

研究报告

定向引入 N-糖基化位点改进黑曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶热稳定性吴凤梅^{1,2} 周燕霞^{1,2} 姚冬生^{1,2} 谢春芳^{*3}

1 暨南大学生物医药研究院 广东 广州 510632

2 暨南大学基因工程药物国家工程研究中心 广东 广州 510632

3 暨南大学生命科学技术学院生物工程学系 广东 广州 510632

摘要:【背景】木聚糖是生物圈中仅次于纤维素的第二大多糖,其结构复杂,完全降解需要多种木聚糖酶协同作用。 β -1,4-内切木聚糖酶是木聚糖主链水解过程中最关键的酶,已广泛应用于饲料、造纸、能源、食品和医药等行业。但在实际应用中,由于真菌木聚糖酶的热稳定性较差,限制了其在工业中的应用。【目的】提高来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的 β -1,4-内切木聚糖酶(xynB)热稳定性。【方法】采用氨基酸虚拟突变技术对 xynB 定向引入一个 N-糖基化位点,将虚拟突变后筛选获得的候选突变体和野生型在毕赤酵母 SMD1168 中表达,并对纯化后的野生型和突变体酶进行酶学性质和稳定性分析。【结果】经虚拟突变和筛选获得 5 个候选突变体,在毕赤酵母 SMD1168 中成功表达了 4 个突变体,其中 3 个突变体发生了糖基化。突变体和野生型酶均表现出宽范围的酸碱耐受性,且突变体 xynB^{A92N/D94T} 在 pH 4.0–11.0 条件下的稳定性明显优于野生型;糖基化突变体 xynB^{A92N/D94T}、xynB^{G66N/A68T} 和 xynB^{G66F/D67N/G69T} 在温度为 60–80 °C 时热稳定性明显高于野生型, xynB^{G66N/A68T} 在 80 °C 保温 30 min 后的残留酶活比野生型提高了约 30%。【结论】本研究可为其他来源木聚糖酶和其他工业酶的热稳定分子改造提供参考。

关键词: β -1,4-内切木聚糖酶, N-糖基化, 氨基酸虚拟突变, 酶学性质

Foundation items: National High-Tech Research and Development Program of China (2013AA102801); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2013B090600141); Guangdong Provincial Research and Development Financial Subsidy Project

***Corresponding author:** E-mail: xiechunfang28@aliyun.com

Received: 04-03-2020; **Accepted:** 04-05-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA102801); 广东省科技计划(2013B090600141); 广东省级财政技术研究开发补助项目

***通信作者:** E-mail: xiechunfang28@aliyun.com

收稿日期: 2020-03-04; **接受日期:** 2020-05-04; **网络首发日期:** 2020-05-21

Improvement of thermal stability of endo- β -1,4-xylanase from *Aspergillus niger* by introducing N-glycosylation site

WU Feng-Mei^{1,2} ZHOU Yan-Xia^{1,2} YAO Dong-Sheng^{1,2} XIE Chun-Fang^{*3}

1 Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

2 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

3 Department of Bioengineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

Abstract: [Background] Xylan is the second most abundant polysaccharide in nature, and second only to cellulose. The structure of xylan is complex, and its complete degradation needs many xylanases. Endo- β -1,4-xylanase is the key enzyme in the hydrolysis process of xylan main chain. It has been widely used in feed, papermaking, energy, food and medicine industries. However, in practical application, due to the poor thermal stability of fungal xylanase, its application in industry is limited. **[Objective]** The purpose of this study is to improve the thermal stability of endo- β -1,4-xylanase (xynB) from *Aspergillus niger*. **[Methods]** Firstly, an N-glycosylation site was introduced into xynB by amino acid virtual mutation technology to obtain the mutants. Then the mutants and wild-type enzymes were expressed in *Pichia pastoris* SMD1168. Finally, the purified wild-type and mutant enzymes were characterized by enzymatic properties. **[Results]** Five candidate mutants were obtained by virtual mutation and screening. Four mutants were successfully expressed in *Pichia pastoris* SMD1168, and three of which were glycosylated. The mutants and wild-type enzyme showed wide pH tolerance, and the stability of xynB^{A92N/D94T} at pH 4.0–11.0 was significantly better than that of the wild-type; xynB^{A92N/D94T}, xynB^{G66N/A68T} and xynB^{G66F/D67N/G69T}, which were glycosylated, showed significantly higher thermal stability at 60–80 °C than that of the wild-type, and the residual enzyme activity of xynB^{G66N/A68T} at 80 °C after incubation for 30 min was about 30% higher than that of the wild-type. **[Conclusion]** The method of this study can provide reference for the thermal stability molecular modification of other xylanases and other industrial enzymes.

Keywords: Endo- β -1,4-xylanase, N-glycosylation, Amino acid virtual mutation, Enzymatic properties

木聚糖是一种复杂的多聚五碳糖, 是植物半纤维素的主要成分, 在细胞壁中的含量约占被子植物细胞干重的 15%–35%, 是生物圈中仅次于纤维素的第二大多糖^[1-2]。木聚糖分子结构为阿拉伯木聚糖, 主要由阿拉伯糖和木糖构成, 化学结构复杂, 完全降解需要多种木聚糖酶协同作用; 参与降解木聚糖的酶主要有 β -1,4-内切木聚糖酶、 β -1,4-木糖苷酶、 α -L-呋喃阿拉伯糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶和乙酰木聚糖酯酶等, 其中 β -1,4-内切木聚糖酶是木聚糖主链水解过程中最主要的酶, 作用于木聚糖的主链内切 β -1,4-糖苷键, 产生木糖、木二糖、木三糖等低聚木糖和少量阿拉伯糖^[3]。 β -1,4-内切木聚糖酶已广泛应用于饲料、造纸、能源、食品和医药等行业^[2]。 β -1,4-内切木聚糖酶主要来源于芽孢杆菌、节杆菌、肠杆菌和放

线菌等细菌及木霉、曲霉、毛壳霉等真菌^[3-4], 虽然其来源广泛, 但酶活不高, 且 pH 适用范围和热稳定性达不到工业生产的需求, 需要进行物理、化学或生物学改造以提高其酶活、pH 稳定性和热稳定性。

蛋白质糖基化工程的大量研究显示, 很多经糖基化修饰的蛋白比未糖基化形式蛋白的溶解性、蛋白酶抗性、pH 和热稳定性有所增强。据报道, Niu 等^[5]利用 N-糖基化修饰提高了磷酸酶对胃蛋白酶的抗性; Fu 等^[6]研究表明 N-糖基化有利于提高源自风车棕榈树的过氧化物酶(windmill palm tree peroxidases, WPTP)的催化活性和耐碱性; Chang 等^[7]研究表明来源于烟曲霉的嗜热木聚糖酶(*Af*-XYNA) N124 处的 N-糖基化提高了该酶的 pH 和热稳定性; 罗长财等^[8]研究结果显示 N-

糖基化可提高重组耐高温 β -甘露聚糖酶 (ReTMan26) 的 pH 稳定性、热稳定性及抗胃蛋白酶和胰蛋白酶性; 王小艳^[9]利用定点突变技术筛选 N-糖基化修饰的不同 β -葡萄糖醛酸苷酶突变体, 发现 N28 位糖基化能显著提高酶的活性, N383 和 N59 位糖基化能提高该酶的热稳定性; Hu 等^[10]通过对 β -甘露聚糖酶进行糖基化修饰获得两个热稳定性、pH 稳定性、抗胰蛋白酶和胃蛋白酶性都提高的突变酶(g-123、g-347)。本研究中的 β -1,4-内切木聚糖酶 (简称 xynB, GenBank 登录号: AGG38091) 来源于 *Aspergillus niger*, 基因序列长 675 bp, 由 225 个氨基酸组成, 其中前 18 个氨基酸构成信号肽。xynB 属于糖苷水解酶 GH11 家族, 底物专一性很高, 分子量大小约为 24 kD, 等电点为 4.8, 该酶具有高酶活力、宽 pH (pH 3.0–9.0) 稳定性, 但热稳定性相对较低, 属于中温酶, 天然 xynB 在真核细胞中表达时不发生糖基化^[11]。本研究利用计算机氨基酸虚拟突变, 在 xynB 非活性中心部位的合适区域通过定向突变引入一个 N-糖基化位点, 构建毕赤酵母 SMD1168 重组工程菌株并表达野生型和突变体蛋白, 同时对糖基化突变体进行 pH 稳定性和热稳定性研究分析, 以期获得热稳定提高的糖基化 xynB 突变体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

毕赤酵母工程菌株 SMD1168、含有构建酵母表达载体前同源臂所需的 Paox-Ptef-ss1-BBPB 质粒和后同源臂所需的 Taox-PgHT-BBPB 质粒的大肠杆菌甘油菌由本实验室保存; 含有 pUC57-xynB^{WT} 质粒、pUC57-xynB^{G48T} 质粒、pUC57-xynB^{G66N/A68T} 质粒、pUC57-xynB^{G66F/D67N/G69T} 质粒、pUC57-xynB^{A92N/D94T} 和 pUC57-xynB^{D130N/N132T} 质粒 (基因序列 C 端或 N 端添加 6 个组氨酸标签, 且基因 5' 端和 3' 端分别添加限制性核酸内切酶 *Xba* I、*Eco*R I 和 *Spe* I、*Pst* I 的酶切位点) 的大肠杆菌甘油菌购自上海捷瑞生物工程有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自广州鼎国生物技术公司。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性核酸内切酶 (*Eco*R I、*Spe* I、*Xba* I、*Pst* I)、T4 DNA 连接酶、糖苷内切酶 H (Endo H) 和核酸胶回收试剂盒购自 NEB 公司; 高纯质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 桦木木聚糖购自 Sigma 公司; 细菌学蛋白胨、大豆蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

LB 液培养基 (g/L): 酵母提取物 5.0, 细菌学蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。LB 固体培养基中加琼脂粉 15.0 g。

MD 固体培养基 (g/L): 丙三醇 10.0, 无氨基酵母氮源 13.4, 生物素 0.4 mg/L, 琼脂粉 15.0。

YPG 液体培养基 (g/L): 酵母提取物 10.0, 大豆蛋白胨 20.0, 丙三醇 10.0。

1.1.3 主要仪器

Discovery Studio 4.5, 北京创腾科技有限公司; 恒温培养箱、恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; Mini 蛋白质电泳仪、Western blot 电泳仪, Bio-Rad 公司; AKTA pure 纯化仪, GE Healthcare 公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 xynB 三维结构模型的建立及模型评估

利用 Discovery Studio 4.5 (DS 4.5) 软件从 PDB_nr95 数据库中搜索到与 xynB (GenBank 登录号: AGG38091) 相似性大于 50% 的蛋白晶体结构作为模板, 进行同源建模以获得初始模型, 再通过对初始模型进行加氢优化、侧链优化、Loop 区优化和能量最小化后得到 xynB 的最佳构象, 并采用拉氏图 (ramachandran plot) 法和 Profile-3D 法对模型进行评估。

1.2.2 氨基酸虚拟突变位点的筛选及确定

蛋白质的 N-糖基化有特殊识别序列 Asn-X-Ser/Thr (X 是除 Pro 外的任意氨基酸), 且识

别序列位于蛋白质表面^[9,12]。N-糖基化位点常位于蛋白质结构表面的 β -转角或 Loop 区^[13]。位于蛋白质结构反向转角区的 N-糖基化识别序列的 Asn 前面 2-3 个位置的氨基酸为 Phe 时, 有利于 N-糖基化的发生, 如序列 F-N-X-S/T、F-X-N-X-S/T、F-X-X-N-X-S/T^[14-15]。序列 Asn-X-Ser/Thr-Y 中的 Y 是 Pro、Glu 和 Trp 会阻碍 N-糖基化的发生, 带正电荷的氨基酸位于 X 位有利于糖基化的发生, Thr、Ser 和 Cys 无论位于 X 还是 Y 都有利于糖基化^[16]。

基于这些信息, 先利用 DS 4.5 对 xynB 蛋白模型进行相对溶剂可及性 (relative solvent accessibility, RSA) 分析, RSA 大于 25% 的蛋白表面在溶液中暴露程度高, 选择暴露在 xynB 表面的 β -转角和 Loop 区作为虚拟突变的最初范围。再利用 DS 4.5 对 xynB 模型与木五糖分子进行 CDOCKER 对接, 分析 xynB 与底物结合面氨基酸并记录。接着利用 DS 4.5 对多个结合面氨基酸进行丙氨酸扫描, 把变成丙氨酸后能量变化大于 2.0 kcal/mol 的氨基酸记为热点残基。为了保证不影响突变体的酶活, 去除能与底物结合发生相互作用的热点残基, 同时去除突变后序列 Asn-X-Ser/Thr-Y 中 Y 位置为 Pro、Glu 和 Trp 的可突变序列, 再根据 N-X-S/T、F-N-X-S/T、F-X-N-X-S/T、F-X-X-N-X-S/T 序列对剩下的可突变序列进行虚拟突变, 保留突变能 (mutation energy) ≤ 0.5 kcal/mol 的结构稳定的突变体。利用 Glyport (<http://www.glycosciences.de/glytorsion>) 对引入 N-糖基化位点的突变体在空间中能否发生 N-糖基化进行合理性评估, 若能发生, 再利用 Gromacs 5.1.2 对突变体和底物对接复合物进行分子动力学模拟, 分析突变体蛋白碳链骨架的稳定性, 把 RMSD 变化在 0.2 nm 范围内上下波动的突变体作为优选突变体。

1.2.3 xynB 野生型和突变体的酵母表达载体构建

用 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切含有全基因合成的野生型及突变体基因质粒后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的片段, 与经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切胶回收后的 Taox-PgHT-BBPB 载体通过 T4 DNA

连接酶进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性转化子, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切鉴定并切胶回收目的载体。*EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切 Paox-Ptef-ss1-BBPB 质粒, 切胶回收 Paox-Ptef-ss1 片段, 与胶回收后的载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性转化子, 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得重组质粒。

1.2.4 重组质粒电击转化毕赤酵母 SMD1168 及其重组子的筛选

重组质粒经 *Xba* I 和 *Spe* I 线性化后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的片段, 并将目的片段电击转入毕赤酵母 SMD1168 感受态细胞中, 涂布于 MD 固体培养基平板, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 待长出单菌落, 挑取单克隆于 5 mL YPG 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 72 h, 12 000 r/min 离心 1 min 收集上清, SDS-PAGE 法检测培养上清, 筛选阳性单克隆。

1.2.5 突变体蛋白糖基化鉴定和 Western blotting 验证

将阳性单克隆接种至 250 mL YPG 液体培养基进行扩大培养 72 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 离心 10 min 收集上清, 进行 80% 饱和度硫酸铵沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 离心 15 min 取沉淀, 用平衡缓冲液 (20 mmol/L PBS、0.5 mol/L NaCl, pH 7.4) 重悬沉淀, 再 8 000 $\times g$ 离心 10 min 取上清为蛋白粗酶液, 经纯化仪进行镍柱亲和层析获得纯度较高的酶液。利用糖苷内切酶 H 酶切野生型和突变体蛋白, 酶切产物经 SDS-PAGE 鉴定, 分析突变体蛋白是否发生糖基化, 并基于野生型和突变体酶 N 端的组氨酸标签, 利用一抗 (小鼠抗组氨酸标签抗体) 和二抗 (羊抗小鼠抗体) 进行 Western blotting 实验加以验证。

1.2.6 xynB 野生型和突变体酶的酶活力测定

木聚糖酶酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法, 木聚糖酶的酶活力单位定义为: 在 pH 5.0、温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 每分钟水解木聚糖形成 1 μmol 木糖 (还原糖) 所需酶量为 1 个酶活力单

位(U)^[17-19]。吸取 700 μL 0.1%桦木木聚糖溶液(pH 5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸溶液配制)于 1.5 mL EP 管内,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中温育 5 min;分别吸取 10 μL 温育好的各突变体和野生型蛋白液加入温育好的桦木木聚糖溶液中,充分混匀,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中反应 10 min,取出后立即放入沸水中煮 15 min 使酶失活,待溶液冷却后给反应体系中加入 700 μL DNS 显色剂显色,再沸水煮 10 min,冷却至室温。以沸水煮 30 min 的灭活酶作为对照组,每组重复 3 次。各取 200 μL 于 96 孔板中于酶标仪中测量波长 540 nm 处的光吸收值。

酶活力计算公式为: $H=D \times V_1 \times C_X / (T \times V_2)$ 。其中, H : 木聚糖酶酶活; D : 酶的稀释倍数; V_1 : 反应的体系体积(mL); C_X : 木聚糖的摩尔浓度($\mu\text{mol/L}$); T : 反应时间(min); V_2 : 加入酶液的体积(mL)。

1.2.7 xynB 野生型和突变体酶最适 pH 及最适温度的测定

将不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 由磷酸氢二钠-柠檬酸溶液配制)配制的 0.1%桦木木聚糖溶液与等量的 xynB 野生型和突变体蛋白液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中反应 10 min,按 1.2.6 中的 DNS 法测定酶活力,以最高酶活力为 100%计算 xynB 野生型和突变体蛋白在不同 pH 条件下的相对酶活。

将最适 pH 缓冲溶液配制的 0.1%桦木木聚糖溶液在不同温度(20、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$)下分别与等量的 xynB 野生型和突变体蛋白液反应 10 min,按 1.2.6 中的 DNS 法测定酶活力,以最高酶活力为 100%计算 xynB 野生型和突变体蛋白在不同温度条件下的相对酶活。

1.2.8 xynB 野生型和突变体酶的 pH 稳定性测定

xynB 野生型和突变体蛋白在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 (0.2 mol/L Na_2HPO_4 -0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配制)和 pH 9.0、10.0、11.0 (0.2 mol/L Na_2CO_3 -0.2 mol/L NaHCO_3 缓冲液配制)的缓冲液中 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min,在各酶的最适温度下反应 10 min 后采用 DNS 法测定酶活,以最高酶活力

为 100%计算 xynB 野生型和突变体蛋白在各 pH 条件下的相对酶活。

1.2.9 xynB 野生型和突变体酶的温度稳定性测定

将蛋白酶分装于各管中,置于不同温度(20、30、40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$)保温 30 min,在各酶的最适条件下反应 10 min 测定酶活,以 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置未经温度处理的蛋白酶活力为 100%计算 xynB 野生型和突变体蛋白在各温度条件下的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 xynB 三维结构模型的建立及模型评估

利用 DS 4.5 从 PDB_nr95 数据库中搜索到与 xynB 相似性为 73.8%的蛋白晶体结构(PDB ID: 3WP3_B),利用 DS 4.5 同源建模板块进行同源建模获得初始模型,初始模型优化后,经拉氏图评估(图 1A)得出该模型中 96%的氨基酸的二面角在允许区域内,且有 90%以上氨基酸处于最适区域内,评价模型可信。经 Profile-3D 评估(图 1B)发现模型的氨基酸相容性得分(verify score)均在“0线”以上,且相容性得分为 110.47,显著高于期望值(86.142 3),说明该模型的氨基酸的空间结构都是合理的。综上评估,该优化模型是合理可信的,可作为 xynB 的理想结构模型(图 1C)。

2.2 氨基酸虚拟突变位点的筛选及确定

2.2.1 xynB 表面潜在 N-糖基化位点分析

(1) 利用 DS 4.5 对 xynB 模型进行 RSA 分析,表征暴露在蛋白表面的氨基酸残基(RSA>25%)的分布(图 2A);(2) 记录暴露在 xynB 表面 β -转角处和 Loop 区可构建 N-糖基化的氨基酸序列作为可突变序列,共有 13 条(表 1);(3) xynB 模型与底物木五糖的 CDOCKER 对接结果显示 xynB 与底物结合时结合面氨基酸有 Ser52, Asn80, Tyr108、206、112、123、214, Arg157, Ala161, Trp54、114、173, Val82, Phe81, Gln171 和 Glu212 (图 2B);(4) 结合面氨基酸经丙氨酸扫描获得热点残基为 Tyr112、206, Trp173, Gln171 和 Arg157,舍弃含有热点残基的

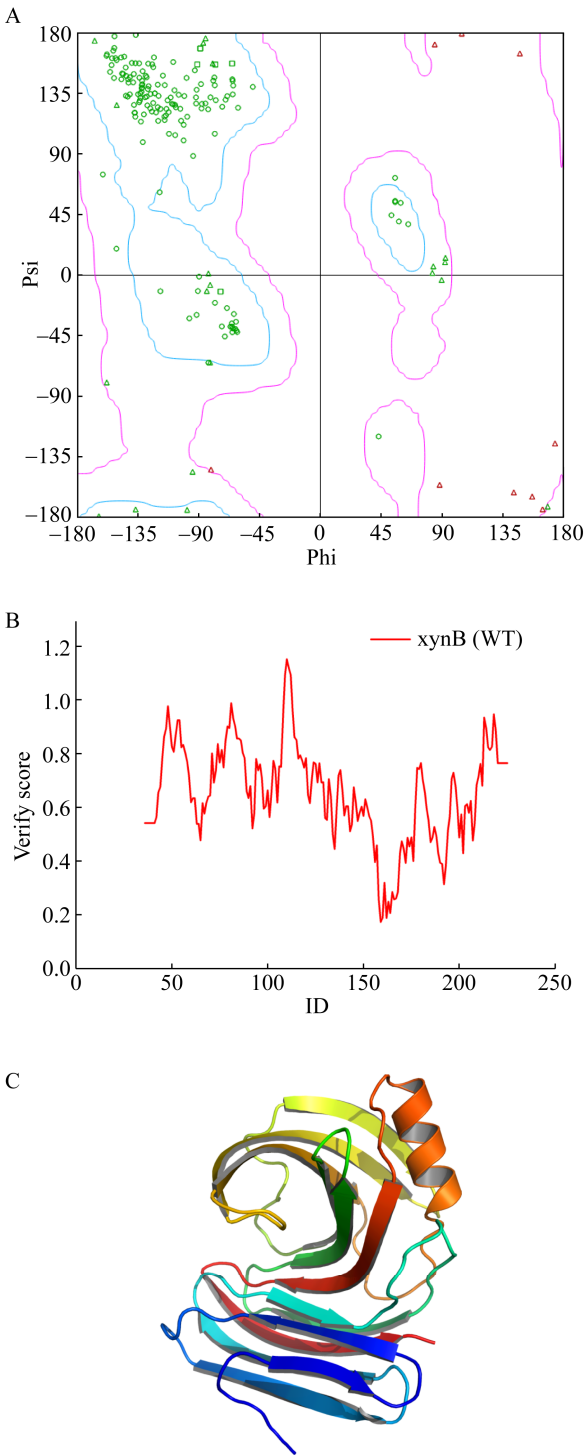


图1 $xynB$ 模型评估结果(A、B)及三维结构模型(C)
Figure 1 The evaluation results of model (A, B) and three-dimensional structure model of $xynB$ (C)
注: A: 拉氏图评估结果; B: Profile-3D 评估结果.
Note: A: The evaluation result of ramachandran plot; B: The evaluation result of Profile-3D.

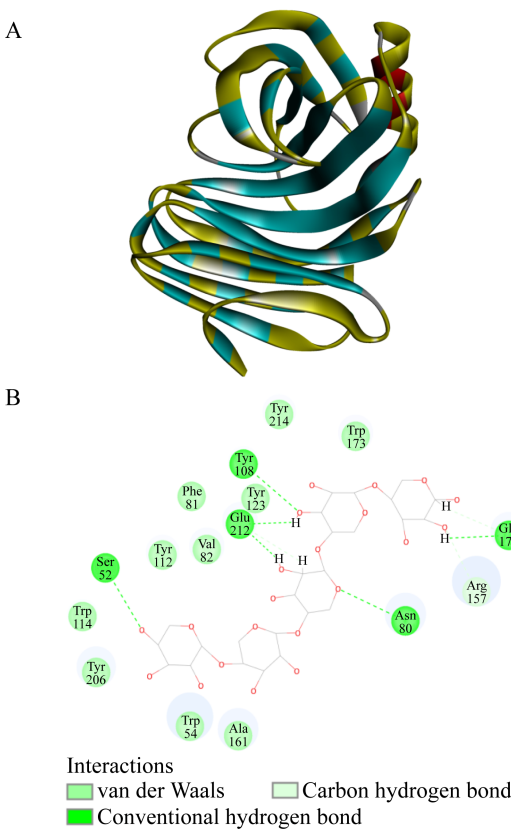


图2 $xynB$ 表面氨基酸分布(A)及 $xynB$ 与木五糖对接结合的氨基酸(B)
Figure 2 The distribution of amino acids on the surface of $xynB$ (A) and the docked amino acids with xylopentase (B)
注: 图 2A 中金黄色部分为 RSA>25%的氨基酸.
Note: RSA>25% amino acids were showed with golden yellow in Figure 2A.

表1 潜在可形成 N-糖基化的突变序列
Table 1 The amino acid sequences that can construct N-glycosylation

序列编号	氨基酸位置	可突变序列
Sequences No.	The position of amino acid	Mutable sequences
1	39-41	Thr-Pro-Ser
2	46-49	Asn-Asn-Gly-Phe
3	56-59	Asp-Gly-Gly-Gly
4	66-69	Gly-Asp-Ala-Gly
5	88-94	Asn-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Asp
6	104-108	Ser-Gly-Asn-Gly-Tyr
7	117-119	Asp-Pro-Leu
8	129-137	Gly-Asp-Tyr-Asn-Pro-Gly-Ser-Gly-Gly
9	145-148	Ser-Asp-Gly-Ser
10	162-165	Ser-Ile-Gln-Gly
11	177-182	Gln-Asn-Lys-Arg-Val-Gly
12	197-202	Leu-Gly-Met-Asn-Leu-Gly
13	213-215	Gly-Tyr-Gln

可突变序列；(5) 同时舍弃突变后序列 Asn-X-Ser/Thr-Y 中 Y 位置为 Pro、Glu 和 Trp 的可突变序列；(6) 根据 N-X-S/T、F-Y-Z-N-X-S/T、F-N-X-S/T、F-X-N-X-S/T 序列对候选可突变序列进行氨基酸虚拟突变，保留突变能 ≤ 0.5 kcal/mol 的突变体。经以上 6 步筛选得到 10 个结构稳定的突变体(表 2)。

2.2.2 突变体的确定

经 Glyprot 对所筛选突变体形成 N-糖基化空间合理性的评估显示，编号为 2、4、5、8、10 的突变体存在空间位阻，不能发生 N-糖基化，而

表 2 氨基酸虚拟突变后结构稳定的突变体
Table 2 The mutants with stabilized structure after amino acid virtual mutation

编号 No.	突变体 Mutation	突变能 Mutation energy (kcal/mol)	影响 Effect
1	G48T	-0.04	Neutral
2	D67T	-0.96	Stabilizing
3	G66N/A68T	-2.19	Stabilizing
4	S162N/G164T	-1.37	Stabilizing
5	G134N/G136T	0.42	Neutral
6	D130N/N132T	-1.95	Stabilizing
7	A92N/D94T	-1.15	Stabilizing
8	S145N/G147T	-0.87	Stabilizing
9	G66F/D67N/G69T	0.1	Neutral
10	S162F/I163N/G165T	-1.05	Stabilizing

注：Stabilizing 表示突变能 <-0.5 kcal/mol；Neutral 表示 -0.5 kcal/mol \leq 突变能 ≤ 0.5 kcal/mol。

Note: Stabilizing means mutation energy <-0.5 kcal/mol; Neutral means -0.5 kcal/mol \leq mutation energy ≤ 0.5 kcal/mol.

编号为 1、3、6、7、9 的突变体在空间上可以发生 N-糖基化(图 3)。分子动力学模拟后分析它们在模拟过程中的 RMSD 变化情况，发现野生型和 5 个突变体的 RMSD 值均在 0.1 nm 范围内波动(图 4)，说明野生型和突变体蛋白结构的碳链骨架均处于稳定状态，将这 5 个突变体($xynB^{G48T}$ 、 $xynB^{G66N/A68T}$ 、 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 、 $xynB^{D130N/N132T}$ 、 $xynB^{A92N/D94T}$)作为候选突变体。

2.3 $xynB$ 野生型和突变体的酵母表达载体构建

将含野生型和突变体全合成基因序列的质粒进行双酶切鉴定，酶切片段符合预期，再采用“Biobrick”法分别组装野生型和突变体基因与元件前同源臂(Paox-Ptef-ss1)和后同源臂(TaoX-PgHT)，最终得到 Paox-Ptef-ss1- $xynB$ -Taox-PgHT-BBPB 酵母表达载体。用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切各酵母表达载体成 BBPB 和 Paox-Ptef-ss1- $xynB$ -Taox-PgHT 片段，BBPB 片段大小为 3 780 bp，Paox-Ptef-ss1- $xynB$ -Taox-PgHT 片段大小为 6 130 bp。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测各酶切产物均出现两条条带，一条在 6 000 bp 附近，一条接近 4 000 bp，鉴定酶切产物片段大小符合预期(图 5)，表明野生型和 4 个突变体的酵母表达载体构建成功。突变体 $xynB^{G48T}$ 在构建表达载体过程中一直连接失败，因此后续实验放弃该突变体。

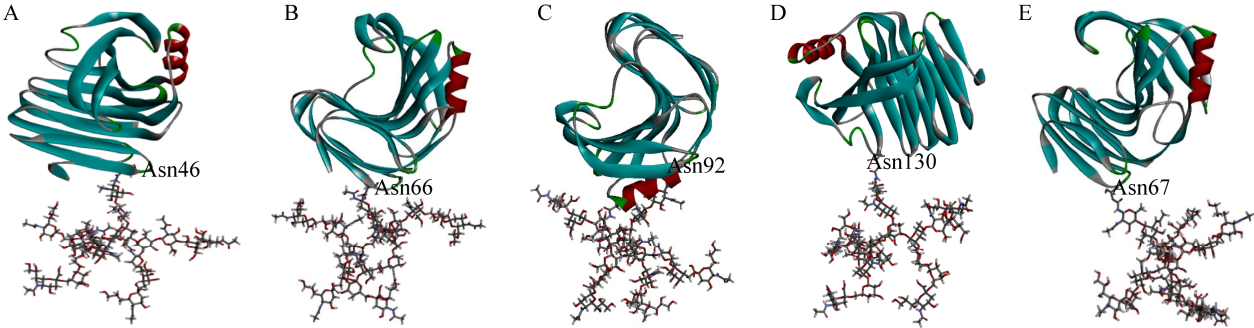


图 3 突变体 N-糖基化位点空间合理性预测结果图
Figure 3 The prediction of spatial rationality of N-glycosylation sites in mutants
Note: A: $xynB^{G48T}$; B: $xynB^{G66N/A68T}$; C: $xynB^{A92N/D94T}$; D: $xynB^{D130N/N132T}$; E: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$.

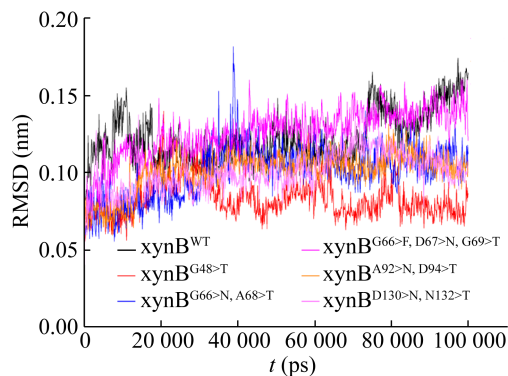
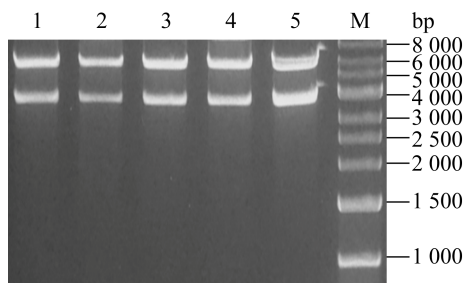
图4 $xynB$ 野生型和 5 个突变体的 RMSD 分析结果Figure 4 RMSD analysis of the wild-type and five mutants of $xynB$ 

图5 野生型和突变体酵母表达载体双酶切鉴定图

Figure 5 Identification of wild-type and mutants yeast expression vector by double enzyme digestion

注: M: Generay DL1004 DNA 分子量标准; 1-5: $xynB^{WT}$ 、 $xynB^{G66N/A68T}$ 、 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 、 $xynB^{D130N/N132T}$ 、 $xynB^{A92N/D94T}$ 。

Note: M: Generay DL1004 DNA marker; 1: $xynB^{WT}$; 2: $xynB^{G66N/A68T}$; 3: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$; 4: $xynB^{D130N/N132T}$; 5: $xynB^{A92N/D94T}$.

2.4 重组子的筛选

从 MD 固体平板上挑取部分单克隆进行试管培养 3 d 后, 离心收集上清, 各取 20 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 鉴定, 经考马斯亮蓝染色后如图 6 所示。将与对照泳道比较在 20–25 kD 之间多表达出蛋白条带的单克隆菌株作为阳性重组子。结果表明目标蛋白表达, 是否发生了 N-糖基化, 需要进行糖基化和 Western blotting 实验进一步确证。

2.5 糖基化鉴定和 Western blotting 验证

用 Endo H 对纯化浓缩后的野生型和突变体蛋白进行酶切处理, 经 SDS-PAGE 鉴定(图 7)结果显示: $xynB^{WT}$ 经 Endo H 酶切前后分子量大小不变, 说明 $xynB^{WT}$ 在表达过程中未发生 N-糖基化; $xynB^{A92N/D94T}$ 在 Endo H 酶切前存在 3 条蛋白条带, 经 Endo H 酶切后 3 条蛋白带分子量均减小了 2–3 kD, 说明 $xynB^{A92N/D94T}$ 在表达过程中发生了糖基化, 但是 $xynB^{A92N/D94T}$ 明显在表达或分泌过程中可能被毕赤酵母 SMD1168 表达的内源蛋白酶所降解, 所以分子量变小; $xynB^{D130N/N132T}$ 在 Endo H 酶切前后分子量大小不变, 说明 $xynB^{D130N/N132T}$ 在表达过程中未发生 N-糖基化, 且 $xynB^{D130N/N132T}$ 蛋白也发生了降解现象。 $xynB^{G66N/A68T}$ 在 Endo H 酶切前

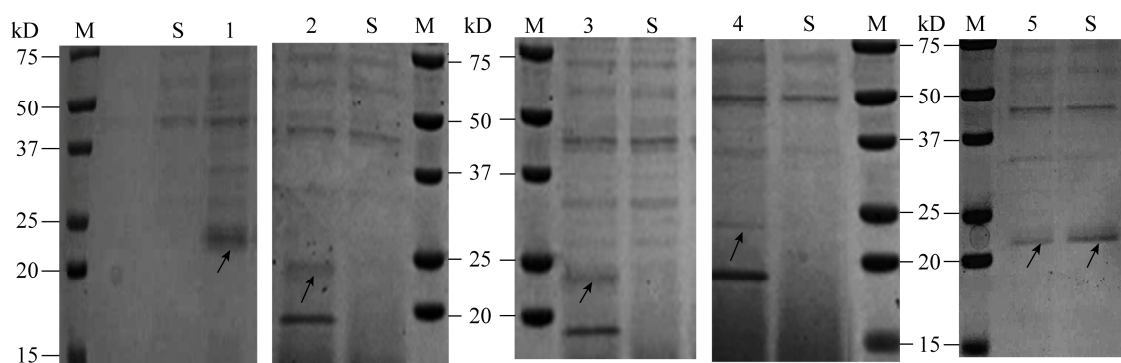


图6 目的蛋白 SDS-PAGE 鉴定图

Figure 6 The identification of target protein by SDS-PAGE

注: M: 伯乐双色蛋白质标准品; S: SMD1168 空载对照; 1: $xynB^{A92N/D94T}$; 2: $xynB^{D130N/N132T}$; 3: $xynB^{G66N/A68T}$; 4: $xynB^{WT}$; 5: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 。箭头所指蛋白条带为目标蛋白。

Note: M: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; S: SMD1168 control; 1: $xynB^{A92N/D94T}$; 2: $xynB^{D130N/N132T}$; 3: $xynB^{G66N/A68T}$; 4: $xynB^{WT}$; 5: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$. The protein band indicated by the arrow is target protein.

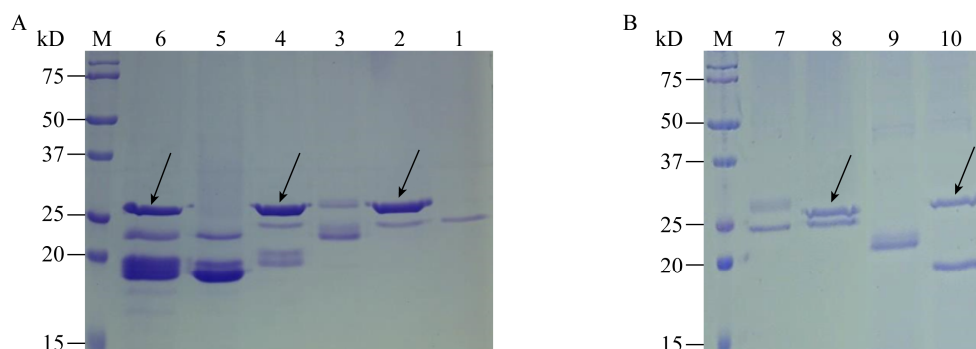


图 7 Endo H 酶切前后野生型和突变体酶的 SDS-PAGE 鉴定图(A 和 B)

Figure 7 SDS-PAGE identification of wild-type and mutant enzymes digested by Endo H (A and B)

注: M: 伯乐双色蛋白质标准品; 1: $xynB^{WT}$; 2: $xynB^{WT}$ 经 Endo H 酶切后产物; 3: $xynB^{A92N/D94T}$; 4: $xynB^{A92N/D94T}$ 经 Endo H 酶切后产物; 5: $xynB^{D130N/N132T}$; 6: $xynB^{D130N/N132T}$ 经 Endo H 酶切后产物; 7: $xynB^{G66N/A68T}$; 8: $xynB^{G66N/A68T}$ 经 Endo H 酶切后产物; 9: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$; 10: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 经 Endo H 酶切后产物. 箭头所指蛋白条带为 Endo H.

Note: M: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; 1: $xynB^{WT}$; 2: $xynB^{WT}$ digested by Endo H; 3: $xynB^{A92N/D94T}$; 4: $xynB^{A92N/D94T}$ digested by Endo H; 5: $xynB^{D130N/N132T}$; 6: $xynB^{D130N/N132T}$ digested by Endo H; 7: $xynB^{G66N/A68T}$; 8: $xynB^{G66N/A68T}$ digested by Endo H; 9: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$; 10: $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ digested by Endo H. The protein band indicated by the arrow is Endo H.

经 Endo H 酶切后分子量较大的条带分子量减小了约 2 kD, 而分子量较小的条带分子量不变, 说明 $xynB^{G66N/A68T}$ 发生了糖基化; $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 在 Endo H 酶切前有两条分子量接近的条带, 分子量约为 21 kD, 经 Endo H 酶切后分子量减少了 2–3 kD, 说明 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 发生了糖基化, 而且被降解了。综上所述, 4 个突变体中, 只有突变体 $xynB^{A92N/D94T}$ 、 $xynB^{G66N/A68T}$ 、 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 发生了 N-糖基化。为了进一步确证 Endo H 酶切前后的蛋白为目的蛋白以及酶切结果的准确性, 野生型和突变体蛋白经 Western blotting 实验验证, 结果如图 8 所示, Endo H 酶切前后的蛋白均为目的蛋白条带, 而且降解现象和 Endo H 酶切结果与 SDS-PAGE 鉴定的糖基化结果保持高度一致。

2.6 $xynB$ 野生型和突变体酶最适 pH 及最适温度的测定

如图 9A 所示, 野生型 $xynB^{WT}$ 与突变体 $xynB^{G66N/A68T}$ 、 $xynB^{A92N/D94T}$ 的最适 pH 为 5.0, 而突变体 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 的最适 pH 为 6.0。如图 9B 所示, 野生型 $xynB^{WT}$ 的最适温度为 50 °C,

而突变体酶 $xynB^{G66N/A68T}$ 、 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 和 $xynB^{A92N/D94T}$ 的最适温度为 40 °C。说明定向引入一个 N-糖基化位点后对突变体蛋白的最适 pH 和最适温度有一定的影响。

2.7 $xynB$ 野生型和突变体酶的 pH 稳定性分析

pH 稳定性测定结果如图 9C 所示, 整体上, 野生型和 3 个突变体蛋白均表现出宽范围的酸碱耐受性。野生型 $xynB^{WT}$ 在 pH 4.0–10.0 范围内的残留酶活保留在 80%以上; 突变体 $xynB^{A92N/D94T}$ 在 pH 4.0–11.0 范围内的残留酶活保留在 90%以上, 在 pH 4.0–6.0 和 pH 9.0–11.0 范围内的 pH 稳定性明显优于 $xynB^{WT}$; 突变体 $xynB^{G66N/A68T}$ 在 pH 5.0 时的 pH 稳定性优于 $xynB^{WT}$, 但在其他 pH 范围内的残留酶活只保留在 60%–80%; 突变体 $xynB^{G66F/D67N/G69T}$ 在 pH 9.0–10.0 范围的 pH 稳定性优于 $xynB^{WT}$, 但在其他 pH 范围内的残留酶活只保留在 60%–80%。说明定向引入一个 N-糖基化位点后对突变体蛋白的 pH 稳定性有一定的影响。

2.8 $xynB$ 野生型和突变体酶的温度稳定性分析

温度稳定性测定结果如图 9D 所示, 当温度高

于 40 °C 后, 野生型和突变体酶的残留酶活均随温度的升高而不断下降, 但突变体 $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$ 、 $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$ 和 $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$ 在温度为 60–80 °C 范围内的残留酶活均明显高于 xynB^{WT} , 尤其是在温度为 80 °C 时, 野生型 xynB^{WT} 的残留

酶活低于 10%, 而 $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$ 的残留酶活高于 25%, $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$ 的残留酶活高于 33%, $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$ 的残留酶活高于 35%。说明在 xynB 定向引入一个 N-糖基化位点能提高其热稳定性, 使其在高温条件下仍具有较高的酶活。

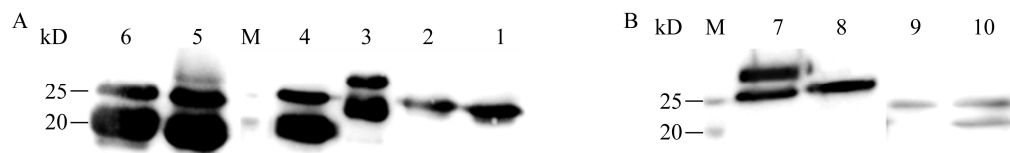


图 8 Endo H 酶切前后野生型和突变体酶的 Western blotting 鉴定图(A 和 B)

Figure 8 Western blotting identification of wild-type and mutant enzymes before and after Endo H digestion (A and B)

注: M: 伯乐双色蛋白质标准品; 1: xynB^{WT} ; 2: xynB^{WT} 经 Endo H 酶切后产物; 3: $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$; 4: $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$ 经 Endo H 酶切后产物; 5: $\text{xynB}^{\text{D130N/N132T}}$; 6: $\text{xynB}^{\text{D130N/N132T}}$ 经 Endo H 酶切后产物; 7: $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$; 8: $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$ 经 Endo H 酶切后产物; 9: $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$; 10: $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$ 经 Endo H 酶切后产物。

Note: M: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; 1: xynB^{WT} ; 2: xynB^{WT} digested by Endo H; 3: $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$; 4: $\text{xynB}^{\text{A92N/D94T}}$ digested by Endo H; 5: $\text{xynB}^{\text{D130N/N132T}}$; 6: $\text{xynB}^{\text{D130N/N132T}}$ digested by Endo H; 7: $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$; 8: $\text{xynB}^{\text{G66N/A68T}}$ digested by Endo H; 9: $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$; 10: $\text{xynB}^{\text{G66F/D67N/G69T}}$ digested by Endo H.

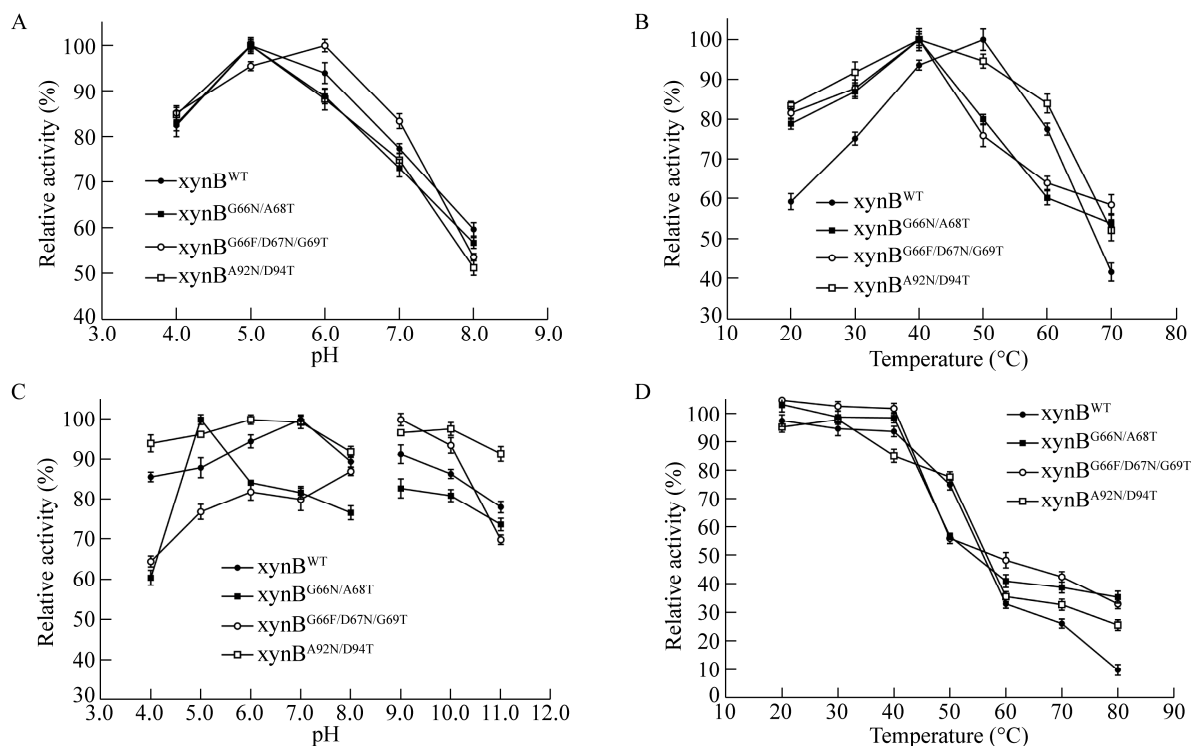


图 9 野生型和突变体酶酶学性质的表征

Figure 9 The characterization of enzymatic properties of wild-type and mutant enzymes

注: A: 野生型和突变体酶的最适 pH; B: 野生型和突变体酶的最适温度; C: 野生型和突变体酶的 pH 稳定性; D: 野生型和突变体酶的热稳定性。

Note: A: The optimal pH of wild-type and mutant enzymes; B: The optimal temperature of wild-type and mutant enzymes; C: The effect of pH on the stability of wild-type and mutant enzymes; D: The effect of temperature on the thermal stability of wild-type and mutant enzymes.

3 讨论与结论

本研究通过氨基酸虚拟突变技术对暴露在 xynB 结构表面的 β -转角和 Loop 区定向引入 N-糖基化位点, 筛选到了 5 个候选突变体, 经构建酵母表达载体和电转毕赤酵母 SMD1168 获得了 4 个突变体并成功表达出目的蛋白。经 Endo H 酶切和 Western blotting 实验进行糖基化鉴定后, 有 3 个突变体成功发生了糖基化, 分别是突变体 xynB^{G66N/A68T}、xynB^{G66F/D67N/G69T} 和 xynB^{A92N/D94T}。对野生型和突变体蛋白进行酶学性质分析发现, 野生型和 3 个突变体蛋白的 pH 稳定性均表现出宽范围的酸碱耐受性, 而且突变体 xynB^{A92N/D94T} 的酸碱耐受性要优于野生型 xynB^{WT}; 野生型和 3 个突变体蛋白的温度稳定性均随温度的升高而降低, 但 3 个突变体在温度为 60–80 °C 时的热稳定性均明显高于野生型 xynB^{WT}。由此可见, 在不影响 xynB 酶活的情况下, 在 xynB 结构的 β -转角或 Loop 区定向引入一个 N-糖基化位点有利于提高该酶的热稳定性。Nina 等^[20]和 Song 等^[21]研究表明糖苷水解酶 GH 11 家族维持其热稳定性的关键区域位于蛋白的 N 端。本研究突变体 xynB^{G66N/A68T} 和 xynB^{G66F/D67N/G69T} 分别在 Gly66、Asp67 位置引入 N-糖基化位点, 离蛋白的 N 端区域较近, 推测突变体 N-糖基化后形成的糖链分子增强了其 N 端结构的稳定性, 从而增强了其热稳定性, 而突变体 xynB^{A92N/D94T} 在 Ala92 位置引入 N-糖基化位点, 离蛋白的 N 端区域较远, 所以突变后热稳定性较突变体 xynB^{G66N/A68T} 和 xynB^{G66F/D67N/G69T} 差; 此外, 发现突变体 xynB^{G66N/A68T} 和 xynB^{G66F/D67N/G69T} 的温度稳定性变化趋势基本一致, 可能是因为这两个突变体的 N-糖基化位点只相差一个氨基酸, N-糖基化形成的糖链分子与周围氨基酸的相互作用差别不大, 所以温度稳定性变化趋势基本一致。目前已发现的木聚糖酶基因有 xynA、xynB、xynC、xynZ 等多种类型, 在 NCBI 核酸及蛋白质数据库中注册的来源于黑曲霉的 β -1,4-内切木聚糖酶有 13 种

以上, 加上来源于芽孢杆菌、节杆菌、肠杆菌等细菌及木霉、毛壳霉等其他真菌的 β -1,4-内切木聚糖酶更有数十个之多, 它们之间的酶学性质具有差异且各有优劣。N-糖基化可以影响蛋白质功能的多种性质, 而本研究只探讨了对酶热稳定性的影响, 未来可以探讨 N-糖基化对其他酶学性质的影响, 并选取在某些方面具有优良性质的野生型酶进行 N-糖基化改造, 筛选更具有多种优良酶学性质的突变酶。本文中只通过理性设计在 xynB 结构表面的 β -转角和 Loop 区引入 N-糖基化位点, 可选的候选突变序列较少, 可能限制了最优突变体的筛选, 因此后续可在本研究的基础上进一步探讨在 xynB 结构不同位置引入 N-糖基化位点对其酶学性质的影响。

微生物木聚糖酶在饲料、造纸、食品医药、能源等行业的应用非常广泛, 很多已经应用于工业化生产, 但由于其本身理化性质、稳定性等方面的问题, 限制了部分木聚糖酶在实际生产中的应用。本研究通过氨基酸虚拟突变技术, 在 xynB 的适当部位定向引入 N-糖基化位点, 提高了来源于黑曲霉的 xynB 的热稳定性, 该方法可为其他来源的 xynB 和其他工业酶的热稳定分子改造提供参考。

REFERENCES

- [1] Yue XY, He XY, Niu TG, et al. Research advance in xylanase[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007(4): 113-115,120 (in Chinese)
岳晓禹, 贺小营, 牛天贵, 等. 木聚糖酶的研究进展[J]. 酿酒科技, 2007(4): 113-115,120
- [2] She YL, Li XT, Song HL, et al. Research advance in microorganism xylanases[J]. China Brewing, 2009(2): 1-4 (in Chinese)
余元莉, 李秀婷, 宋焕禄, 等. 微生物木聚糖酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2009(2): 1-4
- [3] Xu JF, Zhang JZ. Research advances in microbial endo-1, 4- β -xylanase[J]. China Brewing, 2014, 33(5): 15-17 (in Chinese)
徐君飞, 张居作. 微生物 β -1,4-内切木聚糖酶研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(5): 15-17

- [4] Cong QQ, Jiang ZQ, Lv SY, et al. Identification of *Chaetomium* sp. CQ31 and optimization of xylanase production in solid state fermentation[J]. Microbiology China, 2009, 36(8): 1269-1274 (in Chinese)
丛倩千, 江正强, 吕顺意, 等. 毛壳霉 CQ31 的鉴定及固体发酵产木聚糖酶条件的优化[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1269-1274
- [5] Niu CF, Luo HY, Shi PJ, et al. N-glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(4): 1004-1014
- [6] Fu B, Baker MR, Li QX. Effect of N-linked glycosylation of recombinant windmill palm tree peroxidase on its activity and stability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(17): 4414-4421
- [7] Chang XY, Xu B, Bai YG, et al. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171111
- [8] Luo ZC, Miao J, Li GY, et al. Effect of N-glycosylation on the stability of a novel recombinant thermostable β -mannanase (ReTMan26)[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 11-19 (in Chinese)
罗长财, 缪静, 李国莹, 等. N-糖基化对一种新型重组耐高温 β -甘露聚糖酶(ReTMan26)稳定性的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 11-19
- [9] Wang XY. The effect of N-glycosylation design on the structure and properties of β -glucuronidase[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2016 (in Chinese)
王小艳. 糖基化设计对 β -葡萄糖醛酸苷酶结构和性能的影响[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2016
- [10] Hu WX, Liu XY, Li YF, et al. Rational design for the stability improvement of *Armillariella tabescens* β -mannanase MAN47 based on N-glycosylation modification[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 97: 82-89
- [11] Gao H, Yan P, Zhang BR, et al. Expression of *Aspergillus niger* IA-001 endo- β -1,4-xylanase in *Pichia pastoris* and analysis of the enzymic characterization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(8): 2028-2041
- [12] Kowarik M, Young NM, Numao S, et al. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(9): 1957-1966
- [13] Chen WT, Kong L, Connelly S, et al. Stabilizing the CH2 domain of an antibody by engineering in an enhanced aromatic sequon[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(7): 1852-1861
- [14] Culyba EK, Price JL, Hanson SR, et al. Protein native-state stabilization by placing aromatic side chains in N-glycosylated reverse turns[J]. Science, 2011, 331(6017): 571-575
- [15] Price JL, Powers DL, Powers ET, et al. Glycosylation of the enhanced aromatic sequon is similarly stabilizing in three distinct reverse turn contexts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(34): 14127-14132
- [16] Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, et al. The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency[J]. Biochemistry, 1998, 37(19): 6833-6837
- [17] Wang XD, Guo LQ, Zhao LC, et al. Assay methods and unit definitions of xylanase activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(9): 128-131 (in Chinese)
王晓丹, 郭丽琼, 赵力超, 等. 木聚糖酶活性测定方法及酶活性单位定义[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 128-131
- [18] Yang YL. Study on optimum conditions of *Aspergillus niger* C3486 solid state fermentation to produce xylanase[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science), 2005, 26(5): 93-94, 101 (in Chinese)
杨燕凌. 木聚糖酶固体发酵条件的试验[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2005, 26(5): 93-94, 101
- [19] Liu C, Sun ZT, Tian LM, et al. Study on some enzymatic characteristics and solid-phase fermentation condition of xylanase from *Aspergillus niger*[J]. Biotechnology, 2007, 17(4): 82-85 (in Chinese)
刘成, 孙中涛, 田林茂, 等. 黑曲霉产木聚糖酶固态发酵条件及部分酶学性质的研究[J]. 生物技术, 2007, 17(4): 82-85
- [20] Nina H, Ossi T, Janne JN, et al. Three-dimensional structures of thermophilic β -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(7): 1399-1412
- [21] Song LT, Dumon C, Siguier B, et al. Impact of an N-terminal extension on the stability and activity of the GH11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 174: 64-72