生产性能角度来讲, 小麦日粮中需要添加木聚糖酶, 但是 500 IU/kg 已经满足需要。

表 4-6 木聚糖酶对肉仔鸡平均耗料量和饲料效率的影响

Table 4-6 Effect of xylanase on feed consumption and feed conversion of broilers

指标	平均耗料量 (g/日/鸡)		饲料/增重	
	0-3 周	4-6 周	0-3 周	4-6 周
处理	0-3 周	4-6 周	0-3 周	4-6 周
玉米	37.8±3.2 ^{aA}	124.9±16.4 ^A	1.55±0.031 ^c	2.0±0.19 ^{BB}
玉米+1000	38.7±3.9 ^{aA}	127.5±12.0 ^A	1.52±0.096 ^c	2.0±0.09 ^{bbB}
小麦	20.9±4.0 ^{cB}	95.4±18.2 ^B	2.47±0.25 ^A	2.9±0.94 ^{aA}
小麦+500	25.2±1.8 ^{BB}	102.1±13.4 ^B	1.97±0.17 ^B	2.4±0.16 ^{abAB}
小麦+1000	24.1±1.5 ^{bcB}	102.3±9.1 ^B	2.05±0.21 ^B	2.1±0.19 ^{bbB}
小麦+1500	22.8±2.3 ^{bcB}	96.9±12.6 ^B	2.13±0.060 ^B	2.2±0.66 ^{abAB}
SEM	2.96	13.92	0.157	0.484
P 值	0.0001	0.0004	0.0001	0.0369

a, b, c: 同列肩标字母相同者为差异不显著 ($p>0.05$), 不同者差异显著 ($P<0.05$);

A, B, C: 同列肩标字母相同者为差异不显著 ($p>0.01$), 不同者差异显著 ($P<0.01$)。

(2) 木聚糖酶对肉仔鸡肠道食糜黏度的影响

本文测定的肉仔鸡全肠道黏度数据, 是指肠道食糜上清液相对黏度。研究表明玉米基础日粮的相对黏度 (3.23 和 2.4) 均高于相应的小麦日粮组。我们认为主要是因为, 采食小麦日粮的肉

仔鸡的饮水量明显比玉米日粮多，导致了采食小麦日粮的肉仔鸡的肠道中食糜较稀薄，营养物质含量减少，造成了可吸收的营养物质减少，这可能是小麦日粮影响肉仔鸡生产性能的主要原因。

表 4-7 木聚糖酶对肉仔鸡肠道食糜上清液黏度的影响

Table 4-7 Effect of xylanase on intestine digesta viscosity in broilers

日粮类型	小麦基础日粮	小麦+500	小麦+1000	小麦+1500	SEM	P 值
相对黏度	2.83±0.63 ^a	2.19±0.64 ^b	2.13±0.42 ^b	2.13±0.17 ^b	0.503	0.0710

研究认为木聚糖对肉仔鸡生产性能的影响主要是因其为不可溶性木聚糖，不能被动物消化，在肠道中吸水膨胀，导致肠道食糜黏度增加，从而影响动物的生产性能。玉米日粮中也含有一定量的木聚糖，因此木聚糖酶对玉米日粮也有一定的作用，降低了肠道食糜黏度。小麦日粮对木聚糖酶的添加的反映更加明显，不添加木聚糖酶的小麦日粮的肉仔鸡的肠道食糜黏度显著低于为添加木聚糖酶的小麦-玉米-豆粕型日粮（P<0.05），但是个添加水平之间没有显著差异。

表 4-8 小麦和玉米中非淀粉多糖的类型和含量 (g/kg DM)

Table 4-8 NSP Type and content in wheat and corn (g/kg DM)

	阿拉伯木聚糖	β-葡聚糖	纤维素	其他	总计	文献来源
小 水溶	1.8	0.4		0.2	2.4	Englyst, 1989
麦 不溶	6.3	0.4	2.0	0.3	9.0	
玉 水溶	0.1	微量			0.1	周晓容, 2003
米 不溶	5.1		2.0	0.8	8.0	

(3) 木聚糖酶对肉仔鸡死亡率的影响

试验期间各处理的死亡数据见表 4-9。由表 9 可以看出日粮中添加木聚糖酶有降低肉仔鸡死亡率的作用，玉米日粮中添加木聚糖酶，死亡率降低 3 个百分点；小麦日粮添加 1500 IU/kg 的木聚糖酶，死亡率降低了 5 个百分点，降低比较明显，但是添加 500 IU/kg 对死亡率没有影响。

表 4-9 木聚糖酶对不同日粮处理组肉仔鸡死亡率的影响

Table 4-9 Effect of xylanase on mortality in broilers

日粮类型	玉米日粮	玉米+1000	小麦日粮	小麦+500	小麦+1000	小麦+1500
死亡 (只)	5	2	8	8	4	3
死亡率 (%)	5.21	2.08	8.33	8.33	4.17	3.13

4.1.3 小结

从以上试验结果可得出以下结论：向玉米-豆粕型日中添加 1000 IU/kg 的木聚糖酶对肉仔鸡前期和后期的生长性能都没有显著的影响 ($P>0.05$)，但有改善的趋势；小麦-玉米-豆粕型日粮中添加木聚糖酶提高了肉仔鸡的采食量，改善了肉仔鸡的饲料转化效率；小麦-玉米-豆粕型日粮中 3 个木聚糖酶添加水之间对肉仔鸡生产性能无显著影响，对肠道食糜年度的影响也如此，提示 500 IU/kg 本项目产品也能满足分解木聚糖的需要。

4.2 木聚糖酶对肉仔鸡表观代谢能和养分消化率的影响

4.2.1 材料与方法

(1) 试验材料

(A) 木聚糖酶

中国农业科学院饲料研究所基因工程研究室分离克隆木聚糖酶的编码基因 *xyn-w*，并构建了高效表达此木聚糖酶的重组酵母菌，在小试水平上证实了重组酵母的遗传稳定性和木聚糖酶的表达稳定性，本次试验所需要的木聚糖酶 (6000IU/g) 即来自该研究室，木聚糖酶在饲料中直接添加随同其他饲料原料一起混合。

木聚糖酶定义 (IU)：在一定条件下，每分钟从底物木聚糖中水解出 1 μ mol 木糖所需的酶量；测定条件：温度 55°C；pH 5.5，酶促反应时间：10 min，底物：燕麦木聚糖。

(B) 试验动物及安置

由肉鸡公司购进 0 日龄 AA 肉仔鸡 100 羽，分为：6 个处理，每个处理 16 羽，每个处理分 4 个重复，每个重复 4 羽肉仔鸡。采用四层立体网上养殖（使用上面三层）。1~33 日龄饲喂颗粒料，35 日龄开始饲喂试验日粮。

(2) 试验设计与试验动物

本试验采用单因子随机区组设计。每种饲料处理为一个处理，处理的选定基于试验一的 6 个处理，将 1500 IU/kg 改为 200 IU/kg（表 4-10），每个处理 2 个重复，每个重复 10 只鸡（5 只公鸡 5 只母鸡）进行试验。

精心选择采食正常、身体健康、无怪癖的 35 日龄爱拔益加肉仔鸡 20（公母各半），按个体称重，将这 20 只鸡分成 2 组，使 2 组之间的体重差异不显著。

表 4-10 试验日粮中酶的添加量

Table 4-10 Xylanase dosage in the trail feed

处理	基础日粮	酶的添加量 IU/kg
1	玉米-豆粕	0
2	玉米-豆粕	1000
3	小麦-玉米-豆粕	0
4	小麦-玉米-豆粕	200
5	小麦-玉米-豆粕	500
6	小麦-玉米-豆粕	1000

(3) 饲养管理

肉仔鸡饲养于有窗鸡舍内，四层立体笼养（使用上面3层），每个重复一个饲养笼（1*1m），不同处理各重复的鸡均匀分布于鸡舍内，使不同处理鸡的饲养环境差别最小；试验期内舍温为14~25℃；相对湿度为60%~80%；光照时间为23小时/天，白天自然光照，晚上补光，晚上11:00~12:00 PM点熄灯1小时，光照强度为3瓦/米²；自由饮水，禁食沙砾。

(4) 测定程序

(A) 试验鸡的准备

正式试验前3天，开始换试验料，第4天（35日龄）开始为期5天的正式试验，正式试验期间饲喂实验料，准确记录采食量和粪便排泄量。

(B) 样品的采集

试验正式开始前绝食24小时，35日龄时开始为期5天的正式试验，正式试验期间饲喂试验日粮，以Cr₂O₃为外源指示剂，每天分早、中、晚三次采集粪样，按粪样的10%喷洒5%硫酸吸收其中的氨气，5天结束后，以重复为单位将粪便样混匀，冷藏备用。

(5) 原料及排泄物的营养成分分析

本研究测定的指标有：饲料的水分、粗蛋白、总能量，以及粪便中的干物质、总能量、粗蛋白。

饲料和粪便中粗蛋白质的测定：凯氏定氮法， $CP=N \times 6.25$ ；

饲料和粪便中总能量的测定：氧弹式能量测定仪进行测定；

饲料和粪便中水分的测定：80℃，72小时烘干。

(6) 数据计算及统计分析

饲料中蛋白质和能量的消化率按以下公式计算：

饲料中某养分的消化率 = $1 - a_2/a_1 \times b_1/b_2 \times 100\%$

式中：a₁、a₂分别为饲料和粪干物质中某养分的含量

b₁、b₂分别为饲料和粪干物中的指示剂含量

用EXCEL软件进行数据整理，用SAS8.2软件ANOVA程序进行统计分析。

4.2.2 试验结果

(1) 饲料中添加木聚糖酶对肉仔鸡蛋白质表观消化率的影响

饲料中添加木聚糖酶前后的肉仔鸡蛋白质表观消化率数据见表4-11。从表中数据可以看出，玉米日粮中添加木聚糖酶对肉仔鸡蛋白质的表观消化率没有显著影响（P>0.05）；而小麦-玉米-豆粕性日粮中添加木聚糖酶后可以显著提高蛋白质的表观消化率 P>0.05 (P<0.05)，但是木聚糖酶的添加量对蛋白质的表观消化率没有显著影响（P>0.05）。小麦日粮的粗蛋白的消化率低于玉米日粮。

表 4-11 木聚糖酶对肉仔鸡蛋白质和能量表观消化率 ($\bar{X} \pm SD$) 的影响

Table 4-11 Effect of xylanase on apparent digestibility of crude protein and energy in broilers dietary

处理	1	2	3	4	5	6	SEM	P 值
蛋白质代谢率, %	52.59±5.10 ^{abAB}	61.63±7.23 ^{aA}	30.27±6.32 ^{cC}	45.96±7.61 ^{bB}	45.01±7.72 ^{bAB}	49.02±2.91 ^{bB}	6.3791	0.0001
代谢能, MJ/kg	14.77±0.49 ^{aA}	14.74±0.66 ^{aA}	10.34±0.64 ^{cC}	12.68±1.51 ^{bB}	12.78±1.16 ^{bB}	13.32±0.85 ^{bAB}	0.9519	0.0001
日粮能量代谢率, %	75.55±2.55 ^{aA}	75.53±3.39 ^{aA}	53.84±3.37 ^{cB}	65.96±7.84 ^{bA}	66.43±5.75 ^{bA}	67.59±4.31 ^{bA}	4.8174	0.0001

注: 表中肩标字母相同者为差异不显著 ($P<0.05$)

(B) 饲料中添加木聚糖酶对肉仔鸡能量表观消化率的影响

饲料中添加木聚糖前后的肉仔鸡能量表观代谢率的数据见表 4-11。从表中数据可以看出, 玉米日粮中添加木聚糖酶对肉仔鸡的表观能量消化率没有显著影响 ($P>0.05$); 而小麦-玉米-豆粕性日粮中添加木聚糖酶后可以显著提高肉仔鸡的表观能量消化率 ($P<0.05$), 但是木聚糖酶的添加量对能量的表观消化率没有显著影响 ($P>0.05$)。小麦日粮的禽代谢能和日粮能量代谢率均低于玉米日粮。

4.2.3 小结

以上实验结果得出结论: 向肉仔鸡的玉米-豆粕型日粮中添加木聚糖酶 XYN-W 对粗蛋白质和能量的表观消化率没有显著影响; 向小麦-玉米-豆粕型日粮中添加木聚糖酶 XYN-W 可以显著提高肉仔鸡对蛋白质和能量的表观消化率, 但是木聚糖酶的添加量从 200~1000 IU/kg 对肉仔鸡日粮中粗蛋白和能量的表观消化率没有显著差异。

第五章 结论与讨论

5.1 结论

1. 来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的高比活木聚糖酶基因 *xyn-w* 在毕赤酵母中得到了高效表达, 酶蛋白表达量达到 1 mg/mL 发酵液以上, 酶活性达到每毫升发酵液 13000 IU 以上, 比目前文献报道的木聚糖酶最高表达量高近 4 倍 (Singh, 2000), 高于目前有报道的木聚糖酶的最高表达量。
 - 将来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的高比活木聚糖酶基因 *xyn-w* 按正确的阅读框架整合到毕赤酵母表达载体 pPIC9 上, 得到表达载体 pPIC9-*xyn-w*。通过酶切检测和测序证明了序列的正确性。
 - 通过电击转化得到毕赤酵母重组子。在摇床水平上进行了表达研究, 酶活性测定和 SDS-PAGE 分析表明木聚糖酶基因 *xyn-w* 得到了高效分泌表达。
 - 对摇床水平表达量最高的重组菌株 16[#]进行了 5 L 发酵罐中高细胞密度发酵实验。结果表明, 在 5 L 发酵罐中诱导 120 h 后, 木聚糖酶蛋白表达量达到 1 mg/mL 发酵液, 酶活性达到每毫升发酵液 13000 IU 以上, 比目前文献报道的木聚糖酶最高表达量高近 4 倍。
 - 连续 5 批次的发酵实验及 PCR 结果证明, 重组菌株生长的生物量、生长速度及木聚糖酶的表达量在各轮中基本保持稳定; 经过 5 轮的连续培养, *xyn-w* 基因依然稳定整合在 *P. pastoris* 基因组中。这些结果证明重组 *P. pastoris* 具有良好的遗传稳定性和表达稳定性。
 - 表达产物经纯化后进行酶学性质测定, 结果表明, 纯化的 XYN-W 蛋白的比活性为 13795.3 IU/mg、 k_{cat} 值为 2717.1 s⁻¹。以 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan 为底物时的 K_m 值为 2.5 mg/mL, V_{max} 为 5000 μmol/(mL · min)。
 - 纯化的 XYN-W 蛋白最适反应温度为 60°C, 在 50~70°C 之间, 酶活性保持在最高酶活性的 50% 以上; 最适 pH 为 5.6, 在 pH 5.0~6.6 的范围内, 酶活性维持在 80% 以上, 具有较好的 pH 稳定性和热稳定性。
 - 各种金属离子、表面活性剂、螯合剂对木聚糖酶 XYN-W 活性影响不大。
2. 对木聚糖酶 XYN-W 进行了分子改良, 改良的木聚糖酶基因 *xyn-m* 在毕赤酵母中得到了表达, 纯化后的酶学性质测定结果表明, XYN-M 的比活为 19856.6 IU·mg⁻¹, k_{cat} 值为 4433.8 s⁻¹。与纯化的 XYN-W 蛋白的比活性 13795.3 IU/mg、 k_{cat} 值 2717.1 s⁻¹ 相比, 分别提高了 43.9% 和 63.2%。高于目前比活性最高的木聚糖酶(包括天然木聚糖酶和经分子改良的木聚糖酶)。
 - 用 PCR 方法获得截短的木聚糖酶基因序列 *xyn-m* 并构建酵母表达载体, 通过电击转化得到阳性重组子。
 - 在摇床水平上的 SDS-PAGE 分析和表达产物的酶学测定研究表明, 木聚糖酶基因 *xyn-w* 得到高效分泌表达。
 - 表达产物 XYN-M 经纯化后进行酶学性质测定, 结果表明: XYN-M 以 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan 为底物时的 K_m 值为 4.0 mg/mL, V_{max} 为 10000 μmol/(mL · min), 比活为 19856.6 IU·mg⁻¹, k_{cat} 值为 4433.8 s⁻¹。纯化的木聚糖酶 XYN-W 进行酶学性质的测定, 结果显示: 蛋白最适反应温度为 60°C, 最适 pH 为 5.6, 与 XYN-W 相比, 最适 pH 和最适温度

无变化, pH稳定性变化不显著, 而热稳定性略有提高。

- 部分金属离子对XYN-M活性有一定影响, Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活有 10~20%的增强作用, 而 Cu^{2+} 会抑制 50%的酶活。
- XYN-M 与亲本 XYN-W 一样对胰蛋白酶均有良好的抗性。

3. XYN-W 的动物饲喂实验证明了其在饲料中应用的有效性。

- 向玉米-豆粕型日粮中添加 1000 IU/kg 的木聚糖酶后对增重指标均有改善作用, 同时有增加采食量和改善饲料转化率的趋势。
- 向小麦-豆粕型日粮中添加 500、1000、1500 IU/kg 的木聚糖酶相对于对照组可以显著提高 21 和 42 日龄肉仔鸡的平均体重以及 0~21 和 22~42 日龄的平均体增重; 3 个添加水平之间, 肉仔鸡的生产性能没有显著差异, 说明日粮中添加 500 IU/kg 的木聚糖酶已经足够。同时, 向小麦-豆粕型日粮中添加木聚糖酶可以显著改善饲料效率。
- 日粮中添加木聚糖酶有降低肉仔鸡死亡率的作用。玉米-豆粕日粮中添加木聚糖酶 1000 IU/kg, 死亡率降低 3 个百分点; 小麦-豆粕日粮添加 1500 IU/kg 的木聚糖酶, 死亡率降低了 5 个百分点。
- 日粮中添加剂木聚糖酶可显著降低肠道食糜黏度。
- 玉米-豆粕性日粮和小麦-豆粕性日粮中添加木聚糖酶后可以显著提高蛋白质的表观消化率。

5.2 讨论

国际通用的木聚糖酶活测定方法主要有两种, 一种是 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法), 一种是碱性铜-砷钼酸盐比色法 (Somogyi-Nelson 法)。从这两种方法的比较测定结果来看, DNS 法比 Somogyi-Nelson 法较容易操作, 但其测定结果相对偏高。本研究为了便于与国内外研究工作及实际生产水平相比较, 采用了 DNS 法, 在实际研究过程中, 发现此方法有较好的可重复性。

随着木聚糖酶在饲料工业、食品工业和造纸工业等方面的广泛应用, 进一步提高其发酵效价以降低生产和使用成本成为目前木聚糖酶研究的热点之一。利用高效表达外源蛋白的表达系统高效表达目的蛋白, 或者对木聚糖酶蛋白结构进行改良以提高其比活性, 都是进一步提高木聚糖酶应用潜力的有效途径。在木聚糖酶的高效表达方面, 近年来已取得较大进展, 在重组菌中的表达量已达到 mg/mL 水平以上, 如来源于橄榄绿链霉菌 A1 (*Streptomyces olivaceoviridis* A1) 的木聚糖酶基因 *xynB* 在毕赤酵母中进行了高效表达, 在 3 L 发酵罐中木聚糖酶 XYNB 的绝对表达量达到 1.4 mg/mL 发酵液, 酶活性达到 1200 U/mL 发酵液(何永志, 2003); *Thermomyces lanuginosus* 表达的木聚糖酶活性达到 3576 IU/mL, 是目前报道中最高的 (Singh, 2000)。毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是近些年来发展起来的一种高效的表达系统。它能够对外源基因进行加工折叠和翻译后修饰, 并且外源蛋白的表达量高, 目前已报道的毕赤酵母中分泌型蛋白表达量最高达 14.8 mg/mL (Cregg, 2000)。在本实验中, 我们成功实现了来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的高比活木聚糖酶 *xyn-w* 在毕赤酵母中的高效表达, 经 5 L 发酵罐高细胞密度发酵培养后, 酶活性为 13000 IU/mL 发酵液以上, 为摇床水平表达量的 8 倍以上, 高于目前报道的表达酶活性最高的菌株。从我们以前的经验来看, 发酵罐水平的表达量一般是摇床水平的 10-50 倍, 而该基因的

表达在摇床和发酵罐水平的差异未达到这一水平, 所以通过对发酵条件的优化, 进一步提高该木聚糖酶的表达量是有可能的。

从 XYN-W 的酶学性质来看, 其最适 pH 值为 5.6, 为酸性木聚糖酶, 且对胰蛋白酶有很好的抗性, 这一性质使其有望作为饲料添加剂应用于饲料工业中。同时, 各种金属离子对 XYN-W 酶活性基本没有影响, 表面活性剂 SDS 及螯合剂 EDTA 对 XYNA 也仅有轻微的抑制作用, 这些性质说明酶对作用环境中的各种离子、表面活性剂、螯合剂不敏感, 有利于此酶在工业上的实际应用。

从木聚糖酶 XYN-W 的 pH 稳定性来看, 它具有很好的耐碱性, 尽管它的最适 pH 是 5.6, 但在 pH 9.0 时仍保存有 80%以上的酶活性, 这使它有望可以适应造纸制浆时的碱性环境, 这些优良性质使其有望作为生物漂白剂应用于造纸制浆工业, 来从而减少化学漂白剂对环境的污染。

从木聚糖酶 XYN-W 的酶学性质来看, 有些性质还不能完全满足它在饲料工业上的大规模应用的要求。例如它的耐酸性较差, 在 pH 较低的环境中活性也较低; 它对胃蛋白酶的抗性较低, 不利于在动物胃肠道中发挥作用; 同时它的热稳定性不够高, 不能耐受饲料加工过程中的高温。结合饲料用酶的工业生产条件和 XYN-W 的酶学性质特征来看, : 1) 目前饲料行业大量应用的饲料用酶如植酸酶和木聚糖酶, 在性质上与理想饲料用酶相比也都还存在很大的缺陷。例如热稳定性, 耐酸和蛋白酶降解的能力都没有达到理想饲料用酶的性质要求, 但饲喂实验表明它们在动物体内都发挥了非常好的作用。这说明纯酶的酶学性质与真正的动物体内这种复杂动态环境下的作用并不完全匹配。本研究中的木聚糖酶 XYN-W 的动物饲喂实验也充分证明了其作为饲料添加剂在促进动物生长和提高消化率方面的作用; 2) 饲料制粒过程的温度高(85℃以上), 同时具有高湿度、高压, 所以目前饲料用酶主要是通过后添加和后喷涂的方式应用。通过这样的程序可有效规避高温过程对酶活性的损失; 3) 木聚糖酶主要在肠道中起作用, 目前的饲料用酶后加工技术—酶制粒和包被技术已能解决这一问题, 使木聚糖酶能顺利经过胃而进入肠道, 酶释放后发挥作用; 4) 对于本文中瘤胃真菌来源的木聚糖酶而言, 非常重要的一个特点是表达量高, 表达的酶活性单位(发酵效价)是直接与生产成本相关的, 只有通过提高表达的酶活性单位才能进一步降低酶的生产成本, 从而进一步推广它的使用。总体而言, 本项研究具有非常好的商业前景, 应用于工业生产可使生产成本大大降低, 从而促进木聚糖酶在我国的进一步推广应用。

木聚糖酶分子的模式结构通常包括催化区域以及与催化区相连的非催化区, 例如纤维素结合区、热稳定区、锚定区等。厌氧真菌中的酶分子结构中会有 1~3 个锚定区与催化区相连。通常认为锚定区的作用是把酶分子锚定在厌氧真菌的多纤维素酶体上, 而与酶的活性或比活无关。木聚糖酶蛋白的锚定区域对酶的比活性的影响机理目前还没有明确的阐述, Laura 等推测认为锚定区的存在会阻止前期水解过程中产物的释放, 从而阻碍了随后的转糖苷反应的进程(Laura, 2000)。如果这一假说成立, 那么锚定区的去除会使酶分子的活性中心更加暴露, 使得水解产物能更快的释放出去, 以提高酶的反应活性。2005 年 Ya-Hui Huang 等报道, 将来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶 Xyn11A 和 Xyn11B 的锚定区域去除后在大肠杆菌中进行了表达, 蛋白纯化后测得酶的比活性分别提高了 64% 和 330%, 达到 6517.1 IU/mg 和 16309 IU/mg, 酶的最适反应温度也分别从 55℃ 和 60℃ 提高到 60℃ 和 65℃(Huang, 2005)。本实验中的木聚糖酶 XYN-W 同样来源于瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis*, 对 XYN-W 蛋白结构分析结果表明其 C 端 57 个氨基酸序列为连接序列和锚定区域, 其氨基酸序列与同样来源于 *Neocallimastix frontalis* 的木聚糖酶 Xyn11A 和 Xyn11B(Huang, 2005)相比, 同源性分别为 85% 和 78.7%, 我们不但将木聚糖酶 XYN-W 分子中的锚

定区去除,还进一步去除了锚定区与催化区相连的连接区域,改造后的XYN-M在酶学性质方面与XYN-W没有明显差异,热稳定性方面略有提高,最明显的性质改变是比活性比原酶提高了43.9%, K_{cat} 值提高了63.2%。XYN-M比活性达到19856.6 IU/mg,高于目前有报道的比活性最高的木聚糖酶,这充分证明了我们这一思路的可行性,为今后木聚糖酶的分子改良提供了新的思路和实验参考,同时为木聚糖酶进一步的高效表达和降低成本提供了良好的材料。

酶分子的比活性是衡量酶的性质的重要指标,但高比活木聚糖酶报道较少,如来源于*Trichoderma harzianum*的20 D和29 D木聚糖酶仅分别为371 IU/mg和75 IU/mg(Tan *et al.*, 1985),来源于*Melanocarpus albomyces*的数种木聚糖酶最高的仅为143 IU/mg(Saraswat *et al.*, 2000),来源于*Streptomyces olivaceoviridis* A1所产的木聚糖酶 Xyna (43kD) 为 252 IU/mg, 来源于*Penicillium sp.40*的木聚糖酶比活性较高,也仅为 1250 IU/mg(Kimura *et al.*, 2000)。来源于alkaliphilic *Bacillus halodurans*的木聚糖酶 xyn-11A 比活性为 3073U/mg (Martinez MA, 2005)。已分离的5个属瘤胃真菌(Ho, 1995)所产生的纤维素酶和木聚糖酶是迄今所记载的活力最高的纤维水解酶类, *Neocallimastix pat riciarum* 和 *Orpinomyces joyonii* 的木聚糖酶活性分解别达 5980 IU/mg 和 3500 IU/mg (Gilbert *et al.*, 1992)。瘤胃真菌中所报道的木聚糖酶具有迄今为止最高的比活性,因此在实际应用中具有更广阔前景。本研究在高比活木聚糖酶上有针对性地进行分子改良并显著提高了原酶的比活性,无论在研究其结构与功能的关系还是在实际应用上均有重要意义。

参考文献

1. 郝波, 王辉. 生物饲料在 21 世纪的前景. 中国饲料, 2000, 2:19
2. 洪枫, 陈牧, 勇强等. 里氏木霉制备木聚糖酶的产酶历程. 南京林业大学学报, 1998, 22 (1): 31~36
3. 刘超钢, 勇强, 余世袁. 里氏木霉诱导合成木聚糖酶的调控. 南京林业大学学报, 1999, 23 (3): 29~32
4. 刘强, 冯学琴. 非淀粉多糖酶制剂的研究与应用进展. 动物营养学报, 1999, 11 (2): 6~11
5. 刘瑞田, 曲音波. 木聚糖酶分子的结构区域. 生物工程进展, 1998, 18 (6): 26~28
6. 刘相梅, 祁蒙, 曲音波. 木聚糖酶基因克隆、表达、与分泌及定点诱变研究进展. 生物工程进展, 2001, 21 (2): 28~31
7. 卢建军. 寡聚糖在饲料工业上的应用. 饲料与畜牧, 1999, 1: 21~22
8. 陆建, 曹钰, 陈坚. 运用定点突变提高重组木聚糖酶在毕赤酵母中的表达. 微生物学报, 2002, 42 (4): 425~430
9. 马孟根, 王红宇. 巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白的研究进展. 四川农业大学学报, 2001, 19 (3): 277~280
10. 彭毅, 步威, 康良仪. 甲醇酵母表达系统. 生物技术通报, 2000, 1, 38~41
11. 日下部功, 安井恒男, 小林達吉. *Streptomyces* 属の xylanase 系に関する研究(第 1 報) 菌体外放線菌 xylanase の諸性質について. 農化, 1969, 43 (3): 145~153
12. 孙迅, 马远忠, 孙宝聚等. 产胞外木聚糖酶链霉菌发酵条件的正交试验. 微生物学杂志, 1999, 19 (4): 22~24
13. 孙迅, 朱陶, 朱启忠等. 产胞外木聚糖酶放线菌的分离与筛选. 微生物学杂志 1998, 18 (4): 29~32
14. 汤海妹, 曾凡亚, 张义正. *Bacillus* sp. BT-7 木聚糖酶基因的克隆与鉴定. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (1): 60 ~63
15. 王凤翼, 钱方, 卢明春等. 功能性食品与功能性乳制品的开发. 中国乳品工业, 2000, 28 (1): 50~53
16. 杨瑞鹏, 赵学慧. 木聚糖酶高产菌株筛选与鉴定. 华中农业大学学报, 1990, 9 (3): 311~314
17. 张红莲, 姚斌等. 具有高比活性的新木聚糖酶 XYNB 的酶学性质研究及其编码基因的克隆和表达. 科学通报, 2003, 48 (4): 364~368
18. 张红莲, 姚斌等. 链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达. 生物工程学报, 2003, 19 (1): 41~45
19. 朱静, 严自正. 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用. 生物工程学报, 1996, 12 (4): 375~378
20. Akiba T and Horikoshi K. Xylanase of alkalophilic thermophilic *Bacillus*. Methods in Enzymol, 1988, 160:665~671

21. Alberto R *et al.* Analysis of *xysA*, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, *xys1*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8):2983~2988
22. Apel P, Panaccione D, Holden F *et al.* Cloning and targeted gene disruption of XYL1, a β -1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. *MPMI*, 1993, 6(4):467~473
23. Atsushi K, Daisuke S, Satoshi K *et al.* PCR cloning and expression of the F/10 family xylanase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(5):434~439
24. Basaran P, Hang Y *et al.* Cloning and heterologous expression of xylanase from *Pichia stipitis* in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 2001, 90(2):248~255
25. Bedford M. Enzyme feed additive and animal feed. United States Patent, 1997, 5612055
26. Bergquist P, Gibbs M, Morris D *et al.* Hyperthermophilic xylanase. *Method Enzymol*, 2001, 163:330~301
27. Bergquist P, Te'o V, Gibbs M *et al.* Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Extremophiles*, 2002, 6(3):177~184
28. Biely P, Markovik O and Mislovicova D. Sensitive detection of endo-1,4- β -glucanases and endo-1,4- β -xylanases in gels. *Anal Biochem*, 1985, 144:147~151
29. Biely P, Kluepfel D and Shareck F. Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1162:246~254
30. Biely P, Vrsanaka M, Tenkanen M and Kluepfel D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol*, 1997, 57:151~166
31. Black G, Nailewood G, Xue G *et al.* Xylanase B from *Nroccallimastix patriciarum* contains a non-catalytic 455-residue linker sequence comprised of 57 repeats of an octapeptide. *Biochem J*, 1994, 299: 381~387
32. Bolshakova E, Ponomariev A *et al.* Cloning and expression of genes coding for carbohydrate degrading enzymes of *Anaero cellulum thermophilum* in *E. coli*. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1994, 202(2):1076~1080
33. Bray MR and Clarke AJ. Action pattern of xylo-oligosaccharide hydrolysis by *Schizophyllum commune* xylanase. *A Eur J Biochem*, 1992, 204:191-196
34. Burchhardt G and Ingram L. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(4):1128~1133
35. Chang P, Tsai WS, Tsai CL, Tseng MJ. Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 319(3):1017-25.
36. Chaudhary P, Deobagkar D. Characterization of cloned endoxylanase from *Cellulomonas* sp. NICM 2353 expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 1997, 34(5):273~279

37. Chauthaiwale V. Molecular cloning and expression of the xylanase gene from *Chainia* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 78(2-3):265~270
38. Chavez R, Navarro C *et al*. Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Saccharomyces cerevisiae* transformed with genomic fungal DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 212(2):237~241
39. Cho S and Cho Y. Catabolite repression of the xylanase gene (xyna) expression in *Bacillus stearothermophilus* No.236 and *B.subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(12):2053~2058
40. Clarke J, Davidson K, Gilbert H *et al*. A modular xylanase from mesophilic *Cellulomonas fimi* contains the same cellulose-binding and thermostabilizing domains as xylanases from thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 139: 27~35
41. Coutinho PM and Henrissat B. Carbohydrate-active enzyme server(CAZY) at URL:<http://afmb.cnrs-mrs.fr-cazy/CAZY/>.
42. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J *et al*. Recombinant protein expression in *pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 2000, 16(1):23~52
43. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY *et al*. *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12):3376~3385
44. Crous J, Pretorius I, van Zyl W. Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4-beta-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1995, 28(5): 467~473
45. Den Haan R, Van Zyl W. Differential expression of the *Trichoderma reesei* beta-xylanase II (xyn2) gene in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(4):521~527
46. Derewenda U, Swenson L, Green R *et al*. Crystal structure, at 2.6-A resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J Biol Chem*, 1994, 269(33):20811~20814.
47. Durand R, Rasle C, Fevre M. Expression of a catalytic domain of a *Neocallimastix frontalis* endoxylanase gene (xyn3) in *Kluyveromyces lactis* and *Penicillium roqueforti*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(2):208~214
48. Ernst L, Nila B and Bergquist P. Xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*: overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(9):2677~2683
49. Esteban R, Villanueva I, Villa TG. β -D-Xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Can J Microbiol*, 1982, 28:733~739
50. Fernandez-Espinar M T. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42:555~562
51. Flint H, Martin J, Mcpherson C *et al*. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and β

- (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynd* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(10):2943~2951
52. Fontes CMGA, Hazlewood G P, Morag E *et al*. Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. *Biochem J*, 1995, 307:151~158
53. Fontes C, Ali S, Gilbert H *et al*. Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice. *J Biotechnol*, 1999, 72(1-2):95~101
54. Fukumura M, Sakka K. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* *xynB* gene encoding an extremely thermostable xylanase, and characterization of the translated product. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 48(1):40~46
55. Ganga M, Pinaga F. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* *xlnA* gene. *Int J Food Microbiol*, 1999, 47(3):171~178
56. Gat O, Lapidot A, Alchanati I *et al*. Cloning and DNA sequence of the coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(6): 1889~1896
57. Gebler J, Gilkes NR, Claeysens M, Wilson DB, Beguin P, Wakarchuk WW, Kilburn DG, Miller RC Jr, Warren RA, Withers SG. *Stereoselective hydrolysis* catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J Biol Chem*, 1992, 267(18):12559-61
58. Alchanati I, Gilbert H. Gene from the hyperthermophile *Thermotoga* sp. strain FjSS3-B.1 and characterization of the recombinant enzyme and Its activity on kraft pulp. *Applied And Environmental Microbiology*, 1995, 61(11):4110~4113
59. Ghangas G, Hu Y, Wilson D *et al*. Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, 1989, 171(6):2963~2969
60. Gikes NR, Henrissat B, Kilburn DG *et al*. Domains in microbial β -1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2):303~315
61. Gilbert H, Sullivan D. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *J Gen Microbiol*, 1988, 134(12):3239~3247
62. Gilbert HJ, Hazlewood GP, Laurie JI *et al*. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol Microbiol*, 1992, 6(15):2065~72.
63. Gregory ACE, O'Connell A P and Paul BG. Xylans. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1998, 15(4): 439~455
64. Grepinet O, Chebrou M, Beguin P. Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*xynZ*) of *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol*, 1988, 170(10):4582~4588
65. Hansen K, Wagner P. Animal feed additives. United States Patent, 1998, 5817500

66. HE YZ, YAO B. Overexpression of *Streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity and analysis of enzymic properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (3): 340~344
67. Henrissat B and Coutinho PM. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol*, 2001, 330: 183~201
68. Henrissat B, Claeysens M, Tomme P and Mornon JP. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*, 1989, 81(6):83~95
69. Herbers K, Flint H and Sonnewald U. Apoplastic expression of the xylanase and beta (1-3, 1-4)glucanase domains of the *xynD* gene from *Ruminococcus flavefaciens* leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding*, 1996, 2(1):81-87
70. Herbers K, Wilke I and Sonnewald U. A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/Technology*, 1995, 13:63-66
71. Honda H, Kudo T, Horikoshi K. Molecular cloning and expression of the xylanase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1985, 161(2):784~785
72. Hu Y, Smith D. Cloning of a xylanase gene from *Fibrobacter succinogenes* 135 and its expression in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 1991, 37(7):554~561
73. Huang Y, Huang C, Hsue R. Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243:455~460
74. Iwasaki A, Kishida H and Okanishi M. Molecular cloning of a xylanase gene from *Streptomyces* sp.36a and its expression in *Streptomyces*. *J Antibiot*, 1986, 39: 985~993
75. Jeong K, Park I. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. In *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 20(7):599~605
76. Jung K, Lee K, Kim H et al. Cloning and expression of a *Clostridium thermocellum* xylanase gene in *Escherichia coli*. *Biochem Mol Biol*, 1998, 44(2):283~292
77. Kesker S, Srinivasan M and Deshpande V. Chemical modification of a xylanase from thermotolerant *Streptomyces*:evidence for essential tryptophan and cystein residues at the active site. *Biochem, J*, 1989, 261(1):49~55
78. Khasin A, Alchanati I and Shoham Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(6): 1725~1730
79. Kimura T, Ito J, Koyana T et al. Purification, Characterization, and molecular cloning of acidopilic xylanase from *Penicillium* sp.40. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(6):1230~1237
80. Kimura T, Mizutani T, Tanaka T et al. Molecular breeding of transgenic rice expressing a xylanase domain of the *xynA* gene from *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechol*, 2003, 62(4):374~379
81. Kormelink F, Leeuwen M. Purification and characterization of three endo(1,4)- β -xylanase

- and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. *J Biotechnol*, 1993, 27:249~254
82. Kubata K, Horitus H, Khasin A *et al*. Xylanase I of *Aeromonas caviae* ME-I isolate from the intestine of a herbivorous insect (*Samia cynthia pryeri*). *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56:1463~1472
83. Kudo T, Ohkoshi A, Horikoshi K. Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic *Aeromonas* sp. no. 212 in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1985, 131 (10):2825~2830
84. Kulkarni N, Shendye A and Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23: 411~456
85. la Grange D, Pretorius I, van Zyl W. Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(3):1036~1044
86. Lapidot A, Mechaly A, Shoham Y. Overexpression and single-step purification of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J Biotechnol*, 1996, 51(3):259~264
87. Lee CC, Wong DW, Robertson GH. Cloning and characterization of the xyn11A gene from *Lentinula edodes*. *Protein J*, 2005, 24(1):21-6.
88. Lee J, Hu Y. Cloning of a xylanase gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* 27 and its expression in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 1993, 39(1):134~139
89. Leggio LL, Jenkins J, Harris GW, Pickersgill RW. X-ray crystallographic study of xylopentaose binding to *Pseudomonas fluorescens* xylanase A. *Protein*, 2000, 41(3):362-73.
90. Li KC, Azadi P, Collins R *et al*. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27:89~94
91. Li X, Ljungdahl L. Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and secretion of the xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(1):209~213
92. Li X, Zhang Z, Dean I *et al*. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1, *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(10): 3212~3218
93. Lin L, Thomson J. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 73 kDa xylanase enzyme from the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Mol Gen Genet*, 1991, 228:55~61
94. Liu S, Gherardini F, Markus M *et al*. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a large s-layer-associated endoxylanase from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL YS 485 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(6):1539~1547
95. Lo Leggio L, Kalogiannis S, Bhat MK, Pickersgill RW. High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta)alpha-barrel architecture. *Proteins*, 1999 36(3):295~306.
96. Luthi E, Jasmat N. Xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum*

- saccharolyticum* overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(9):2677~2683
97. Maheswari MU and Chandra TS. Production and potential applications of a xylanase from new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2000, 16(3):257-263
98. Martinez MA, Delgado OD, Baigori MD, Sineriz F. Sequence analysis, cloning and over-expression of an endoxylanase from the alkaliphilic *Bacillus halodurans*. *Biotechnol Lett.*, 2005, 27(8):545-50.
99. Mathrani IM and Ahring BK. Thermophilic and alkalophilic xylanases from several *Dictyoglomus* isolates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 38(5):23~28
100. Mondou F, Shareck F. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene*, 1986, 49(3):323~329
101. Montesino R, Garcia R, Quintero O *et al*. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1998, 14: 197~207.
102. Moreau A, Durand S, Morosoli R. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1992, 116(1):109~113
103. Moreau A, Shareck F, Kluepfel D *et al*. Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-specific mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(5):420~424
104. Morosoli R, Zalce E, Durand S. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Pichia stipitis* resulting in a xylan fermenting transformant. *Curr Genet*, 1993, 24(1-2):94~99
105. Morris D, Gibbs M, Ford M *et al*. Family 10 and 11 xylanase genes from *Caldicellulosiruptor* sp. strain Rt69B.1. *Extremophiles*, 1999, 3(2):103~111
106. Morris D, Gibbs M, Chin C *et al*. Cloning of the *xynb* gene from *Dictyoglomus thermophilum* rt46b.1 and action of the gene product on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5):1759~1765
107. Nakamura S, Wakabayashi K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41 M-1. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7):2311~2316
108. Nordberg K, Bartonek-Roxa E, Holst O. Cloning and sequence of a thermostable multidomain xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. *Biophys Acta*, 1997, 1353(2):118~124
109. Nuyens F, van Zyl W, Iserentant D *et al*. Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(3-4):431~434
110. Ogasacara H, Takahashi K. Contribution of hemicellulase in shochu koji to resolution of barley in shochu mash. *J Brew Soc Japan*, 1991, 86(4):304~307
111. Panbangred W, Fukusaki E. Expression of a xylanase gene of *Bacillus*. *Appl Microbiol*

- Biotechnol, 1985, 22:259~264
112. Paradis F, Ihu H, Krell P *et al.* The *sync* gene from *Fibrobacter succinogenes* s85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(23): 7666~7672
113. Pedersen P B and Broadmeadow A. Toxicological studies on *Thermomyces lanuginosus* xylanase expressed by *fusarium venenatum*, intended for use in food. *Food Additives and Contaminants*, 2000, 17(9):739~747
114. Perez-Gonzalez J, De Graaff L, Visser J, Ramon D. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(6):2179~2182
115. Prade R A. Xylanases: from Biology to BioTechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1995, 13(12): 101~131
116. Ramchuran SO, Mateus B, Holst O, Karlsson EN. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. *FEMS Yeast Res*. 2005, 5(9):839~50
117. Ratto M, Poutanen K, Viikari L. Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37(4):470~473
118. Ruller R, Rosa JC, Faca VM *et al.* Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5alpha under the control of the *Bacillus BsXA* promoter. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006, 43(1):9-15
119. Salles B, Cunha R. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J Biotechnol*, 2000, 81(2-3):199~204
120. Satoshi K, Atsushi K, Zui F *et al.* An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the *Cex* of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters*, 1999, 460:61~66
121. Saul DJ, Williams LC, Reeves RA *et al.* Sequence and expression of a xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, 40(2):11~18
122. Schekman R, novick P. The secretory process and yeast cell-surface assembly. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1982, 11: 361~393
123. Schmidt A, Gübitz GM, and Kratky C. Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. *Biochemistry*, 1999, 38:2403~2412
124. Shamala TR and Sreekantiah KR. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. *Enzyme Microb Technol*, 1986, 8(3):178~182
125. Shigeki Y, Isao K, Noriki M *et al.* Preparation of glucuronoxylo-oligosaccharides from an acid hydrolysate of corn-hulls. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(5):1319~1321
126. Shigeki Y, Isao K, Noriki *et al.* Structure of rice-straw arabinoglucuronoxylan and specificity

- of *Streptomyces Xylanase* toward the xylan. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(2):449~457
127. Shigeki Y, Tetsuo O, Noriki M *et al*. Structure of hardwood xylan and specificity of streptomyces β -xylanase toward the xylan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(11):2068~2070
128. Shigeki Y, Tomoaki S, Syojiro S *et al*. Substrate specificity of *streptomyces* β -xylanase toward glucoxylan. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 1994, 58(6):1041~1044
129. Singh S, Pillay B, Dilsook V and Prior BA, Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(6):975-982
130. Sipat A, Taylor K. Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(3):477~81
131. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE *et al*. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190(1), 55~62
132. Srivastava P and Mukherjee A. Cloning, characterization, and expression of xylanase gene from *Bacillus lyticus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Preparative Biochem Biotechnol*, 2001, 31:389~395
133. Srivastava R, Ali S. Cloning of xylanase gene of *Streptomyces flavogriseus* in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda-induced lysis for the release of cloned enzyme. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 62(2-3):201~205
134. Steiner W, Lafferty RM, Gomes I and Esterbauer H. Studies on a wild strain of production and potential applications of a xylanase from new strain of *Streptomyces cuspisporus*: cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30:169~173
135. Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(1):33~ 64
136. Sung Q, Wing L. Modification of xylanase to improve thermophilicity and thermostability. United States patent, 1999, 5866408
137. Tabernero C, Juan S, Pilar P *et al*. Cloning and dna sequencing of *xyaA*, a gene encoding an endo- β -1,4-xylanase from an alkalophilic *Bacillus* strain(N137). *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(6):2420~2424
138. Tony C, Charles G and Georges F. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29:3~23
139. Toshiyoshi A. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding beta-1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 4:1741~1743
140. Tsujibo H, Takada C. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular beta-D-xylosidase from *Streptomyces thermophilaceus* OPC-520. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(8):1824~1831

141. Vadi R, Strohfus B and West T. Characterization of a xylanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbios*, 1996, 85:179~186
142. Vrsanska M, Gorbacheva IV, Kratky Z, Biely P. Reaction pathways of substrate degradation by an acidic endo-1,4-beta-xylanase of *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 704(1):114-122.
143. Wakarchuk W, Sung W, Campbell R. Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Engineering*, 1994, 7:1379~1386.
144. Walsh D, Bergquist P. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8):3297~3300
145. Walsh D, Gibbs M, Bergquist P. Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, *thermotoga* strain FjSS3B.1, in *Kluyveromyces lactis*. *Extremophiles*, 1998, 2(1):9~14
146. Whitehead T, Hespell R. Heterologous expression of the *Bacteroides ruminicola* xylanase gene in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1990, 54(1-3):61~65
147. Whitehead T, Hespell R. The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. *J Bacteriol*, 1990, 172(5):2408~2412
148. Winterhalter C, Heinrich P, Candussio A *et al*. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase *XynA* of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol*, 1995, 15(3): 431~444
149. Withers-Martinez C, Carpenter E, Hackett F *et al*. PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+T-rich malaria genome. *Protein Engineering*, 1999, 12(12): 1113~1120
150. Wong K, Tan Y and Saddler JN. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev*, 1988, 52:305~317
151. Yamaura I, Matumoto M and Murai E. Purification and some properties of endo- β -1,3-xylanase from *Pseudomonas* sp.PT-5. *Agric Biol Chem*, 1990, 54:921~926
152. Yang HM, Yao B and Fan YL. Recent advances in structures and relative enzyme properties of xylanase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(1): 6~11
153. Yang MH, Li Y, Guan GH, Jiang ZQ. High-level expression of an extreme-thermostable xylanase B from *Thermotoga maritima* MSB8 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(2):236~40.
154. Yang Pl, Yao B, Wang YR. *Streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity expressed in tobacco. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(2): 176~181
155. Yang R, MacKenzie C. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(3):568~572
156. Zui F, Atsushi K, Satoshi K *et al*. Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β

- xylanase containing xylan-binding domain. *J Mol Biol*, 2000, 300:575~585
157. Zui F, Hiroshi M, Atsushi K *et al*. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xylanase. *J Biochem*, 1997, 121:826~828
158. Zverlov V, Piotukh K, Dakhova O *et al*. The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermostable. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45(1~2):245~247

致 谢

本论文是在导师范云六院士的悉心指导下完成的。从论文选题、设计、技术操作到论文写作、修改、定稿无不凝聚着她的心血和智慧。范先生在学习工作上对我严格要求，悉心教诲，不但传授给我大量的科学知识，还教会了我如何运用科学的思维方式来考虑、解决问题。范先生对科学的热爱熏陶着我们，她孜孜不倦的工作热情，严谨的治学态度，敏锐的洞察力，都是我们学习的榜样。在此向我的导师范云六院士表示我衷心的感谢和崇高的敬意！

感谢本实验室的史秀云老师、罗会颖、孟昆、柏映国、杨培龙、袁铁铮等同事在本论文的完成整个过程中给予我的大力帮助，特别是孟昆同志在论文的最后修改和定稿过程中付出了艰辛的劳动。非常感谢大家。

在实验过程中本实验室的研究生黄火清、杨浩萌、石鹏君、李宁、密士军、李雅楠、付大伟等给予了我无私的帮助，在此一并向他们表示感谢！

最后我要深深地感谢我的家人多年来对我的支持和鼓励，特别感谢我的父母、爱人多年来对我的理解和支持，没有他们的帮助，我难以坚持到今天。

感谢所有帮助、关心和支持我的人们！

作者简历

姓 名: 王亚茹

性 别: 女

出生日期: 1973 年 8 月 6 日

籍 贯: 山西隰县

教育经历:

2001. 9 至今: 中国农业科学院研究生院, 微生物学专业, 在职申请硕士学位

1993. 9-1997. 7: 山西大学生命科学系, 微生物专业, 获理学学士学位

工作经历:

1997. 7 至今: 中国农业科学院饲料研究所, 助理研究员

硕士期间发表文章:

1. 王亚茹, 姚斌, 曾虹, 史秀云, 操时树, 袁铁铮, 范云六, 枯草芽孢杆菌中性植酸酶的纯化和酶学性质, *微生物学报*, 2001 年 02 期
2. 王亚茹, 姚斌, 罗会颖, 袁铁铮, 都占魁, 史秀云, 伍宁丰, 范云六, 来源于 *Selenomonas ruminantium* 的高比活植酸酶基因在毕赤酵母中的高效表达, *中国农业科学*, 2004 年 05 期
3. 杨培龙, 姚斌, 王亚茹, 罗会颖, 袁铁铮, 柏映国, 范云六, 高比活性木聚糖酶 XYNB 在烟草中的表达, *作物学报*, 2005 年 02 期
4. 张红莲, 姚斌, 王亚茹, 袁铁铮, 张王照, 伍宁丰, 范云六, 链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因xynA在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达, *生物工程学报*, 2003 年 01 期
5. 张红莲, 姚斌, 王亚茹, 张王照, 袁铁铮, 具有高比活性的新木聚糖酶XYNB的酶学性质研究及其编码基因的克隆和表达, *科学通报*, 2003 年 04 期
6. 何永志, 姚斌, 王亚茹, 袁铁铮, 罗会颖, 史秀云, 伍宁丰, 范云六, 来源于橄榄绿链霉菌A1 的高比活木聚糖酶XYNB的高效表达及性质的比较分析, *微生物学报*, 2004 年 03 期