

链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 木聚糖酶基因 *xynBS9* 的克隆表达及性质分析

姚国玉^{1,2}, 李 宁², 石鹏君², 陈 强¹, 姚 斌²

(1. 兰州大学生命科学学院生物化学与分子生物学研究所, 兰州 730000;
2. 中国农业科学院饲料研究所农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081)

摘 要:通过设计简并引物和构建基因组文库的方法从链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 中克隆得到 β -1,4-木聚糖酶基因 *xynBS9*。该基因全长 1 023 bp, 编码 340 个氨基酸。将不带原基因信号肽编码序列的 *xynBS9* 以正确阅读框架克隆到表达载体 pET-22b(+) 上, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达。重组蛋白经硫酸铵分级沉淀和疏水柱纯化后达到电泳纯。酶学性质分析表明, 重组木聚糖酶最适温度为 60℃, 最适 pH 为 6.5, 在碱性条件下具有良好的稳定性。

关键词:链霉菌; 木聚糖酶; *xynBS9* 基因; 原核表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2009)04-0064-07

Cloning, Expression and Characterization of a Xylanase Gene, *xynBS9*, from *Streptomyces* sp. S9

YAO Guo-yu¹, LI Ning², SHI Peng-jun², CHEN Qiang¹, YAO Bin²

(1. Institute of Biochemistry and Molecule Biology, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000;
2. Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Feed Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The gene *xynBS9* encoding β -1, 4-xylanase was cloned from *Streptomyces* sp. S9 by designing degenerate primers and screening from a genomic library of *Streptomyces* sp. S9. The *xynBS9* gene was 1 023 bp in length and encoded by a protein with 340 amino acids. The *xynBS9* gene without signal peptide was inserted into the expression vector of pET-22b(+) and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) to express. The recombinant protein was purified by ammonium sulfate precipitant and hydrophobic interaction chromatography. Characteristic analysis indicated that the optimum temperature and pH value for the recombined xylanase were 60℃ and 6.5, respectively, and *XynBS9* showed an extreme stability under alkaline condition.

Key words: *Streptomyces*; xylanase; *xynBS9* gene; prokaryotic expression

木聚糖是植物半纤维素的重要组成部分, 是自然界中仅次于纤维素含量第二丰富的多糖, 约占地球三分之一的可再生有机碳源^[1]。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, 是一种重要的可再生资源。

木聚糖酶可将木聚糖降解成低聚糖和木糖, 它广泛存在于多种微生物中, 如细菌、真菌等。近年来已从里氏木霉、黑曲霉、橄榄绿链霉菌中克隆

了木聚糖酶基因, 并在大肠杆菌或毕赤酵母中得到表达^[2~5], 已对木聚糖酶的酶学性质、分子结构及催化机制进行了详尽研究^[6,7]。随着现代生物技术的不断发展和对木聚糖酶的深入了解, 已有多种木聚糖酶产品得到应用^[8], 其在饲料、造纸、能源工业以及食品医药领域都有广阔的应用前景。

由于极端温度和 pH 等环境因素对酶的活性

收稿日期: 2009-04-14; 修回日期: 2009-06-15

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA100601); 国家科技攻关项目(2006BAD12B05-03)资助。

作者简介: 姚国玉, 硕士研究生, 从事微生物工程研究。E-mail: gyyao666@163.com。通讯作者: 姚斌, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事微生物工程研究。Tel: 010-82106053; E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn。陈强, 教授, 博士, 博士生导师, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: chenq@lzu.edu.cn

和稳定性的影响限定了木聚糖酶的应用,因此从嗜极微生物中寻找适合工业应用的木聚糖酶成为国内外研究热点。链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 分离自新疆吐鲁番盆地火焰山的土样。吐鲁番盆地昼夜温差大,夏季白天地表最高温度达 82℃,夜间只有 10~20℃。我们从链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 中克隆得到 2 个木聚糖酶基因 *xynAS9* 和 *xynBS9*,并在前期工作中对 *XynAS9* 进行了酶学性质的研究^[9],本文报道了木聚糖酶基因 *xynBS9* 的克隆、表达及酶学性质的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 BL21(DE3)、DH5 α ;质粒载体 pUC19 购自 TransGene 公司;大肠杆菌表达载体 pET-22b(+) 购自 Novagen 公司;T4 DNA 连接酶、pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;大肠杆菌菌株 JM109、LA *Taq* 酶和 GC Buffer、限制性内切酶、DNA 纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;低分子量标准蛋白质为上海生化所产品;燕麦木聚糖(oat spelt xylan)、桦木木聚糖(birchwood xylan)、IPTG 购自 Sigma 公司;木糖(xylose)、木二糖(xylobiose)、木三糖(xylotriose) 购自 Wako Pure Chemical (Japan) 公司。常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.2 产木聚糖酶菌株的分离、鉴定

链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 分离自新疆吐鲁番盆地火焰山采集的土壤样品。采集的土壤样品首先用液体培养基(1% 桦木木聚糖,0.5% 蛋白胨和 0.5% NaCl) 42℃ 摇床振荡培养 36 h,然后将培养液稀释并均匀涂布于固体琼脂培养基(0.5% 桦木木聚糖,0.5% 蛋白胨和 0.1% KH₂PO₄) 上分离单菌落,最后将得到的纯培养单菌落转接至上述固体琼脂培养基上培养,并用 0.1% 刚果红平板染色判断其产木聚糖酶特性^[10]。

PCR 扩增 S9 菌株 16S rDNA 片段,胶回收 PCR 扩增产物,连接到 pGEM-T Easy 载体后转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑法筛选重组阳性克隆,由上海生工生物工程有限公司进行序列测定。依据 16S rDNA 基因序列在 GenBank 数据库中的比对分析结果鉴定 S9 菌株。

1.3 保守序列的克隆

根据已有链霉菌木聚糖酶的氨基酸序列(<http://www.cazy.org/fam/GH11.html>),寻找到两段保守区域 YSFWTD 和 EGYQSS,然后根据密码子的简并性和密码子在已知木聚糖酶基因中出现的频率,设计简并引物 S11F:5'-TACTCSTTCTGGACSGAC-3';S11R:5'-CTGCTCTGRTANCCYTC-3'。简并 PCR 反应循环条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 7 min。

1.4 木聚糖酶基因 *xynBS9* 的克隆

链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 菌株基因组 DNA 的提取采用溶菌酶法^[5]。基因组文库的构建采用半补齐法^[11]。

根据简并引物扩增片段的序列设计筛库引物 S9F:5'-GGTGGCAACTACAGCACCTCG-3';S9R:5'-CTTCTGCTGCCGCACGCT-3',采用菌液 PCR 法进行基因组文库的筛选。PCR 反应循环条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 65 s,30 个循环;72℃ 10 min。筛选得到的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行 DNA 序列测定。

1.5 表达载体构建及木聚糖酶表达检测

根据基因的序列设计表达引物:S9BF:5'-ATGAATTCGCAGACCGTCACCTCGAACCAGACG-3'(下划线为 *EcoR* I 位点);S9BR:5'-TATCTC-GAGCTAGCCGCTGCTGCAGGACACC-3'(下划线为 *Xho* I 位点),以链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 菌株基因组 DNA 为模板,进行全基因的 PCR 扩增。PCR 反应循环条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 50 s,30 个循环;72℃ 7 min。

胶回收 PCR 产物并用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,然后与 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的大肠杆菌载体 pET-22b(+) 连接,构建表达载体 pET-22b-*xynBS9*,转化大肠杆菌 BL21(DE3),用检测木聚糖酶活性和 SDS-PAGE 电泳的方法验证木聚糖酶基因 *xynBS9* 在大肠杆菌中的表达。

1.6 木聚糖酶的纯化

木聚糖酶蛋白的纯化采用硫酸铵沉淀结合疏水色谱柱的纯化方法^[9]。

1.7 木聚糖酶活力的测定

木聚糖酶活性检测运用 DNS 法^[12,13]。酶促反应在最适 pH 和最适作用温度条件下进行。1 个木聚糖酶活性单位(U)定义为在该条件下每

min 分解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需的酶量。

1.8 木聚糖酶生化性质的测定

1.8.1 酶反应最适 pH 的测定 用不同 pH 的缓冲液 (pH 2.2 ~ 12.0) 配制的燕麦木聚糖溶液作为底物, 将酶液稀释至适当浓度, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下测定酶活性。

1.8.2 pH 稳定性的测定 用不同 pH 值的缓冲液 (pH 2.2 ~ 12.0) 将纯化的酶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h, 然后在最适 pH 和最适温度下测定酶活性。

1.8.3 酶反应最适温度的测定 用 McIlvaine 缓冲液 (pH 6.5) 配制燕麦木聚糖溶液作为底物, 在最适 pH 下, 在不同温度 (10 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$) 下测定反应体系中的酶活性。

1.8.4 温度稳定性的测定 将酶液在不同的温度下 (60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$) 分别处理 2 min、5 min、10 min、20 min、30 min 和 60 min 后, 用 McIlvaine 缓冲液 (pH 6.5) 将酶液稀释至适当浓度, 在最适温度下测定酶活性。

1.8.5 木聚糖酶 K_m 和 V_{max} 的测定 用 McIlvaine 缓冲液 (pH 6.5) 配制不同浓度 (0.5 ~ 10 mg/mL) 燕麦木聚糖和桦木木聚糖溶液作为底物, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 测定酶活性。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法处理数据, 并计算木聚糖酶 K_m , V_{max} 。

1.9 测定金属离子和化学试剂对酶活性的影响

在木聚糖酶活力测定反应体系中分别加入终浓度 1 mmol/L 或 10 mmol/L 的 NaCl、KCl、CaCl₂、LiCl、CrCl₃、NiSO₄、CuSO₄、MgSO₄、FeCl₃、ZnSO₄、Pb(CH₃COO)₂、AgNO₃、HgCl₂、EDTA、SDS, 用不加金属离子和化学试剂的作为 100% 对照, 金属离子和化学试剂对酶活性的影响用和对照相比的百分数表示。

1.10 产物分析

反应体系中含有 8.6 U 纯化的木聚糖酶、100 μg 燕麦木聚糖或桦木木聚糖和 140 μL McIlvaine 缓冲液 (pH 6.5), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h。反应完毕后用 3 kDa Nanosep 超滤管 (Pall, USA) 超滤除去酶蛋白, 产物运用高效离子交换色谱 (HPAEC) Dionex 2 500 system 进行分析^[14]。木糖 (xylose)、木二糖 (xylobiose)、木三糖 (xylotriose) 用作分析的标准样品。

2 结果和分析

2.1 菌种的分离鉴定

S9 菌株是需氧型革兰氏阳性菌, 最适生长温度为 40 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$, 可以在含 7% NaCl (W/V) 的培养基中生长。在以木聚糖为碳源的琼脂平板培养基上生长时可产生明显的透明圈, 证明它能产生降解木聚糖的木聚糖酶。

S9 菌株 16S rDNA 基因序列 (1 450 bp) 在 GenBank 数据库中的注册号为 EU153377, 在 GenBank 数据库中比对结果显示, 它与报道的 *Streptomyces radiopugnans* R97 菌株 (GenBank 注册号为: DQ912930, DSM41901) 有 99.3% 的一致性; 与 *Streptomyces macrosporus* (Z68099, DSM 41449) 有 97.1% 的一致性, 说明 S9 菌株属于链霉菌属。 *Streptomyces* sp. S9 菌株保藏于中国农业科学院菌种保藏中心, 保藏号为 ACCC 41169。

2.2 木聚糖酶基因克隆与序列分析

简并 PCR 扩增出一条与预计大小相符的 500 bp 左右的 DNA 片段, 该片段序列在 NCBI 数据库中进行 BLASTX 比对结果表明, 它与 *Thermopolyspora flexuosa* 来源的糖基水解酶 11 家族的木聚糖酶 *xyn11A* 基因片段最高一致性为 87%, 说明以 S11F 和 S11R 为引物 PCR 扩增得到的 DNA 片段是链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 编码的木聚糖酶同源基因片段。

用筛库引物 S9F 和 S9R 对链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 基因组文库进行筛选, 共筛选了文库中 2 000 个转化子, 其中 P627 号克隆包含木聚糖酶基因 *xynBS9* 的完整编码框。该编码框全长 1 023 bp, 整体 (G + C) 含量为 67.4%, 从起始密码子 ATG 起, 共编码 340 个氨基酸和一个终止密码子 (TAG), GenBank 注册号为: EU660499。利用 SignalP 3.0 服务器分析, XynBS9 含有 52 个氨基酸残基组成的信号肽序列。成熟蛋白质预计分子量为 30.7 kDa, 包含一个糖基水解酶 11 家族的催化结构域、纤维素结合域 (CBD) 和两者之间的连接区 Linker (GGTSGGGGGGGGGGG)。BLASTP 比对发现 XynBS9 的氨基酸序列与来源于 *Thermobifida fusca* NTU22 的 XYL (GenBank 注册号为: AY795559) 和来源于 *Thermobifida fusca* YX 的

(GenBank 注册号为: AAA21480) TfxA 的氨基酸序列有较高的一致性(72%)。

2.3 木聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达与纯化

将克隆得到的木聚糖酶基因 *xynBS9* (除去信号肽编码序列) 构建表达载体 pET-22b-*xynBS9*, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。阳性重组子用终浓度 0.8 mmol/L 的 IPTG 37℃ 诱导 4 h, 在诱导后上清和菌体破碎液中均测出木聚糖酶酶活, 上清酶活为 9.1 U/mL, 转化 pET-22b (+) 空载体的重组子经 IPTG 诱导后没有测到木聚糖酶酶活。

木聚糖酶 XynBS9 经纯化已经达到电泳纯 (见图 1, 箭头所指), 纯化后其比活为 1 661.50 U/mg, 是纯化前的 3.2 倍, 回收率为 15.99% (见表 1)。

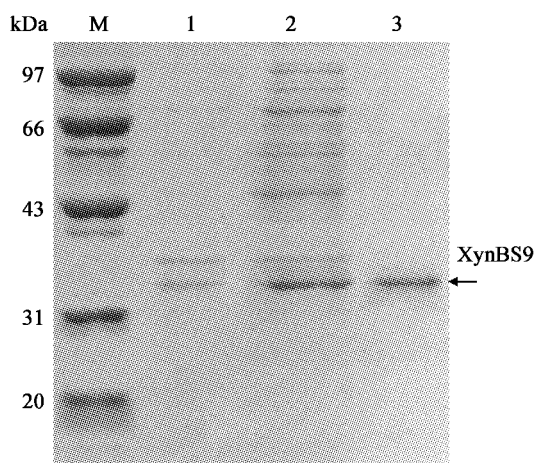


图 1 木聚糖酶 XynBS9 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of xylanase XynBS9.

M: 标准低分子量蛋白; 1: 含有 pET-22b-*xynBS9* 的转化子诱导表达的上清; 2: 20% ~ 50% 硫酸铵分级沉淀; 3: 纯化的 XynBS9
M: Low weight molecular weight markers; 1: Supernatant of the induced transformant harboring pET-22b-*xynBS9*; 2: 20% ~ 50% ammonium sulfate precipitation; 3: Purified XynBS9

2.4 木聚糖酶酶学性质的分析

纯化的木聚糖酶 XynBS9 最适 pH 为 6.5, 在 pH 5.5 ~ 7.0 范围内可保持 70% 以上的酶活 (见图 2-A)。pH 稳定性方面, 用 pH 4.0 ~ 12.0 的缓冲液 37℃ 处理纯化酶液 1 h, 酶活力仍剩余 85% 以上 (如图 2-C)。XynBS9 在 60℃ 时酶活力最高 (如图 2-B), 温度高于 70℃ 时酶活力迅速下降。XynBS9 的稳定性在 60℃ 时较好, 热处理 30 min 后剩余 55% 的酶活力, 70℃ 热处理 2 min 剩余 30% 的酶活力 (如图 2-D)。

各种金属离子和试剂对木聚糖酶 XynBS9 酶活力影响如表 2。大多数离子对 XynBS9 活力影响不大; 但 1 mmol/L 的 SDS、AgNO₃、HgCl₂ 则可几乎完全抑制 XynBS9 的活性; 1 mmol/L CuSO₄ 对 XynBS9 有部分抑制作用, 使酶活力下降 16.2%。当离子浓度升至 10 mmol/L 时, CuSO₄、PbAc 使酶活力分别下降 40.8%、10.5%; CrCl₃、NiSO₄、FeCl₃、ZnSO₄、EDTA 对酶活力则有少量激活作用。

2.5 木聚糖酶动力学分析

以燕麦木聚糖为底物, 纯化的 XynBS9 比活、 K_m 、 V_{max} 值分别为 1 661.5 U/mg、6.61 mg/mL、3 741.39 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$; 以桦木木聚糖为底物, 其 K_m 、 V_{max} 值分别为 5.05 mg/mL、2 319.92 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 。

2.6 木聚糖酶降解产物分析

用高效离子交换色谱 (HPAEC) 对木聚糖酶 XynBS9 降解桦木木聚糖和燕麦木聚糖的产物进行分析 (见图 3), 主要降解的产物是木糖、木二糖和木三糖。XynBS9 降解燕麦木聚糖产物组成为 6.48% 木糖、53.50% 木二糖和 40.02% 木三糖 (W/W); 降解桦木木聚糖产物组成为 11.73% 木糖、60.50% 木二糖和 27.76% 木三糖 (W/W)。

表 1 木聚糖酶 XynBS9 纯化分析

Table 1 Purification of XynBS9.

纯化步骤 Purification step	体积 (mL) Total volume (mL)	总活力 (U) Total activity (U)	总蛋白质 (mg) Total protein (mg)	比活 (U/mg) Specific activity (U/mg)	回收率 (%) Recovery rate (%)
诱导上清 Induced supernatant	300.00	2 738.83	5.35	512.25	100.00
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	7.50	1 620.03	1.87	864.07	59.15
疏水色谱柱 HPC precipitation	3.00	437.91	0.26	1 661.50	15.99

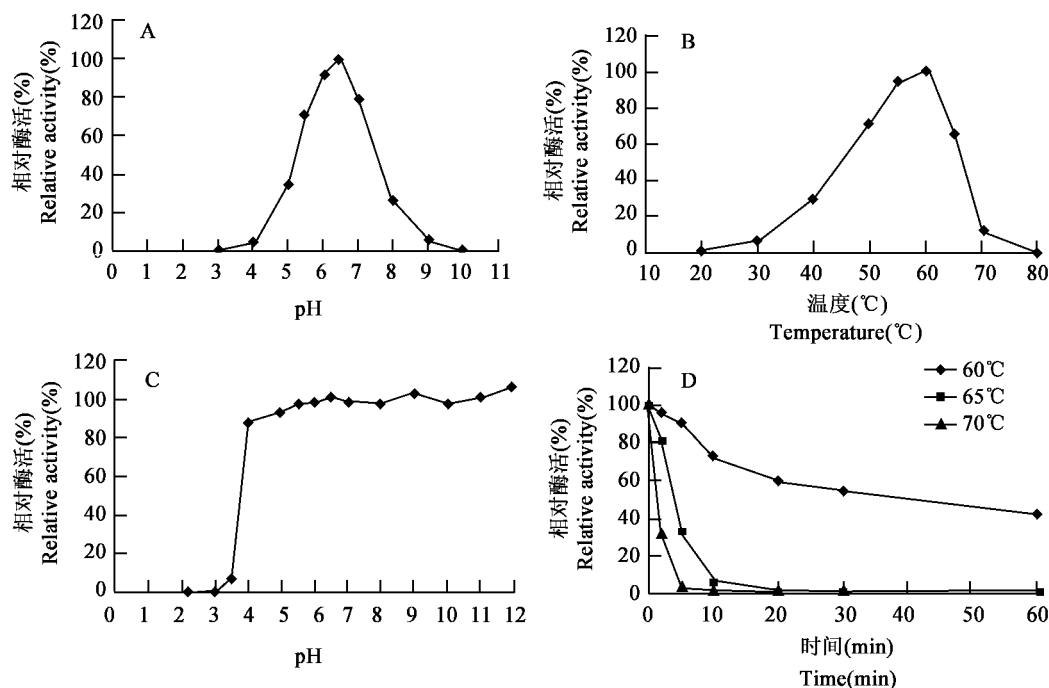


图2 pH和温度对XynBS9酶活力和稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH and temperature on activity and stability of recombinant XynBS9.

A. pH对XynBS9活力的影响; B. 温度对XynBS9活力的影响; C. pH对XynBS9稳定性的影响; D. 温度对XynBS9稳定性的影响
A. Effect of pH on activity of recombinant XynBS9; B. Effect of temperature on activity of recombinant XynBS9; C. Effect of pH on stability of recombinant XynBS9; D. Effect of temperature on stability of recombinant XynBS9.

表2 金属离子对XynBS9酶活力影响

Table 2 Effects of metal ions and chemicals on XynBS9 activity.

离子 Ions	相对酶活(%) Relative activity (%)	
	1 mmol/L	10 mmol/L
无 None	100.0	100.0
NaCl	99.4	104.2
KCl	97.3	102.1
CaCl ₂	96.6	108.3
LiCl	104.2	102.9
CrCl ₃	106.4	125.0
NiSO ₄	102.9	122.6
CuSO ₄	83.8	59.2
MgSO ₄	98.5	109.0
FeCl ₃	108.2	114.6
ZnSO ₄	107.0	115.6
PbAc	104.8	89.5
EDTA	107.5	115.4
SDS	0.9	ND
AgNO ₄	0.0	ND
HgCl ₂	1.6	ND

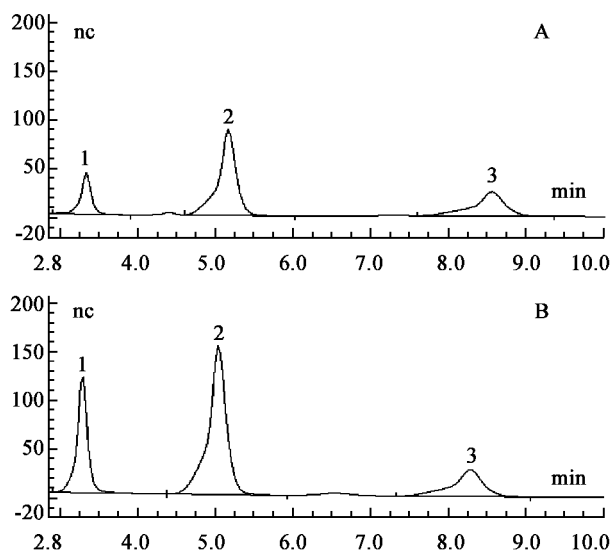


图3 XynBS9降解产物的HPAEC分析

Fig. 3 HPAEC analyses of the hydrolysis products by XynBS9 digestion.

A. XynBS9降解燕麦木聚糖的产物; B. XynBS9降解桦木木聚糖的产物。1:木糖;2:木二糖;3:木三糖

A. The hydrolysis products of oat spelt xylan; B. The hydrolysis products of birchwood xylan. 1: Xylose; 2: Xylobiose; 3: Xylotriose

3 讨论

本文从位于吐鲁番盆地的火焰山土壤中分离得到能产生木聚糖酶的链霉菌 *Streptomyces* sp. S9, 其 16S rDNA 序列与链霉菌 *S. radiopugnans* R97 和链霉菌 *S. macrosporus* 有很高的一致性, 但它们没有产木聚糖酶的报道。

链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 来源的 XynBS9 属于糖基水解酶第 11 家族, 它与第 11 家族来源于 *Thermobifida fusca* NTU22 的 XYL11 有很高的一致性^[15], 但它们的性质却有所差异。XynBS9 最适 pH 和温度分别为 pH 6.5 和 60℃; XYL11 最适 pH 为 7.0, 最适温度为 70℃。XynBS9 在 pH 4.0 ~ 12.0 范围内有很好的稳定性, 用不同 pH 的缓冲液 (pH 4.0 ~ 12.0) 对纯化的 XynBS9 在 37℃ 下处理 1 h, 酶活性还剩余 80% 以上。

木聚糖酶基因 *xynBS9* 全长 1 023 bp, 共编码 340 个氨基酸, 前 52 个氨基酸为信号肽序列。XynBS9 的催化区共包含 187 个氨基酸 (Q53 ~ V239), 其序列与 *T. fusca* NTU22 来源的 XYL11 的催化区序列有 85% 的一致性。经序列比对和结构分析表明, XynBS9 催化残基为氨基酸 E138 和 E227^[16]。XynBS9 的碳水化合物结合域 (C255 ~ G340) 属于 CBM 第 2 超家族, 其序列与 *T. fusca* NTU22 来源的 XYL11 和 *Streptomyces viridosporus* T7A 来源的木聚糖酶 (GenBank 注册号为: AAF09501) 的 CBM 序列均有 77% 的一致性^[15,17]。

XynBS9 对大多数金属离子不敏感, 但 SDS、AgNO₄、HgCl₂ 在低浓度时已完全抑制了 XynBS9 的活性, 这一特点与其他报道的木聚糖酶相类似^[18~20]。Ag⁺、Hg²⁺ 对木聚糖酶活性的影响可能是它们能氧化吡啉环, 与酶蛋白中的色氨酸残基发生互作而破坏了酶的催化中心^[21]。利用 SWISS-MODEL (model. expasy. org//SWISS-MODEL. html) 对 XynBS9 进行蛋白结构预测发现, XynBS9 催化区有 7 个色氨酸残基, 其中有 3 个色氨酸残基位于催化中心附近。10 mmol/L 的 CrCl₃ 可提高 XynBS9 25% 的活性, 与报道的 XynAS9 被 Cr³⁺ 提高 27% 的活性相类似^[9], Cr³⁺ 提

高木聚糖酶活性的相关报道并不多。

本文所克隆的木聚糖酶基因 *xynBS9* 在大肠杆菌中得到了表达, 对重组酶 XynBS9 性质的研究显示, XynBS9 有良好的 pH 稳定性。大多数金属离子和试剂没有显著影响 XynBS9 的活性, 而 Cr³⁺ 对 XynBS9 有激活作用。XynBS9 在低聚木糖的制备, 饲料、食品上有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Prade R. Xylanases: from biology to biotechnology [J]. Biotechnol. Genet. Engineer. Rev., 1995, 13(12):101-131.
- [2] 汪浩, 汪天虹. 瑞氏木霉木聚糖酶 I 基因的克隆、序列分析及在酵母中的表达 [J]. 山东轻工业大学学报, 2002, 16(3): 13-16.
- [3] 王向明, 欧阳嘉, 严明, 等. 里氏木霉木聚糖酶基因 XYN2 的克隆与表达 [J]. 南京工业大学学报, 2007, 29(5): 82-87.
- [4] 邓萍, 曹云鹤, 陆文清, 等. 黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 在大肠杆菌中的表达及重组木聚糖酶的特性 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5):774-778.
- [5] 张红莲, 姚斌, 范云六, 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 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(1):41-45.
- [6] 孙迅, 朱陶, 朱启忠, 等. 产胞外木聚糖酶放线菌的分离与筛选 [J]. 微生物学杂志, 1998, 18(4):29-32.
- [7] 杨瑞鹏, 赵学慧. 木聚糖酶高产菌株筛选与鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1990, 9(3):311-314.
- [8] 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 [J]. 生物工程进展, 2001, 21(2):28-31.
- [9] Li N, Meng K, Yao B. et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9 [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 80:231-240.
- [10] Wood P J, Erfle J D, Teather R M. Use of complex formation between Congo red and polysaccharide in detection and assay of polysaccharide hydrolases [J]. Methods Enzymol., 1988, 160: 59-74.
- [11] 洪义国, 孙溢, 郑家声, 等. 黄海黄杆菌 YS-9412-130 低温碱性蛋白酶的基因克隆和序列测定 [J]. 海洋水产研究, 2000, 21(4):46-53.
- [12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal. Chem., 1959, 31(3):426-428.
- [13] Li N, Yang P L, Yao B, et al. Cloning, expression, and characterization of protease-resistant xylanase from *Streptomyces fradiae* var. k11 [J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2008, 18: 410-416.
- [14] Yang P L, Shi P J, Yao B, et al. Cloning and overexpression

- of a *Paenibacillus* β -glucanase in *Pichia pastoris*: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2007,17:58-66.
- [15] Cheng Y F, Yang C H, Liu W H. Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Enzyme Microb. Technol., 2005,37 (5):541-546
- [16] Elizabeth P K, Hiroyuki, *et al.*. Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*[J]. Biochem., 1992, 288:117-121.
- [17] Kanhiyur D N, Magnuson T S, Crawford D L. Cloning, sequencing and characterization of the xylanase-encoding gene *suxA*, from *Streptomyces viridosporus* T7A, and its expression in *Escherichia coli*[J]. Nippon. Hosenkin Gakkaishi, 2000, 14 (1):6-10.
- [18] Heck J X, Hertz P F, Ayub M A, *et al.*. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation [J]. Biochem. Eng., 2006, 32:179-184.
- [19] Wu S J, Liu B, Zhang X B. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 72:1210-1216.
- [20] Dutta T, Sengupta R, Sahoo R, *et al.*. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2007,44:206-211.
- [21] Zhang G M, Huang J, Huang G R, *et al.*. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007,74:339-346.

【863 课题介绍】

课题名称:饲料用酶的分子改良与产品研制

课题编号:2007AA100601

课题内容、目标:

获得大量性质各异的饲料用酶新基因,进一步针对饲料用酶的特殊性质,开展饲料用酶的蛋白质工程技术研究,获得综合性质优良、具有自主知识产权的、目前国内急需的饲料用酶,包括木聚糖酶、b-葡聚糖酶、 α -半乳糖苷酶、b-甘露聚糖酶和角蛋白酶,并开展其高效表达研究和生产技术研究,实现产业化廉价生产。

课题进展:

综合应用特殊环境中产酶微生物定向培养

筛选方法、环境宏基因组文库表达筛选方法和PCR筛选方法,从热泉、地方羊品种瘤胃等特殊环境中,克隆到了200余个饲料用酶编码基因。完成了饲料用酶突变库的构建和针对饲料用酶特性的有效定向筛选方法,获得了80余个性质得到不同程度改良的突变酶。部分优良性质的突变酶在重组毕赤酵母中得到高效表达,其中木聚糖酶的单位表达量达到5 mg/mL发酵液,效价达到170 000 IU/mL,高于国内外的报道和实际生产水平。