

# 重组大肠杆菌高效分泌表达 $\beta$ -木糖苷酶 发酵条件的优化

陈洲<sup>1</sup> 贾会勇<sup>2</sup> 闫巧娟<sup>1</sup> 杨绍青<sup>2</sup> 滕超<sup>2</sup> 江正强<sup>2\*</sup>

(1. 中国农业大学 工学院 北京 100083)

(2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

**摘 要:** 【目的】嗜热拟青霉  $\beta$ -木糖苷酶基因在大肠杆菌中高效分泌表达重组  $\beta$ -木糖苷酶摇瓶发酵条件优化, 及 5 L 发酵罐放大培养。【方法】通过单因素试验对诱导剂种类及其添加量、诱导起始  $OD_{600}$ 、培养温度、培养时间进行优化研究。【结果】摇瓶优化结果表明: 2%乳糖为诱导剂、培养温度为 33 °C、 $OD_{600}$ 控制在 0.8–0.9 时诱导为最佳产酶条件, 在此条件下培养 48 h 后胞外酶活达到 103.9 U/mL, 胞外分泌的比例高达 99% 以上。进行 5 L 发酵罐放大培养, 发酵 48 h 胞外酶活达到最高值 392.5 U/mL, 蛋白含量为 10.1 g/L。【结论】该重组大肠杆菌高效分泌  $\beta$ -木糖苷酶, 具有较好的工业化生产前景。

**关键词:**  $\beta$ -木糖苷酶, 胞外分泌, 大肠杆菌, 表达优化

## Optimization of fermentation conditions of recombinant $\beta$ -xylosidase extracellularly expressed in *E. coli*

CHEN Zhou<sup>1</sup> JIA Hui-Yong<sup>2</sup> YAN Qiao-Juan<sup>1</sup> YANG Shao-Qing<sup>2</sup>

TENG Chao<sup>2</sup> JIANG Zheng-Qiang<sup>2\*</sup>

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** [Objective] The fermentation conditions for production of recombinant

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(No. 2010GB23600652)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62737689; 信箱: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-04-20; 接受日期: 2012-07-19

$\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila* expressed in *E. coli* were optimized and produced in a 5 L fermentor. [Methods] Single factor experiments were used to investigate the effect of different inducers and their concentrations, initial cell density, cultivation temperature and time on the expression of recombinant  $\beta$ -xylosidase. [Results] The results showed that the  $\beta$ -xylosidase could be induced by IPTG and lactose, lactose was better than that of IPTG. Under the optimal conditions by adding 2% lactose at a initiated  $OD_{600}$  of 0.8–0.9 and incubation for 48 h at 33 °C, the ratio of extracellular enzyme reached over 99% and enzyme activity was 103.9 U/mL. Further optimization of the culture conditions were performed in 5 L fermentor, the highest  $\beta$ -xylosidase activity of 392.5 U/mL and extracellular protein concentration of 10.1 g/L were obtained after 48 h. [Conclusion] The recombinant  $\beta$ -xylosidase with high level production will be useful in various industrial applications.

**Keywords:**  $\beta$ -Xylosidase, Extracellular, *Escherichia coli*, Expression optimization

$\beta$ -木糖苷酶( $\beta$ -D-xylosidase, EC 3.2.1.37)是木聚糖降解酶系的一种,是可以作用于较低聚合度木寡糖的非还原性末端生成木糖的一种酶类<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -木糖苷酶能够与木聚糖酶等协同降解木聚糖生产木糖,在水解过程中  $\beta$ -木糖苷酶可以降低木聚糖水解产物的聚合度,较大程度地解除产物对木聚糖酶的抑制,是木聚糖水解过程中的限速酶<sup>[2]</sup>。目前, $\beta$ -木糖苷酶在能源、造纸<sup>[3–4]</sup>、医药<sup>[5]</sup>等多方面具有广泛的应用前景。

$\beta$ -木糖苷酶的来源广泛,主要包括细菌、真菌(包括酵母)等微生物和高等植物。目前微生物发酵产  $\beta$ -木糖苷酶的研究主要集中于国外,所报道的  $\beta$ -木糖苷酶一般为胞内酶<sup>[6]</sup>,少数真菌也能产胞外  $\beta$ -木糖苷酶,国内外报道的菌株有: *Aspergillus sydowii*、*Talaromyces thermophilus*、*Talaromyces thermophilus*、*Paecilomyces thermophila*、曲霉(*Aspergillus*),但其中产酶能力较高的也仅有 45 U/mL,且天然微生物所分泌的酶存在纯化过程复杂等问题<sup>[4,7–10]</sup>。因此,利用基因工程手段获得高产  $\beta$ -木糖苷酶工程菌株是解决上述问题的一条途径。迄今,已有关于  $\beta$ -木糖苷酶表达的研究,如菌株 *Fusarium graminearum*、*Bacillus*

*halodurans*、*Thermonanaerobacter ethanolicus* 的  $\beta$ -木糖苷酶基因被克隆到大肠杆菌中,产酶水平均低于 2 U/mL。重组  $\beta$ -木糖苷酶的纯化步骤明显优越于天然菌株,但目前研究中的大肠杆菌所表达的重组酶多为胞内酶,纯化过程中需要冻融破壁等前处理,在生产和应用中仍受到很大的限制<sup>[11–13]</sup>。本研究室已成功将嗜热拟青霉(*P. thermophila*) J18  $\beta$ -木糖苷酶基因克隆至大肠杆菌中,发现其能够分泌表达胞外  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[14]</sup>。本文研究其摇瓶发酵产酶条件,并进一步采用 5 L 发酵罐进行放大培养,为将来的工业化生产和应用提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和材料

丙烯酰胺、甘氨酸, Biomol 公司产品; 低分子量标准蛋白样品, Sigma 公司产品; 酵母提取物、胰蛋白胨, 英国 Oxoid 公司产品; 其他试剂若无特殊说明均为分析纯。

### 1.2 菌种来源及其培养方法

**1.2.1 菌种来源:**  $\beta$ -木糖苷酶基因来源于嗜热拟青霉(*P. thermophila*) J18, *E. coli* JM109、*E. coli*

BL21 以及 pMD-18T、pET-30a 均为实验室保存, 重组大肠杆菌由本实验室构建<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 菌种活化:** -70 °C 甘油管冻存的工程菌划线接种于 LB (含 50 mg/L 卡纳霉素) 固体琼脂平板上, 37 °C 恒温培养 12 h, 挑取单菌落接种于装有 20 mL LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 恒温振荡培养过夜(约 12 h)。

**1.2.3 发酵培养:** 将活化的菌种以 1% 的接种量接种到装有 LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡纳霉素)的摇瓶中, 37 °C、200 r/min 恒温振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6–1.0, 加入诱导剂诱导产酶, 培养 48 h 后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液及菌体。

胞外蛋白及酶液收集: 直接取离心上清液测定蛋白含量及  $\beta$ -木糖苷酶酶活。

胞内蛋白及酶液收集: 用 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液洗涤菌体 3 次, 加入与发酵液等体积的缓冲液, 均匀悬浮菌体, 超声波破碎菌体后离心收集上清液, 测定蛋白含量及  $\beta$ -木糖苷酶酶活。

周质蛋白的提取采用渗透压休克法<sup>[15]</sup>: 取菌体 1 g, 用 10 mL 含 20% 蔗糖的 10 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 为 8.0)充分悬浮, 4 °C 静置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 再用 10 mL、10 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 为 8.0)悬浮, 4 °C 静置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清即为周质蛋白。

### 1.3 菌体密度、 $\beta$ -木糖苷酶酶活及蛋白含量测定

菌体密度( $OD_{600}$ )值测定: 将菌液稀释适当倍数后在 600 nm 下测定吸光值,  $OD_{600}$ =吸光值×稀释倍数。

$\beta$ -木糖苷酶酶活测定方法参照 Lacke 的方法<sup>[16]</sup>: 200  $\mu$ L 用 50 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液配制的 5 mmol/L 底物(pNP-X) 在 55 °C 预热

3 min, 加入 50  $\mu$ L 适当稀释的酶液, 反应 10 min, 再加入 750  $\mu$ L 2 mol/L 碳酸钠溶液终止反应, 冷却后测定  $A_{410}$ , 以 pNP 为标准计算酶活力。酶活力的单位定义为: 在上述条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol pNP 所需要的酶量。

蛋白含量测定参照 Lowery 等的方法<sup>[17]</sup>, 以牛血清蛋白作为标准蛋白。

胞外酶活性(蛋白)比例测定: 胞外酶活性(蛋白)占全酶活性(蛋白)的比例。

### 1.4 摇瓶发酵产酶条件的优化

采用单因素实验优化摇瓶发酵条件, 首先考察诱导剂对产酶的影响, 研究了诱导剂种类及其添加量(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%)。接着研究培养温度(30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C)对产酶的影响。进一步考察诱导时起始菌体密度  $OD_{600}$  (0.2–3.0)对产酶的影响。在单因素优化的基础上, 选择最优培养条件培养 72 h 研究摇瓶发酵产酶历程。

### 1.5 发酵罐(5 L)放大培养实验

在摇瓶发酵条件的基础上采用 5 L 发酵罐进行放大培养。在装有 3 L 发酵培养基的发酵罐中接入 1% 的种子液(含浓度为 50 mg/L 的卡纳霉素), 37 °C、450 r/min 条件下培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 加入终浓度为 2% 的乳糖诱导培养, 60 h 后终止培养。培养过程中用 1% NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导剂对重组大肠杆菌摇瓶发酵产 $\beta$ -木糖苷酶的影响

两种常用诱导剂(IPTG、乳糖)影响重组大肠杆菌摇瓶发酵产  $\beta$ -木糖苷酶的结果见表 1。乳糖诱导产酶的效果明显优于 IPTG, 因此选定乳糖为诱导剂。进一步研究乳糖添加量对发酵产酶的影响, 如图 1 所示。当乳糖添加量为 2% 时的产酶水平最高, 胞外酶活为 58.1 U/mL、胞外蛋白含量

表 1 不同诱导剂(IPTG、乳糖)对发酵产胞外  $\beta$ -木糖苷酶的影响  
Table 1 Effect of different inducers on expression of extracellular  $\beta$ -xylosidase

诱导剂 Inducer	诱导剂浓度 Inducer concentration	胞外酶活 Extracellular enzyme activity (U/mL)	胞内酶活 Intracellular enzyme activity (U/mL)	胞外蛋白浓度 Extracellular protein concentration (g/L)	胞内蛋白浓度 Intracellular protein concentration (g/L)	OD <sub>600</sub>
IPTG (mmol/L)	0	0	0	0.17±0.02	0.93±0.03	2.07±0.03
	0.05	20.8±0.2	5.3±0.2	0.42±0.01	0.15±0.02	1.09±0.05
	0.1	22.1±0.4	6.1±0.3	0.51±0.02	0.16±0.01	1.26±0.04
	0.5	18.5±0.7	4.3±0.1	0.32±0.01	0.15±0.01	1.34±0.04
	1	11.2±0.5	3.2±0.1	0.23±0.01	0.12±0.02	1.45±0.05
L-lactose (%)	0	0	0	0.17±0.02	0.93±0.03	2.07±0.03
	0.5	43.8±3.8	5.1±0.9	1.53±0.13	0.62±0.05	1.93±0.80
	1	50.3±2.7	6.1±0.7	1.77±0.13	0.73±0.06	4.35±0.11
	2	58.1±1.8	8.2±0.4	1.85±0.12	1.22±0.14	8.60±0.36

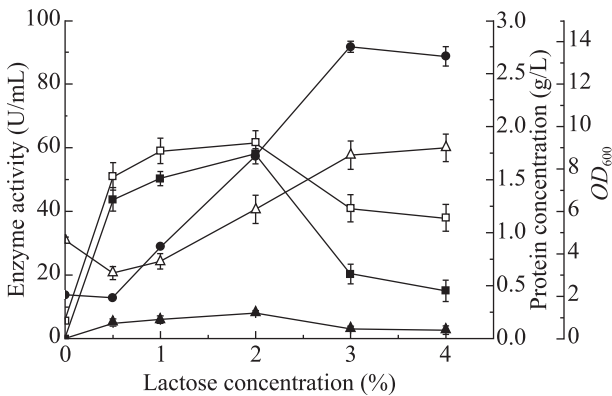


图 1 乳糖浓度对  $\beta$ -木糖苷酶及蛋白分泌量的影响  
Fig. 1 Effect of L-lactose concentration on expression of  $\beta$ -xylosidase and protein

注: ●: OD<sub>600</sub>; ■: 胞外酶活; □: 胞外蛋白含量; ▲: 胞内酶活; △: 胞内蛋白含量。  
Note: ●: OD<sub>600</sub>; ■: Extracellular enzyme activity; □: Extracellular protein concentration; ▲: Intracellular enzyme activity; △: Intracellular protein concentration.

为 1.85 g/L, 且胞外酶活性比例可达 98% 以上, 胞外蛋白比例可达 40%–70%。不同诱导剂对菌体密度的影响很大, 以乳糖作为诱导剂时菌体密度明显高于 IPTG, 另外随着乳糖浓度的增加菌体密度持续增加, 至添加量为 3% 时 OD<sub>600</sub> 达到 13.7。

图 2 显示的是以不同诱导剂及不同浓度乳糖进行诱导时所得发酵液、菌体破碎上清液及菌体

破碎沉淀的蛋白分泌情况, 该工程菌株所产  $\beta$ -木糖苷酶的蛋白分子量大小为 52.3 kD<sup>[14]</sup>, 从图中可以清楚看出目标蛋白在不同诱导条件下绝大部分蛋白都分泌到了发酵液中, 进一步证明了胞外酶活、蛋白占有较大比例的特点。

IPTG 具有一定生理毒性, 尤其高浓度的 IPTG 在菌体量稀少的情况下对目标蛋白表达的抑制效果明显<sup>[18]</sup>。相反, 乳糖除可以作为诱导剂外, 还可作为碳源被菌利用, 使菌体密度明显较高, 这可能是导致酶活高于以 IPTG 为诱导剂的原因。

乳糖添加量达到 2% 后, 继续添加乳糖胞外酶的表达量较大程度地降低, 可能是由于乳糖浓度的增加促进了大肠杆菌自身  $\beta$ -半乳糖苷酶的分泌且将乳糖分解成了葡萄糖和半乳糖, 葡萄糖的含量增加, 引起了葡萄糖效应, 从而抑制胞外酶的表达。

2.2 培养温度对重组大肠杆菌摇瓶发酵产  $\beta$ -木糖苷酶的影响

培养温度影响重组大肠杆菌摇瓶发酵产  $\beta$ -木糖苷酶的结果见图 3。胞外酶活、蛋白含量在培

养温度为 33 °C 时达到最大, 继续升高温度胞外酶活及蛋白含量均有所降低。从图 3 还可以看出在各个培养温度下的胞外酶活性比例都在 99% 以上, 胞外蛋白比例均维持在 60% 左右。

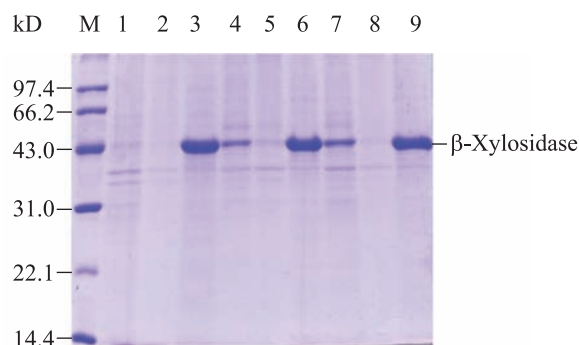


图 2 不同诱导条件诱导各部位分泌蛋白 SDS-PAGE  
Fig. 2 SDS-PAGE of intracellular, precipitation and extracellular proteins produced by *E. coli*

注: M: 低分子量标准蛋白; 1-3: 0.1 mmol/L IPTG 诱导时胞内、菌体破碎沉淀、胞外蛋白; 4-6: 1% 乳糖诱导胞内、菌体破碎沉淀、胞外蛋白; 7-9: 2% 乳糖诱导胞内、菌体破碎沉淀、胞外蛋白。

Note: M: Low molecular weight protein makers; 1-3: Intracellular, precipitation and extracellular protein induced by 0.1 mmol/L IPTG; 4-6: Intracellular, precipitation and extracellular protein induced by 1% lactose; 7-9: Intracellular, precipitation and extracellular protein induced by 2% lactose.

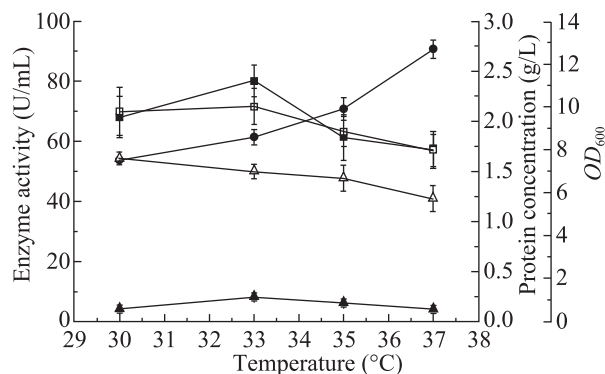


图 3 培养温度对  $\beta$ -木糖苷酶及蛋白分泌量的影响  
Fig. 3 Effect of cultivation temperature on expression of  $\beta$ -xylosidase and protein

注: ●:  $OD_{600}$ ; ■: 胞外酶活; □: 胞外蛋白含量; ▲: 胞内酶活; △: 胞内蛋白含量。

Note: ●:  $OD_{600}$ ; ■: Extracellular enzyme activity; □: Extracellular protein concentration; ▲: Intracellular enzyme activity; △: Intracellular protein concentration.

本工程菌株摇瓶发酵产酶条件受培养温度的影响较为明显, 在较高的培养温度下菌株生长速率加快, 菌体密度增长显著, 但同时也加快了副产物的代谢, 抑制了目的产物的表达, 因此适当降低培养温度(33 °C)有利于目标产物的表达。

## 2.3 诱导时机(起始 $OD_{600}$ 值)对重组大肠杆菌摇瓶发酵产 $\beta$ -木糖苷酶的影响

合适的诱导时机可以促进  $\beta$ -木糖苷酶的表达, 能够实现胞外酶的积累。诱导时机影响重组大肠杆菌摇瓶发酵产  $\beta$ -木糖苷酶的结果见图 4。当控制菌体密度  $OD_{600}$  在 0.8-2.4 之间进行诱导时可以达到较好的诱导效果(胞外酶活高于 90 U/mL), 其中以  $OD_{600}$  控制在 0.8-0.9 时胞外酶活及胞外蛋白含量相对较高。在上述诱导条件下胞外酶活性比例可达到 99% 以上。从图 4 还可看出不同诱导时机下诱导发酵, 至发酵终点时菌体的生长密度变化不大。

## 2.4 培养时间对重组大肠杆菌摇瓶发酵产 $\beta$ -木糖苷酶的影响

培养时间影响重组大肠杆菌摇瓶发酵产  $\beta$ -木

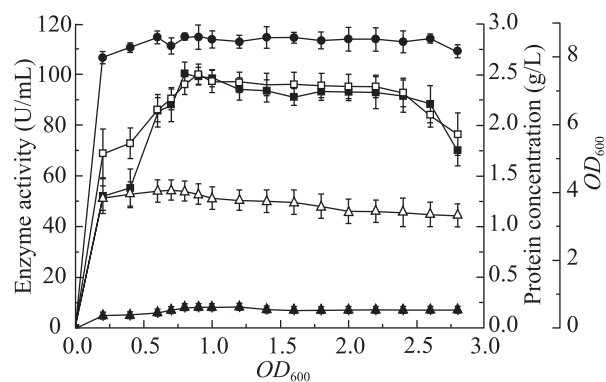


图 4 诱导时起始  $OD_{600}$  值对  $\beta$ -木糖苷酶及蛋白分泌量的影响

Fig. 4 Effect of initial  $OD_{600}$  of induction on expression of  $\beta$ -xylosidase and protein

注: ●:  $OD_{600}$ ; ■: 胞外酶活; □: 胞外蛋白含量; ▲: 胞内酶活; △: 胞内蛋白含量。

Note: ●:  $OD_{600}$ ; ■: Extracellular enzyme activity; □: Extracellular protein concentration; ▲: Intracellular enzyme activity; △: Intracellular protein concentration.

糖苷酶的结果见图 5。培养初期胞外酶活、蛋白含量随培养时间的延长迅速增加, 至 24 h 时增长趋缓, 但增长趋势依然明显, 至 48 h 时胞外酶活及蛋白含量达到最大, 分别为 103.9 U/mL 和 2.5 g/L, 且胞外酶活性比例高达 99% 以上。菌体密度呈现逐渐上升的趋势, 发酵至 48 h 时保持平稳, 此时  $OD_{600}$  为 8.4。

与其他研究相比<sup>[19]</sup>, 本研究中的工程菌产酶周期稍长。可能原因是: 重组酶胞外酶活性比例很高, 可能存在自胞内到胞外逐渐分泌的过程, 延长了分泌时间。图 6 显示的是该工程菌在发酵过程中胞内、细胞周质及胞外蛋白的 SDS-PAGE 变化趋势, 可以看出胞内及细胞周质的蛋白含量随着发酵时间的延长逐渐减少, 胞外蛋白含量却呈现递增的趋势, 进一步反映了该工程菌所表达的蛋白可能呈现自胞内分泌至细胞周质, 进一步逐渐分泌至胞外的过程, 也为该工程菌株的产酶机制提供了有力的依据。另外, 培养温度为 33 °C 稍低于一般大肠杆菌发酵的 37 °C, 可能影响菌体的生产传代进而影响其产酶周期。

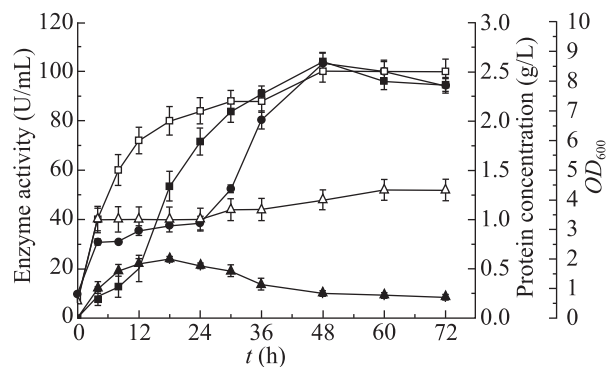


图 5 培养时间对  $\beta$ -木糖苷酶及蛋白分泌量的影响  
Fig. 5 Effect of incubation time on expression of  $\beta$ -xylosidase and protein

注:  $\bullet$ :  $OD_{600}$ ;  $\blacksquare$ : 胞外酶活;  $\square$ : 胞外蛋白含量;  $\blacktriangle$ : 胞内酶活;  $\triangle$ : 胞内蛋白含量。

Note:  $\bullet$ :  $OD_{600}$ ;  $\blacksquare$ : Extracellular enzyme activity;  $\square$ : Extracellular protein concentration;  $\blacktriangle$ : Intracellular enzyme activity;  $\triangle$ : Intracellular protein concentration.

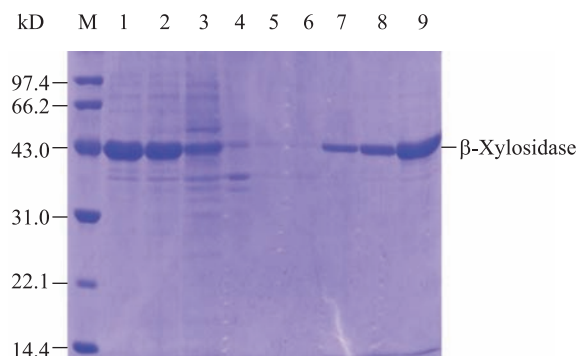


图 6 工程菌各部位分泌蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 6 SDS-PAGE of intracellular, periplasmic and extracellular proteins produced by *E. coli*

注: M: 低分子量标准蛋白; 1-3: 发酵 12、24、48 h 时的胞内蛋白; 4-6: 发酵 12、24、48 h 时的周质蛋白; 7-9: 发酵 12、24、48 h 时的胞外蛋白。

Note: M: Low molecular weight protein standards; 1-3: Intracellular protein, 12, 24 and 48 hours, respectively; 4-6: Periplasm protein, 12, 24 and 48 hours, respectively; 7-9: Extracellular protein 12, 24 and 48 hours, respectively.

## 2.5 重组大肠杆菌 5 L 发酵罐放大培养

重组大肠杆菌 5 L 发酵罐放大培养的结果显示该重组大肠杆菌在培养至 48 h 时发酵液酶活最高, 酶活为 392.5 U/mL, 胞外蛋白浓度为 10.1 g/L, 如图 7 所示。培养 4-8 h 时菌体生长速率最大, 菌体密度( $OD_{600}$ )迅速由 6.5 提高到 16.2,

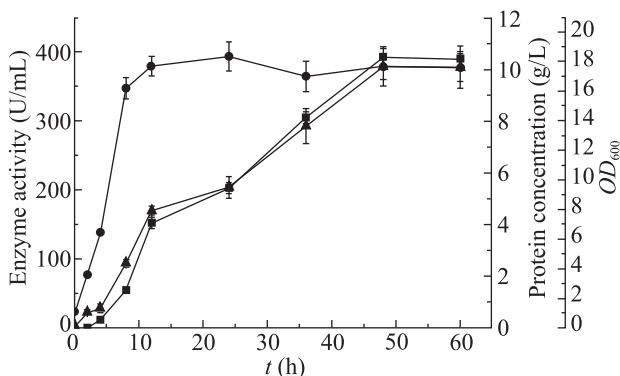


图 7 培养时间对发酵罐产  $\beta$ -木糖苷酶的影响

Fig. 7 Effect of cultivation time on expression of  $\beta$ -xylosidase in fermentor

注:  $\bullet$ :  $OD_{600}$ ;  $\blacksquare$ : 胞外酶活;  $\blacktriangle$ : 胞外蛋白含量。

Note:  $\bullet$ :  $OD_{600}$ ;  $\blacksquare$ : Extracellular enzyme activity;  $\blacktriangle$ : Extracellular protein concentration.



增长了近 2.5 倍,同时胞外酶酶活也由 4 h 的 55.0 U/mL 迅速增长至 152.3 U/mL。而后菌体密度逐渐趋于平稳但胞外酶活及蛋白含量继续增加。

由图 7 可知,胞外酶活与胞外蛋白增长趋势几乎一致,该工程菌所分泌的胞外蛋白几乎为目标蛋白。图 8 显示的是工程菌所产的胞外酶随时间变化的 SDS-PAGE 图谱,可以明显看出该工程菌随培养时间的增加,胞外酶的积累越来越多,进一步证明上述结果。

目前国内外已有一些关于天然菌株及基因工程菌株产  $\beta$ -木糖苷酶的研究,但所报道的产酶水平普遍较低,很大程度上限制了大规模的工业生产<sup>[4,7-13]</sup>。嗜热拟青霉(*P. thermophila*) J18 具有产  $\beta$ -木糖苷酶的能力,但优化摇瓶发酵条件后酶活仅有 3.15 U/mL<sup>[9]</sup>。进一步采用基因工程手段成功将其  $\beta$ -木糖苷酶基因克隆至大肠杆菌中,发现能够分泌表达,优化其产酶条件发现能够以无毒、廉价的乳糖为诱导剂高效分泌表达  $\beta$ -木糖苷酶,摇瓶发酵条件优化后胞外酶活为 103.9 U/mL,远高于嗜热拟青霉(*P. thermophila*) J18 的产酶水

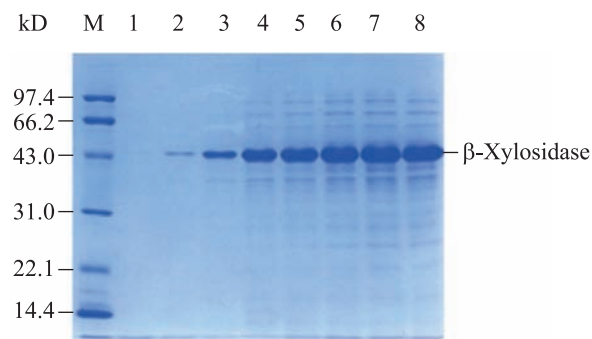


图 8 工程菌在发酵罐中产  $\beta$ -木糖苷酶随时间变化的 SDS-PAGE

Fig. 8 SDS-PAGE of the crude  $\beta$ -xylosidase produced in fermentor by *E. coli*

注: M: 低分子量标准蛋白; 1-8: 发酵 2、4、8、12、24、36、48、60 h 时的胞外蛋白。

Note: M: Low molecular weight calibration standard protein makers; 1-8: Extracellular protein after 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 and 60 h, respectively.

平,且胞外酶比例高达 99.0%以上,较高的产酶水平及其较强的胞外分泌能力将有利于该菌株在工业生产中的扩大应用。本研究进一步采用 5 L 发酵罐放大培养,发酵 48 h 胞外酶活达到 392.5 U/mL,蛋白浓度高达 10.1 g/L,为迄今报道分泌表达胞外  $\beta$ -木糖苷酶最高值。

### 3 结论

嗜热拟青霉(*P. thermophila*) J18 的  $\beta$ -木糖苷酶基因在大肠杆菌中成功表达,能够以乳糖为诱导剂高效分泌表达  $\beta$ -木糖苷酶,在最优培养条件下发酵培养,摇瓶发酵的胞外酶活最高为 103.9 U/mL,胞外酶比例高达 99.0%以上,5 L 发酵罐发酵的胞外酶活最高为 392.5 U/mL,蛋白浓度为 10.1 g/L,具有很大的工业化生产前景。

### 参考文献

- [1] Rasmusse LE, Sorensen HR, Vind J, et al. Mode of action and properties of the  $\beta$ -xylosidases from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(5): 869-876.
- [2] 江正强,杨绍青,朱会芳,等.嗜热拟青霉木糖苷酶的性质及其与木聚糖酶的协同作用[J].食品与发酵工业,2008,34(7): 12-16.
- [3] 毛连山,尤纪雪,宋向阳,等.内切木聚糖酶与木糖苷酶预处理对麦草浆漂白性能的影响[J].林产化学与工业,2003,23(2): 7-11.
- [4] Lenartovicz V, de Souza CG, Moreira FG, et al. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable  $\beta$ -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(12): 1775-1780.
- [5] Patel RN. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis[J]. Annual Review of Microbiology, 1998, 52: 361-395.
- [6] Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, et al.

- Xylanases from fungi: properties and industrial applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(5): 577–591.
- [7] Tuncer M, Ball AS, Rob A, et al. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(1/2): 38–47.
- [8] Guerfali M, Gargouri A, Belghith H. *Talaromyces thermophilus*  $\beta$ -D-xylosidase: purification, characterization and xylobiose synthesis[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2008, 150(3): 267–279.
- [9] 王岚, 江正强, 杨绍青. 嗜热拟青霉产胞外木糖苷酶发酵条件的优化[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 519–523.
- [10] 关宏. *Aspergillus* sp. 1-13菌株  $\beta$ -木糖苷酶的提纯和部分性质[J]. *齐齐哈尔大学学报*, 2002, 18(2): 7–9.
- [11] Carapito R, Carapito C, Jeltsch JM, et al. Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 845–850.
- [12] 梁艳丽, 李兴玉, Hyundong S, 等. 嗜碱芽孢杆菌 C-125木糖苷酶基因的表达与酶特征鉴定[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1386–1393.
- [13] Mai V, Wiegel J, Lorenz WW. Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. *Gene*, 2000, 247(1/2): 137–143.
- [14] Teng C, Jia HY, Yan QJ, et al. High-level expression of extracellular secretion of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1822–1830.
- [15] 李振国, 徐明波, 牛罡, 等. 大肠杆菌周质蛋白提取工艺的研究[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(6): 95–97.
- [16] Lacke AH. 1,4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 160: 679–684.
- [17] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265–275.
- [18] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer[J]. *Journal of Biotechnology*, 1988, 60(1/2): 47–54.
- [19] 宋筱龄, 范立强, 容智凤, 等. 重组超氧化物歧化酶1/3杂合酶在大肠杆菌中表达的优化[J]. *食品与药品*, 2008, 10(11): 8–11.