

## 来源于瓶霉 *Phialophora* sp. G5 的酸性木聚糖酶基因的克隆及性质的研究

张帆<sup>1,2</sup>, 石鹏君<sup>2</sup>, 缪礼鸿<sup>1</sup>, 姚斌<sup>2</sup>

(1. 武汉工业学院生物与制药工程学院, 武汉 430023;  
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:**通过简并 PCR 和 TAIL-PCR 技术从瓶霉 *Phialophora* sp. G5 菌株基因组 DNA 中克隆得到一个新的编码 b-1,4-木聚糖酶的基因,命名为 xyn11G5。该基因 ORF 全长 879 bp,共编码 292 个氨基酸和一个终止密码子,前 19 个氨基酸为信号肽序列。将 xyn11G5 在毕赤酵母中进行分泌表达,重组蛋白经纯化达到电泳纯。酶学性质分析表明,该重组木聚糖酶最适温度为 50℃,最适 pH 为 5.0,在中性条件下具有良好的稳定性,并且具有一定的热稳定性,在饲料行业和生物能源行业领域具有潜在的应用前景。

**关键词:***Phialophora* sp. G5; 木聚糖酶; 毕赤酵母; 酶学性质

**doi:**10.3969/j.issn.1008-0864.2011.03.10

**中图分类号:**Q78      **文献标识码:**A      **文章编号:**1008-0864(2011)03-0060-07

## Studies on Cloning of Acid Xylanase from *Phialophora* sp. G5 and its Characteristics

ZHANG Fan<sup>1,2</sup>, SHI Peng-jun<sup>2</sup>, MIAO Li-hong<sup>1</sup>, YAO Bin<sup>2</sup>

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023;  
2. Key Laboratory for Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A xylanase gene xyn11G5 was cloned from *Phialophora* sp. G5 by degenerate PCR and TAIL-PCR method. Its ORF was 879 bp, encoded 292 amino acids residues, and the frontal 19 residues composed a putative signal peptide. Xyn11G5 was successfully expressed in *Pichia pastoris* and purified. The enzymatic characteristics analysis showed that the optimum pH and temperature for the recombinant xylanase was pH 5.0 and 50℃, respectively. It showed pH stability under neutral and thermo stability. Xyn11G5 was a good candidate in animal feed and bio-fuel industrial application.

**Key words:** *Phialophora* sp. G5; b-1, 4-xylanase; *Pichia pastoris*; enzyme characteristics

半纤维素是自然界中仅次于纤维素的含量第二丰富的可再生性资源,而木聚糖是半纤维素的重要组成部分<sup>[1]</sup>。完全降解木聚糖需要多种酶的协同作用,而木聚糖酶是最重要的酶。木聚糖酶可以水解木聚糖骨架的 β-1,4 糖苷键,将木聚糖降解成木糖和低聚糖<sup>[2]</sup>。近些年,木聚糖酶的研究越来越受到关注,其在饲料、造纸、能源和其他工业领域都有潜在的应用前景<sup>[3,4]</sup>。

木聚糖酶广泛存在多种微生物中,包括细菌、真菌和酵母菌<sup>[5,6]</sup>。已从多种微生物中克隆得到木聚糖酶基因,特别是真菌,如木霉、曲霉和根霉<sup>[7,8]</sup>。微生物来源的木聚糖酶具有多样性,即常常产生不止一种类型的木聚糖酶,而且这些木聚糖酶的性质也存在差异,如碱性、酸性、高温木聚糖酶等,不同的性质拥有不同的应用领域。根据催化结构域的相似性,糖苷水解酶被划分为

**收稿日期:**2011-02-22; **接受日期:**2011-04-09

**基金项目:**国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08003-020B); 国家肉鸡产业技术体系(nycytx-42-G2-05)资助。

**作者简介:**张帆,硕士研究生,从事微生物基因工程研究。E-mail: zhangfan\_well@126.com。通讯作者:缪礼鸿,教授,博士生导师,研究方向为资源与环境微生物学。E-mail: lhmiao2002@yahoo.com.cn; 姚斌,研究员,博士,博士生导师,研究方向为微生物基因工程。E-mail: yaobin@caas-bio.net.cn

112 个家族,而木聚糖酶主要分属于第 10 家族和第 11 家族,第 11 家族可以说是真正的木聚糖酶家族,它完全由木聚糖酶(EC 3. 2. 1. 8) 组成,不像第 10 家族具有催化多样性,而且多以低分子量和  $\beta$ -折叠片组成的三维结构为特征。这两种木聚糖酶拥有不同的作用方式、底物特异性、酶活性、分子量、净电荷和三维结构等<sup>[9]</sup>。

由于真菌来源的木聚糖酶具有特殊的酶学性质,所以本研究从筛选的一株瓶霉为材料,从中克隆到一个新的编码第 11 家族的木聚糖酶的基因,并在酵母中进行了分泌表达,随后进行了酶学性质的分析。希望开发更适用于工业运用的木聚糖酶,并为进一步研究木聚糖酶结构与功能的关系奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和化学试剂** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 菌株 Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒载体 pGEM-T Easy vector 购自 Promega 公司,酵母表达载体 pPIC9 和宿主菌 *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司;DNA 回收试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、LA-Taq 酶及 GC Buffer 购自 TaKaRa 公司。桦木木聚糖(birchwood xylan)、榉木木聚糖(beechwood xylan)购自 Sigma 公司。常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

**1.1.2 培养基** 木聚糖酶诱导培养基:5 g/L NaCl,5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.2 g/L  $\text{CaCl}_2$ ,0.01 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,30 g/L 麦麸。

完全培养基 YPD,转化培养基 RDB,选择培养基 MD 和 MM,诱导表达培养基 BMGY 和 BM-MY 的配制参照文献所述<sup>[10]</sup>。

### 1.2 产木聚糖酶菌株的筛选与鉴定

菌株分离自云南锡矿酸性废水。样品首先用无菌水稀释后涂于含有 50 mg/mL 氨苄青霉素的 PDA 平板(pH 3.0),30℃ 培养 4 d,划线分离出单菌落,将单菌落接种于木聚糖酶诱导培养基中 30℃ 摇床培养,筛选出一株高产木聚糖酶活的菌株,命名为 G5。

### 1.3 木聚糖酶基因的克隆与分析

**1.3.1 保守序列的克隆** 瓶霉 G5 菌株基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[11]</sup>,用简并引物<sup>[12]</sup> XBP1 和 XBP2(见表 1)(本实验室保存),以提取的 DNA 为模板,采用 Touchdown PCR 方法<sup>[13]</sup>扩增出一段基因片段后进行测序并进行序列分析。

**1.3.2 基因全长的克隆** 根据已获得的木聚糖酶基因片段保守序列设计特异引物 *usp1*、*usp2*、*usp3* 和 *dsp1*、*dsp2*、*dsp3*(见表 1)。采用 TAIL-PCR 方法<sup>[14]</sup>克隆全长基因。扩增产物与 pGEM-T 连接,测定序列与保守序列进行拼接和分析。

**1.3.3 木聚糖酶 cDNA 的克隆** 将 G5 接种于木聚糖酶诱导培养基中,30℃、150 r/min 振荡培养

表 1 本研究中所用的引物  
Table 1 Primers used in this study.

引物 Primer	序列 Sequence	长度(bp) Size(bp)
XBP1	5'-TACCITGCYNTSTAYGGHTGG-3'	21
XBP2	5'-ATRTAYTGRITRAANGTNGA-3'	20
<i>usp1</i>	5'-CTCGATGGACGGCTCGTTGACGCGCTGC-3'	28
<i>usp2</i>	5'-CGGCTCGTCTGCTAGATGTCGTAGGTGCC-3'	30
<i>usp3</i>	5'-GTCCTCGACGATGTAGTACTCGACCAGCGGGTTTG-3'	29
<i>dsp1</i>	5'-CAAACCCGCTGCTCGAGTACTACATCGTCGAGGAC-3'	31
<i>dsp2</i>	5'-GAGGACTTTGGCACCTACAACCCGAGCACGG-3'	35
<i>dsp3</i>	5'-GCAGCGCTCAACGAGCCGTCCATCGAG-3'	28
G511PICF	5'-GGGGAATTCTTCCCTTTCAATGCCACCGAGCTATTCCG-3'	38
G511PICR	5'-GGGGCGGCCCGCTACAGACACTGCGAGATCCAATTATTGG-3'	40

注:Y 代表 C 或 T; N 代表 A, T, C 或 G; S 代表 G 或 C; H 代表 A, C 或 T; R 代表 A 或 G; 酶切位点以下划线标识。

Note: Y represents C or T; N represents A, T, C or G; S represents G or C; H represents A, C or T; R represents A or G; restriction sites are underlined.

6 d, 离心收集菌体并提取总 RNA (SV Total RNA Isolation System, Promega), 通过反转录试剂盒 (Rever Tra Ace, TOYOBO) 的操作进行反转录。

#### 1.4 木聚糖酶基因在毕赤酵母中的重组表达

**1.4.1 表达载体的构建** 根据已获得的 cDNA 序列, 用一对表达引物 G5PICF 和 G5PICR (表 1), 以 G5 的 cDNA 为模板, 进行全长基因的扩增, 胶回收 PCR 产物并用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 然后与 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切的 pPIC9 载体连接, 构建重组载体 pPIC9-*xyn11G5*, 重组载体电击转化大肠杆菌 Trans-T1, 筛选出含目的基因的重组子, 大量培养重组菌并提取质粒。

**1.4.2 酵母的电击转化及筛选** 提取的 pPIC9-*xyn11G5* 质粒用 *Bgl* II 线性化, 电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 筛选阳性转化子, 具体方法参照 Invitrogen 公司操作手册。

**1.4.3 重组木聚糖酶的诱导表达** 将筛选的阳性转化子接种于 3 mL BMGY 培养基中, 30°C 摇床培养 48 h, 离心收集菌体, 换用 1 mL BMMY 诱导培养基重新悬浮菌体, 继续在 30°C 诱导培养 48 h, 取样检测各菌株上清液中的木聚糖酶活性, 从中筛选出表达木聚糖酶的转化子。挑选具有高酶活性的重组酵母接种于 300 mL BMGY 培养基中, 30°C 摇床培养 48 h, 离心收集菌体, 加入 100 mL BMMY 诱导培养基, 30°C 继续诱导 72 h (每隔 12 h 补加 0.5% 甲醇) 后离心收集上清液。

#### 1.5 重组木聚糖酶的纯化

将收集的上清用 5 kDa 的膜包浓缩并更换低盐溶液, 浓缩后的粗酶液在适量的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的缓冲液 A 中透析过夜, 取 2.0 mL 浓缩液上预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap Q Sepharose XL 阴离子柱 (GE Healthcare), 然后用相同缓冲液配置的 1 mol/L NaCl 溶液和缓冲液 A 进行梯度洗脱, 分部收集, 对收集管中的溶液进行酶活和 SDS-PAGE 分析。

经离子交换层析后得到的样品浓缩后进行 Superdex 75 10/300 GL 分子筛层析, 用缓冲液 A 洗脱, 分部收集。对收集管中的溶液进行酶活测定, SDS-PAGE 分析和蛋白浓度的测定。木聚糖酶活性检测运用 DNS 法<sup>[15]</sup>。

#### 1.6 pH 和温度对木聚糖酶活力的影响

木聚糖酶的最适 pH, 最适温度, pH 稳定性和

温度稳定性的测定参照文献<sup>[16]</sup>所述。

#### 1.7 金属离子和化学试剂对酶活性的影响

在标准反应体系中分别加入终浓度为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、SDS、EDTA 和  $\beta$ -mercaptoethanol, 对照组不加金属离子和化学试剂。

#### 1.8 蛋白酶抗性的测定

用 0.1 mol/L glycine-HCl (pH 2.0) 和 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 的缓冲液配制 0.1 mg/mL 的胃蛋白酶和胰蛋白酶溶液, 用 glycine-HCl (pH 2.0) 和 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液分别稀释纯化后的木聚糖酶, 按蛋白酶: 木聚糖酶 (W/W) = 1:10 的比率混合, 37°C 保温, 分别在 30 min、60 min 取样, 再按标准方法检测处理后重组酶的剩余酶活<sup>[17]</sup>。

#### 1.9 底物特异性和动力学常数的测定

用最适 pH 的缓冲液配置 1% (W/V) 的燕麦木聚糖、桦木木聚糖、榉木木聚糖和小麦阿拉伯木聚糖底物, 用 DNS 法测定酶活力。

动力学常数  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $K_{cat}$  的测定采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 具体方法参照文献<sup>[18]</sup>。

#### 1.10 产物分析

纯化的 Xyn11G5 降解桦木木聚糖和榉木木聚糖的产物分析应用高效离子交换色谱 (HPAEC) 进行测定, 具体方法参照文献<sup>[10]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 木聚糖酶基因的克隆与序列分析

用简并引物扩增出一段 146 bp 的木聚糖酶的保守片段, 该片段与来源 *Chaetomium gracile* 的木聚糖酶 (GenBank 登录号: BAA08650) 的相似性为 82%。根据获得的片段序列设计上下游的特异引物进行 TAIL-PCR 扩增, 所得序列测序后与保守片段进行序列拼接。结果表明, 该基因的 ORF 全长 879 bp, 编码 292 个氨基酸和一个终止密码子, 信号肽预测结果表明其 N 端前 19 个氨基酸为信号肽, 预测成熟蛋白质分子量为 30.0 kDa, 等电点为 4.7。该基因氨基酸序列与来源于 *Botryotinia fuckeliana* B05.10 的预测的木聚糖酶

氨基酸序列(GenBank 登录号:XP\_001558008)相似性为 63%,与来源于 *Phanerochaete chrysosporium* 的木聚糖酶氨基酸序列(GenBank 登录号:AAG44995.1)的相似性为 60%,说明该基因是一个新的编码木聚糖酶的基因,命名为 *xyn11G5*。根据氨基酸序列比对和结构分析表明,*Xyn11G5* 包含第 11 家族的三个结构域:催化结构域、碳水化合物结合域(CBM1)和它们之间的富含甘氨酸和脯氨酸的连接区域。*Xyn11G5* 的催化区共包括 181 个氨基酸(G38-V218),拥有第 11 家族催化区典型的结构特点,催化氨基酸为 E115 和 E206<sup>[19]</sup>,与来源于 *Penicillium funiculosum* 的木聚糖酶(GenBank 登录号:CAC15487)的催化区有 72% 的相似性。*Xyn11G5* 的碳水化合物结合域(T260-Y288)属于第 1 超家族碳水化合物结合域(CBM1),与来源于 *Phanerochaete chrysosporium* 的木聚糖酶(GenBank 登录号:AAG44995.1)的 CBM 序列有 100% 的相似性。

## 2.2 木聚糖酶在毕赤酵母中的表达

将去除信号肽的木聚糖酶基因连接到 pPIC9 载体并转化毕赤酵母,经甲醇诱导,筛选出表达木聚糖酶的转化子,在 100 mL 摇瓶水平上,表达量最高的重组子其木聚糖酶活性为 86 U/mL,表明该基因成功在毕赤酵母中表达。

## 2.3 木聚糖酶的纯化

用离子交换层析和凝胶过滤层析纯化得到木聚糖酶样品(图 1),纯化的木聚糖酶比活达到 857.1 U/mg。经 SDS-PAGE 分析,显示出大约 47 kDa 的特异条带,略大于预计的分子量(30 kDa),序列分析发现该木聚糖酶氨基酸序列中

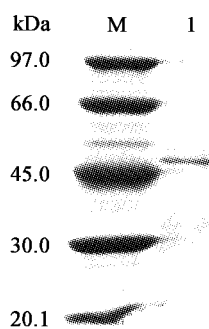


图 1 木聚糖酶 Xyn11G5 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of xylanase Xyn11G5.

1:低分子量标准蛋白质对照; 2:纯化的 Xyn11G5

1:Standard protein molecular weight markers; 2: Purified Xyn11G5.

含有 2 个潜在的 N 端糖基化位点,分析可能是糖基化使表达产物的分子量发生变化,用 Endo H 脱糖基化酶处理后其分子量未发生变化,分析可能还存在蛋白质表达后的其他修饰方式。将纯化的蛋白质单条带进行质谱分析,结果表明两段肽段(LGSVSDSDGGTYDIYQTQR 和 VNEPSIEGTSTFN-QYWSVR)与 *Xyn11G5* 氨基酸序列相符,说明纯化的即为目的木聚糖酶。

## 2.4 酶学性质的分析

纯化的木聚糖酶 *Xyn11G5* 最适 pH 为 5.0,在 pH 4.0 ~ 6.0 之间能保持 60% 以上的活力,pH 稳定性的测定结果表明,该酶在 pH 4.0 ~ 9.0 的条件下拥有良好的稳定性。*Xyn11G5* 的最适温度为 50℃,在 60℃ 仍有 40% 的活力,温度高于 70℃ 时酶活力迅速下降,该酶在 40℃ 时稳定性较好,热处理 1 h 酶活基本不丧失,50℃ 处理 20 min,剩余 35% 的酶活(图 2)。

## 2.5 不同金属离子及化学试剂对酶活力的影响

大多数金属离子对 *Xyn11G5* 的活力影响不大(表 2),1 mmol/L 的  $Pb^{2+}$  和 SDS 对 *xyn11G5* 有部分的抑制作用,而 1 mmol/L 的  $Hg^{2+}$  则可完全抑制 *xyn11G5* 的活性,而 5 mmol/L EDTA 和巯基乙醇对酶活有激活作用。

## 2.6 蛋白酶抗性分析

重组的木聚糖酶经胰蛋白酶处理 30 min 和 60 min 后,酶活基本不损失,经胃蛋白酶处理 30 min 和 60 min 后,酶活还剩 83.4% 和 66.3%。表明该木聚糖对胃蛋白酶和胰蛋白酶有一定的抗性,在许多需要和蛋白酶共同作用的工业生产中具有良好的应用前景。

## 2.7 底物特异性和动力学分析

测定 *Xyn11G5* 对不同底物的水解能力,结果发现,*Xyn11G5* 可水解桦木木聚糖(100%)、桦木木聚糖(82%)和小麦阿拉伯木聚糖(60%)。以桦木木聚糖为底物,其  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $K_{cat}$  值分别为 3.3 mg/mL、4 528.9  $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$  和 3 006.62/s;以桦木木聚糖为底物,纯化的 *Xyn11G5* 的  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $K_{cat}$  值分别为 4.1 mg/mL、6 013.2  $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$  和 4 528.99/s。

## 2.8 产物分析

对纯化的木聚糖酶 *Xyn11G5* 降解桦木木聚糖

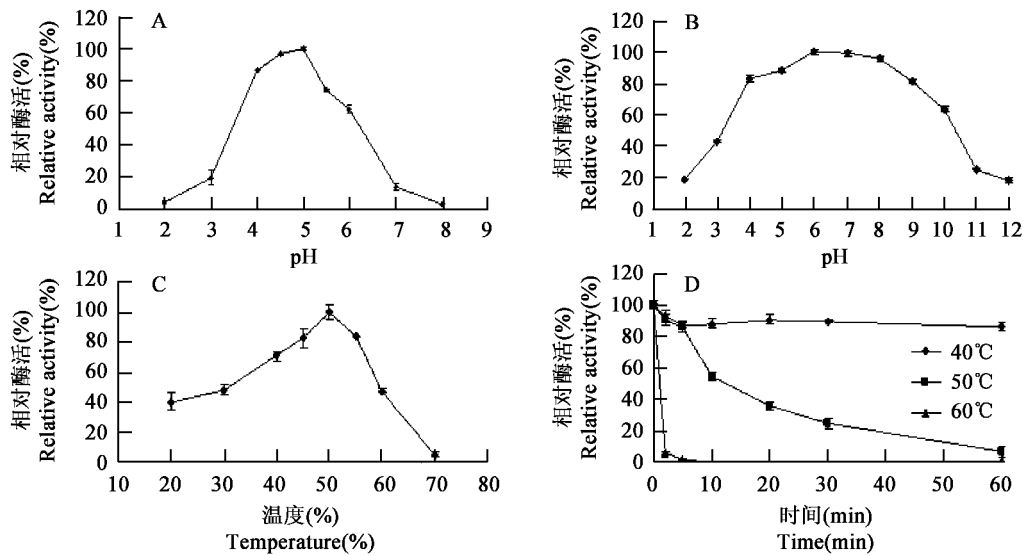


图2 木聚糖酶 Xyn11G5 的酶学性质

Fig. 2 Characterization of the Xyn11G5.

A: pH 对 Xyn11G5 活力的影响; B: pH 对 Xyn11G5 稳定性的影响; C: 温度对 Xyn11G5 活力的影响; D: 温度对 Xyn11G5 稳定性的影响  
 A: Effect of pH on activity of recombinant Xyn11G5; B: Effect of pH on stability of recombinant Xyn11G5; C: Effect of temperature on activity of recombinant Xyn11G5; D: Effect of temperature on stability of recombinant Xyn11G5.

表2 金属离子和化学试剂对 Xyn11G5 酶活的影响

Table 2 Effects of metal ions and chemicals on the activity of Xyn11G5.

金属离子和化学试剂 Metal ions and chemical reagents	相对酶活 (%) Relative activity (%)	
	1 mmol/L	5 mmol/L
None	100.0	100.0
Na <sup>+</sup>	96.3 ± 1.27	94.6 ± 1.45
K <sup>+</sup>	95.0 ± 0.81	94.2 ± 3.21
Ca <sup>2+</sup>	98.2 ± 1.32	90.3 ± 3.47
Li <sup>+</sup>	90.3 ± 3.01	84.2 ± 0.79
Co <sup>2+</sup>	91.6 ± 1.89	89.1 ± 2.52
Cr <sup>3+</sup>	89.6 ± 7.92	86.3 ± 2.49
Ni <sup>2+</sup>	90.3 ± 6.20	88.6 ± 3.33
Cu <sup>2+</sup>	78.5 ± 3.46	56.2 ± 4.34
Mg <sup>2+</sup>	90.2 ± 10.13	94.1 ± 0.97
Fe <sup>3+</sup>	92.4 ± 4.72	90.8 ± 5.38
Hg <sup>2+</sup>	0	ND
Pb <sup>2+</sup>	45.2 ± 2.57	2.6 ± 3.22
SDS	36.2 ± 3.57	9.8 ± 5.34
EDTA	83.1 ± 2.18	103.5 ± 7.72
β-mercaptoethanol	94.1 ± 4.95	108.4 ± 2.35

注: ND: 未检测。

Note: ND: Not determined.

和桦木木聚糖进行产物分析实验,运用高效离子交换色谱(HPAEC)进行。降解桦木木聚糖的产物主要为木二糖(58.0%)和木三糖(42.0%);降解桦木木聚糖的产物主要为木糖(2.4%)、木二糖(47.0%)和木三糖(50.5%)。

### 3 讨论

为适应工业生产的要求,真菌来源的木聚糖酶越来越受到人们的关注,因为其拥有诸多优良的酶学性质。如来源于嗜酸真菌 *Bispora* sp. MEY-1<sup>[12]</sup>,来源于 *Penicillium* sp. CGMCC 1669<sup>[20]</sup>和来源于 *Trichoderma harzianum* C4<sup>[21]</sup>的木聚糖酶都有各自优良的酶学性质,如较高的热稳定性,适应极端 pH 和一定的蛋白酶抗性等,在工业上也有潜在的应用前景。基于降低生产成本,高效表达和开发高比活的木聚糖酶的要求,通过基因工程手段构建高效生物反应器是解决木聚糖酶工业化廉价生产这一问题的最有效途径,国内外都已进行了大量的研究并取得了较大进展<sup>[22]</sup>,如高产菌的选育、工程菌的构建、培养优化条件等。这些研究的成功将促进木聚糖酶在造纸、食品、饲料等产业的广泛应用,能有效控制工业对环境的污染。

本研究通过简并 PCR 和 TAIL-PCR 的方法,从来源于锡矿废水中分离的瓶霉 *Phialophora* sp. G5 基因组 DNA 中克隆到一个新的木聚糖酶的基因 *xyn11G5*,并在毕赤酵母中成功表达。本研究采用毕赤酵母  $\alpha$ -因子信号肽,实现了该酶在毕赤酵母中的分泌表达,这对于实现该酶的制备及应用具有重要意义。重组的毕赤酵母在摇瓶中摇床培养经甲醇诱导 72 h 后,上清中酶活达到 86 U/mL,虽然不属于高效表达,但如果优化其培养条件或采用高密度发酵等大规模培养方法有望进一步提高重组蛋白的分泌能力,为工业化生产奠定基础。

真菌来源的木聚糖酶最适 pH 大多都是在酸性范围,如来源于嗜酸真菌 *Bispora* sp. MEY-1<sup>[12]</sup> 的木聚糖酶最适 pH 为 2.5,来源于 *Penicillium* sp. CGMCC 1669<sup>[20]</sup> 的木聚糖酶最适 pH 为 4.5,来源于 *Trichoderma harzianum* C4 的木聚糖酶最适 pH 为 5.5<sup>[21]</sup>。Xyn11G5 属于第 11 家族木聚糖酶,最适 pH 为 5.0。在 pH 稳定性方面,Xyn11G5 在 pH 4.0~9.0 有良好的稳定性(用不同 pH 缓冲液处理 1 h 后剩余 80% 的酶活),而 MEY-1<sup>[12]</sup> 和 CGMCC 1669<sup>[20]</sup> 的 pH 稳定性没有这么宽的范围。真菌来源的木聚糖酶的最适温度一般不超过 60℃,而 Xyn11G5 的最适温度为 50℃,与真菌来源的第 11 家族木聚糖酶相似,如 *Penicillium* sp. CGMCC 1669<sup>[20]</sup>, *Trichoderma harzianum* C4<sup>[21]</sup>,相比于高温酶,这种温度适合于在饲料喂养中使用。

大部分金属离子对 Xyn11G5 酶活的影响不是很明显,只有  $Hg^{2+}$  在低浓度时就已完全抑制了 *xyn11G5* 的酶活,这与其他报道的木聚糖酶相似,可能是  $Hg^{2+}$  氧化吡啉环,影响了酶的色氨酸残基,从而影响的酶活性<sup>[23]</sup>。 $Pb^{2+}$  在低浓度时也明显抑制了 Xyn11G5 的活性,而在高浓度时已完全抑制了 Xyn11G5 的活性,这与文献报道的大部分木聚糖酶相似<sup>[24]</sup>。而巯基乙醇在高浓度时使酶活增加,这可能是二硫键被还原所导致的<sup>[25]</sup>。EDTA 在高浓度时可以激活 Xyn11G5 的活性,这可能是由于 EDTA 与某些金属离子形成稳定的水溶性络合物,抑制了某些重金属离子对酶活性中心的抑制作用,从而提高了酶活。

本研究从瓶霉 *Phialophora* sp. G5 中克隆得到的木聚糖酶最适温度和最适 pH 适中,有良好

的 pH 稳定性,并且有一定的金属离子抗性,有望实现其在饲料工业中的应用,并未进一步研究其结构和功能的关系提供基础。

## 参 考 文 献

- [1] Prade R A. Xylanases: from biology to biotechnology [J]. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1996, 13:100-131.
- [2] Biely P. Microbial xylanolytic systems [J]. *Trends Biotechnol.*, 1985, 3:286-290.
- [3] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases [J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29:3-23.
- [4] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67:577-591.
- [5] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases [J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999, 23:411-456.
- [6] Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application [J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, 22:33-64.
- [7] 张茂,周庆丰. 黑曲霉木聚糖酶基因 (*xynB*) 的克隆及真核分泌表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(2):368-373.
- [8] 何军,余冰. 里氏木霉木聚糖酶基因 (*xyn2*) 在毕赤酵母中异源表达及重组蛋白酶学性质分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5):920-924.
- [9] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases on amino acid sequence similarities [J]. *Biochem.*, 1993, 293:781-788.
- [10] 李宁. 链霉菌来源的木聚糖降解酶相关基因的克隆及酶学性质研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 博士学位论文, 2009.
- [11] Graham G C, Mayers P, Henry R J. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis [J]. *Biotechniques*, 1994, 16:48-50.
- [12] Luo H, Li J, Yao B, et al. Cloning, expression and characterization of a novel acidic xylanase, XYL11B, from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1 [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2009, 45:126-133.
- [13] Qiu Z, Shi P, Luo H, et al. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2010, 46:506-512.
- [14] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25:674-681.
- [15] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal. Chem.*, 1959, 31:426-428.
- [16] 姚国玉,陈强,姚斌,等. 链霉菌 *Streptomyces* sp. S9 木聚糖酶基因 *xynBS9* 的克隆表达及性质分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(4):64-70.

- [17] 魁红,董守良,姚斌,等.一种来源于 *Bispore betulina* 的酸性木聚糖酶基因克隆及其酶学性质研究[J]. 中国农业科技导报,2010,12(5):109-115.
- [18] 邱振华,刘素纯,姚斌,等.来源于链霉菌 *Streptomyces fradiae* var. k11 的抗蛋白酶甘露聚糖酶的基因克隆与鉴定[J]. 中国农业科技导报,2010,12(4):114-120.
- [19] Elizabeth P, Hiroyuki. Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus* [J]. *Biochemistry*, 1992,288:117-121.
- [20] Liu W, Shi P, Yao B, *et al.*. Gene cloning, overexpression, and characterization of a xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162(1):1-12.
- [21] Min L, Shin J, Chung D, *et al.*. Molecular cloning and expression of the *Trichoderma harzianum* C4 endo- $\beta$ -1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009,19(8):823-828.
- [22] 余元莉,李秀婷.微生物木聚糖酶的研究进展[J]. 中国酿造,2009,2:1-3.
- [23] Zhang G, Huang J, Huang G, *et al.*. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74:339-346.
- [24] Li N, Shi P, 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.
- [25] Heck J, Flôres S, Hertz P, *et al.*. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation [J]. *Bioresour. Technol.*, 2006,97:1902-1906.

## 生物农药新产品创制技术研讨会

全国生物农药研讨会由中国植物保护学会生物防治专业委员会主办,每2~3年召开1次,随着我国民众食品安全意识的加强,对安全、高效、经济的生物农药的市场需求也不断增加。为了促进生物农药新产品的开发和已有产品的提高,满足生产的需求,中国植物保护学会生物防治专业委员会、植物病虫害生物学国家重点实验室、农业部生物防治重点开放实验室经商定,拟定于2011年7月下旬在江西省南昌市联合召开“生物农药新产品创制技术研讨会”。会议将是对“十一五”以来我国生物农药领域所取得的重大成果和研制出的新产品的一次总结;对“十二五”我国生物农药领域计划开展的生物农药研究的交流;会议还将对生物农药新剂型和植物诱抗剂研究开展讨论。

会议为同行们提供了交流的平台,也为生物农药新产品搭建了展示的舞台。诚邀科研、教学、技术推广和生产企业的广大生物农药工作者参会,交流近年来各自工作的进展和展示生物农药产品,同时为我国生物农药的更大发展献计献策。

### 一、主办单位:

中国植物保护学会生物防治专业委员会

### 二、会议时间、地点:

2011年7月下旬,江西省南昌市

### 三、会议主题:

1. 国内外生物农药(含昆虫天敌)研发进展;
2. 国内生物农药企业发展趋势及新产品开发;
3. 生物农药助剂和增效剂;
4. 微生物杀虫剂菌种改良与分子设计;
5. 植物免疫与诱抗剂。

### 四、联系方式:

联系人:邱德文博士

电话:010-82105929

邮箱:qiudewen@caas.net.cn

地址:北京市海淀区中关村南大街12号  
中国农科院植保所南区

邮编:100081