

嗜热裂孢菌木聚糖酶在毕赤酵母中的表达及酶学性质

卢桂义¹, 邬敏辰², 黄卫宁^{1*}, 张 峦³, 李 宁³, Courtin Christopher³

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 3. 南京百合贝可生物科技有限公司, 江苏 南京 210000)

摘要: 将优化后的来自嗜热裂孢菌的木聚糖酶基因在毕赤酵母中进行异源表达并分析了其表达产物的酶学性质。对来源于嗜热裂孢菌的木聚糖酶基因催化域进行密码子优化, 人工合成优化后的木聚糖酶成熟肽基因 *xy111^M*, 构建重组表达质粒 pPIC9K-*xy111^M*, 将其经 *Sal* I 线性化后电击转化毕赤酵母 GS115, 经 G418 筛选得到重组工程菌 GS115/*xy111^M*, 甲醇诱导表达重组蛋白。表达的重组蛋白 reXyl11^M 经 SDS-PAGE 分析, 其相对分子质量约 34 000, 酶活性可达到 105.3 U/mL, 最适反应温度为 70 °C, 并在 30~75 °C 温度内较稳定; 最适反应 pH 为 6.0, 在 pH 6.5~7.5 范围内稳定; Co²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、Li⁺ 对酶活性有强烈的激活作用, Fe³⁺ 有明显的抑制作用, 其它金属离子及 EDTA 对 reXyl11^M 酶活性影响不大。结果表明 *xy111^M* 成功在毕赤酵母 GS115 中实现表达, 且 reXyl11^M 的酶学特性优良。

关键词: 耐热木聚糖酶; 毕赤酵母; 合成基因; 基因表达; 酶学性质

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)05—0492—06

Expression of A Xylanase from *Thermobifide fusca* in *Pichia pastoris* And Its Characterization AnalysisLU Guiyi¹, WU Minchen², HUANG Weining^{1*}, ZHANG Luan², LI Ning³, Courtin Christopher³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Nanjing BaihoBake Biotechnology International, Inc. Nanjing 210000, China)

Abstract: A codon-optimized mature peptide gene encoding a thermostable xylanase from *Thermobifide fusca* has been cloned into the expression plasmid pPIC9K and named as pPIC9K-*xy111^M*. The pPIC9K-*xy111^M* was linearized with *Sal* I and integrated into the genome of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant *P. pastoris* GS115/*xy111^M* was screened by G418 and then was induced with methanol to express reXyl11^M. The reXyl11^M activity expressed by *P. pastoris* transformant reached 105.3 U/mL. The molecular weight of reXyl11^M was estimated to be 34 000 by SDS-PAGE. The reXyl11^M displayed the highest activity at 70 °C and pH 6.0. It was

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022207C); 江苏省产学研联合创新基金——前瞻性联合研究项目(BY2014023-16); 国家自然科学基金项目(31071595, 20576046); 张家港市科技支撑计划项目(ZKN1301); 江苏省科技支撑计划项目(BE2012310, BE2011380); 苏州市科技支撑计划项目(SNG201401)。

* 通信作者: 黄卫宁(1963—), 男, 江苏南通人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事烘焙科学与发酵技术、谷物食品化学方面的研究。E-mail: wnhuang@jiangnan.edu.cn

stable at a temperature range of 30~75 °C, and at a pH range of 6.5~7.5. Co^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Li^{+} had a strong enzyme activation effect, Fe^{3+} had obvious inhibitory effect, its activity was not significantly affected by other metal ions and EDTA. This revealed that reXyl11^M was successfully expressed in *P. pastoris* and had good enzymatic characterizations.

Keywords: thermostable xylanase, *Pichia pastoris*, synthetic gene, gene expression, enzymatic characterization

利用生物技术提高面包品质及延长货架期有着重要的意义。大量研究表明,添加适量木聚糖酶能够提高面团的操作性能及改善产品的营养与品质,如提高面团的弹性、机械操作性及稳定性,增加面包的比容,改善面包瓤的组织结构,降低面包的硬度,延长面包的货架期等^[1-3]。

木聚糖酶(Xylanase)是指能专一降解半纤维素木聚糖为低聚木糖和木糖的一组酶的总称,主要包括三类:1) β -1,4-D-内切木聚糖酶(EC 3.2.1.8),从木聚糖主链的内部切割 β -1,4-糖苷键,使木聚糖溶液的粘度迅速降低;2) β -1,4-D-外切木聚糖酶(EC 3.2.1.92),以单个木糖为切割单位作用于木聚糖的非还原性末端,使反应体系的还原性不断增加;3) β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37),切割低聚木糖和木二糖,有助于木聚糖彻底降解为木糖。通过酶分子一级结构的序列比对和疏水簇分析,大多数木聚糖酶属于糖苷水解酶 10 和 11 家族^[4]。

目前,已经有来源于黑曲霉^[5]、枯草芽孢杆菌^[6]、绵毛嗜热丝孢菌^[7]等微生物的木聚糖酶应用于面包中,但其均属于中温木聚糖酶,在面包烘焙阶段便迅速失活。*xyl11*(GenBank 登录号:AY795559)是从 *Thermobifide fusca* NTU22 基因文库中筛选出的表达木聚糖酶活性最高的基因,表达的木聚糖酶在 70 °C 保温 3 h,残余酶活仍保留 70%,表观相对分子质量为 36 000。但该基因编码区由 1 014 个碱基对组成,编码 338 个氨基酸^[8],包含一个不具木聚糖酶活性的纤维素结合结构域,取 *xyl11* 的催化域基因(586 bp)在 *Pichia pastoris* GS115 中进行表达。由于它来源于细菌,其密码子偏好性与毕赤酵母有较大差异,于是对该耐热基因中的稀有密码子进行优化,有效提高外源蛋白质的表达量^[9],并且该基因命名为 *xyl11^M*。人工合成 *xyl11^M* 后克隆至 pMD19-T 质粒,构建重组克隆质粒 pMD19-T-*xyl11^M* 和重组表

达质粒 pPIC9K-*xyl11^M*,实现重组木聚糖酶 reXyl11^M 在 *P. pastoris* GS115 中的表达,并分析 reXyl11^M 的酶学性质。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli JM 109、*E. coli* DH5 α 为克隆宿主菌,*P. Pastoris* GS115 为表达宿主菌,pPIC9K 为真核表达质粒;均由江南大学无锡医学院分子生物学研究室保存。

1.2 工具酶和主要试剂

各种限制性内切酶、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker:大连 TaKaRa 公司;YNB、生物素、酵母提取物、蛋白胨、G418、Tryptone:上海 Sangon 公司;标准木糖、桦木木聚糖:Sigma 公司;SnCl₂、CaCl₂、FeCl₃、FeCl₂、CoCl₂、LiCl₂、ZnCl₂、NaCl、MgCl₂、MnCl₂、EDTA:国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 培养基

LB、YPD、MD、BMGY、BMMY 培养基的配制参考 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司)操作手册。

1.4 重组克隆质粒的构建

对照毕赤酵母密码子偏好性表 *xyl11* 中的稀有密码子进行优化,并在基因两端分别加入 *EcoR* I、*Not* I 酶切位点,该基因命名为 *xyl11^M*,合成后克隆至 pMD19-T 质粒,转化感受态 *E. coli* JM 109 细胞,经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定筛选阳性克隆,送上海 Sangon 公司测序,鉴定正确的重组克隆质粒命名为 pMD19-T-*xyl11^M*。

1.5 重组表达质粒的构建

将测序验证正确的 pMD19-T-*xyl11^M* 和

pPIC9K 质粒同时用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 割胶回收目的基因 *xy111^M* 和 pPIC9K 质粒片段, 具体操作参见 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit 说明书。用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接 4 h, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经通用引物 (5'-AOX 和 3'-AOX) PCR 筛选鉴定后, 测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-*xy111^M*。

1.6 重组 *P. pastoris* GS115 的筛选及诱导表达

pPIC9K 和重组表达质粒 pPIC9K-*xy111^M* 经 *Sal* I 酶切线性化后, 用电穿孔法导入 GS115 中, 涂布 MD 平板上筛选重组子; 将 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含 0.5、1.0、2.0 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 筛选抗 2.0 mg/mL G418 的毕赤酵母重组子, 分别命名为 GS115/9K 和 GS115/*xy111^M*; 参照《分子克隆实验指南》的方法提取重组 GS115 基因组 DNA, 利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX PCR 鉴定目的基因是否整合 GS115 基因组内。GS115/9K 和 GS115/*xy111^M* 的常规诱导表达参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册。

1.7 重组木聚糖酶的活性测定与 SDS-PAGE 分析

木聚糖酶酶活测定采用改良的 DNS 试剂法^[10]: 移取 2.4 mL 0.5 g/dL 桦木木聚糖溶液 (0.2 mol/L, pH 4.6 磷酸盐缓冲液配制) 于 25 mL 具塞管中, 40 °C 保温 10 min, 加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 准确反应 10 min 后煮沸 7 min 终止反应, 用可见分光光度计在 540 nm 下测定其 OD 值。酶活定义为: 在此测定的条件下, 每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。采用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析, 确定其表观相对分子质量。用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测重组蛋白质的理论相对分子质量。用在线软件 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 预测 N-和 O-糖基化位点。

1.8 reXyl11^M 酶学性质的测定

1.8.1 reXyl11^M 的最适温度及温度稳定性 按照 1.7 的测定方法, 在 30~100 °C 下每隔 5 °C 测定 reXyl11^M 的酶活, 以酶活性最高者为 100%, 作温度-相对酶活性曲线; 将酶液于不同温度下保温 1 h 后, 测定残余酶活性, 以未经保温酶液的酶活性为 100%, 作温度-相对酶活性曲线。当残余酶活性达到

85%以上, 即定义为稳定。

1.8.2 reXyl11^M 的最适 pH 及 pH 稳定性 按照 1.7 的方法在最适温度下分别测定木聚糖酶在不同 pH 值 (4.0~9.0) 下的酶活性。以酶活性最高者为 100%, 作 pH-相对酶活性曲线; 将酶在不同的 pH 值条件下于 40 °C 保温 1 h, 测定残余酶活性, 以酶活性最高者为 100%, 作 pH-相对酶活性曲线。当残余酶活性达到 85%以上, 即定义为稳定。反应所用的缓冲液为 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 4.0~8.0) 和 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0~9.0)。

1.8.3 金属离子和 EDTA 对 reXyl11^M 酶活性的影响 向重组木聚糖酶酶液中分别加入 SnCl₂、CaCl₂、FeCl₃、FeCl₂、CoCl₂、LiCl₂、ZnCl₂、NaCl、MgCl₂、MnCl₂、EDTA 等至终浓度为 2 mmol/L, 40 °C 保温 1 h, 按 1.7 的方法在最适温度和 pH 值下测定残余酶活性, 以不加金属离子和 EDTA 时所测的酶活性定义为 100%。

2 结果与讨论

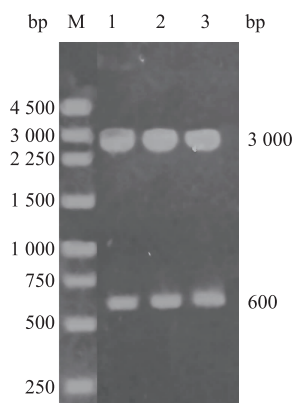
2.1 pPIC9K-*xy111^M* 的构建

质粒 pMD19-T-*xy111^M* 的双酶切 (*EcoR* I/*Not* I) 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 600 bp 和 3 000 bp 的特异性条带, 分别为目的基因 *xy111^M* 和线性化的 pMD19-T, 见图 1。将 *xy111^M* 与经同样双酶切的质粒 pPIC9K 割胶回收并连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 经通用引物鉴定后, 送上海 Sangon 公司测序, 结果显示测序结果与预期相符。测序基因长 586 bp, 与 *xy111^M* 同源性达到 100%。测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-*xy111^M*。

2.2 重组毕赤酵母 GS115 的构建及鉴定

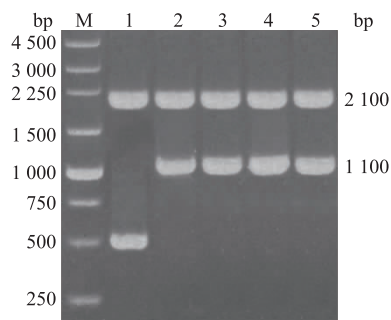
提取重组毕氏酵母 GS115/*xy111^M* 基因组进行 PCR 扩增鉴定, PCR 产物经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析, 见图 2。GS115/*xy111^M* 的 PCR 产物在约 1 100 bp 和 2 100 bp 处可见两条清晰的条带 (图 2 泳道 2-5), 2 100 bp 的产物为 GS115 本身的 AOX1 基因, 1 100 bp 的产物包括约为 600 bp 的目的基因 (586 bp) 和 500 bp pPIC9K 质粒上的 5'-AOX 和 3'-AOX 引物序列之间的片段, 而对照组 GS115/9K PCR 产物的两条条带大小分别约为 500 bp 和 2 100 bp (图 2 泳道 1), 表明 reXyl11^M 已整合入毕赤酵母 GS115 基因组内。从 PCR 验证正确的重组

毕赤酵母中随机挑取 4 株重组毕赤酵母 GS115/*xy111^M*-1、-2、-3、-4 和 1 株毕赤酵母 GS115 进行诱导表达。



M: 250 bp DNA Ladder marker; 1-3: 重组质粒 pMD19-T-*xy111^M* 的双酶切产物

图 1 质粒 pMD19-T-*xy111^M* 的双酶切电泳图
Fig. 1 Double digestion of pMD19-T-*xy111^M*



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: GS115/9K; 2-5: GS115/*xy111^M*

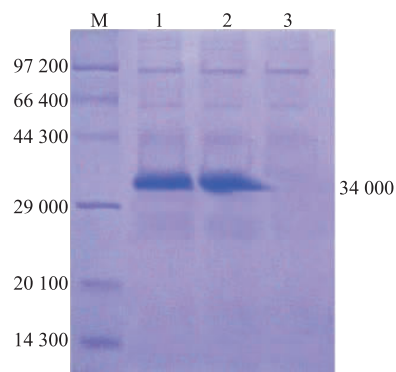
图 2 毕赤酵母重组子基因组 PCR 验证

Fig. 2 Verification of *P. pastoris* transformants by PCR

2.3 重组蛋白的表达与鉴定

重组毕赤酵母经诱导表达后, 8 000 r/min 离心 10 min 后收集发酵上清液, 取上清液按照 1.7 的方法测定木聚糖酶活性。结果表明, GS115/*xy111^M* 发酵上清液木聚糖酶活性最高可达到 105.3 U/mL, 而 GS115/9K 并未检测到木聚糖酶活性。SDS-PAGE 结果见图 3。GS115/*xy111^M* 的表达产物在相对分子质量 34 000 处有一条明显的蛋白质条带 (图 3 泳道 1-2), 而对照 GS115/9K 在该处无条带 (图 3 泳道 3)。reXyl11^M 相对分子质量比前期预测的理论相对分子质量大 (24 845), 分析其原因可能是由于 reXyl11^M 氨基酸序列在酵母 GS115 表达过程中发

生了糖基化修饰^[11]。用在线软件 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分别对 N-糖基化位点及 O-糖基化位点进行预测, 结果表明 *xy111^M* 氨基酸序列中含有 3 个 N-糖基化位点和 1 个 O-糖基化位点。



M: 低相对分子质量蛋白质 marker; 1-2: GS115/*xy111^M* 的诱导表达产物; 3: GS115/pPIC9k 的诱导表达产物

图 3 reXyl11^M 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of reXyl11^M

2.4 reXyl11^M 的酶学性质分析

2.4.1 酶的最适反应温度及热稳定性 在 50~80 °C 范围内, reXyl11^M 酶活性较高, 相对酶活性可达 95% 以上, 其中最适反应温度为 70 °C; reXyl11^M 在 50~75 °C 范围内残余酶活性在 85% 以上。在 75 °C 保存 1 h 后, 酶活性仅损失 4.62%。说明该酶的热稳定性好, 在高温下可保持稳定, 见图 4。

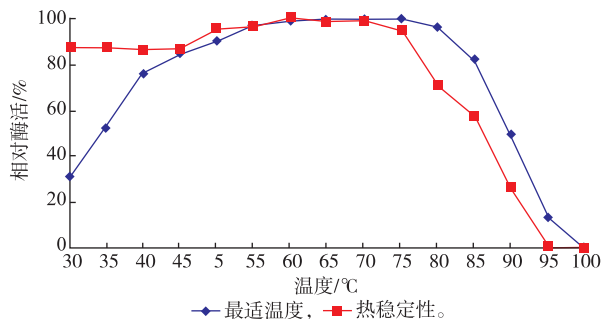


图 4 温度对 reXyl11^M 酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of the reXyl11^M

2.4.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性 在不同 pH 值下进行酶活性检测, 结果见图 5。该酶的最适反应 pH 为 6.0, pH 在 5.5~6.5 范围内相对酶活性均在 99% 以上, 在当 pH>7.5 时, 酶活性下降较快, 但相对

酶活性仍在 50%以上;该重组酶在 pH 6.5~7.5 范围内稳定,当 pH 值低于 6.5 或高于 7.5 时,该酶的稳定性较差,残余酶活性在 55%~83%之间。可见该酶为中性木聚糖酶,适用于烘焙产品。

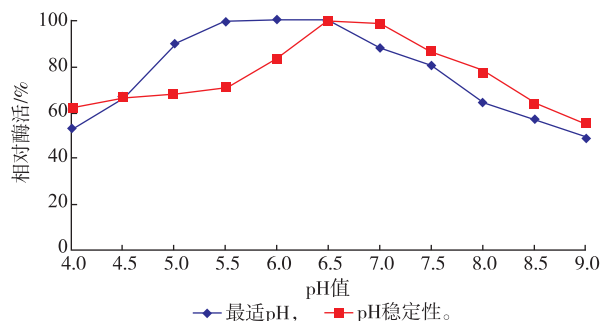


图 5 pH 对 reXyl11^M 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity of the reXyl11^M

2.4.3 金属离子对酶活性的影响 Fe³⁺对 reXyl11^M 酶活性有明显的抑制作用,使 reXyl11^M 酶活性降低 23.7%,Co²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、Li⁺对酶有强烈的激活作用,分别使 reXyl11^M 酶活性提高 54.1%,47.7%,40.5%,36.9%,可能是 Co²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、Li⁺对酶与底物的结合和解离状态有影响,具体机制还有待进一步的研究^[17]; EDTA 和其它离子对 reXyl11M 酶活性影响不大,见图 6。

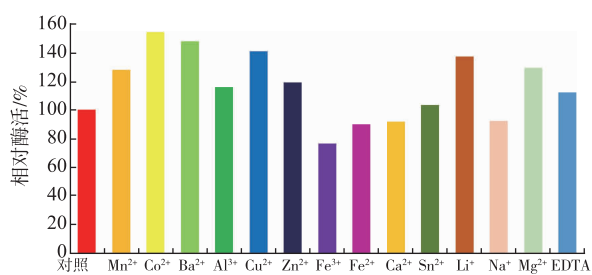


图 6 金属离子和 EDTA 对 reXyl11^M 酶活性的影响

Fig. 6 Effects of various metal ions and EDTA on the activity of the reXyl11^M

参考文献:

- [1] Santala O, Lehtinen P, Nordlund E, et al. Impact of water content on the solubilisation of arabinoxylan during xylanase treatment of wheat bran[J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54(2): 187-194.
- [2] Caballero P A, Gmez M, Rosell C M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelflife by enzymes combination [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81(1): 42-53.
- [3] Jia C L, Huang W N, Mohamed A S, et al. Dough rheological, mixolab mixing, and nutritional characteristics of almond cookies with and without xylanase[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011(105): 227-232.
- [4] Polizeli M L T M, Rizzatti A C S, Monti R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005(67): 577-591.

3 结语

耐热木聚糖酶有着重要的工业应用价值,通过基因工程技术实现耐热木聚糖酶的异源高效表达是降低其工业应用成本、适应工业应用条件的有效手段。毕赤酵母是一个优良的表达体系,具有操作简便、可高水平地胞外表达、可进行糖基化、二硫键形成等真核翻译后修饰等优点^[13]。目前,已经有耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中实现了分泌表达。

作者成功实现了 11 家族耐热木聚糖酶密码子优化基因 *xyl11^M* 在 *P. pastoris* GS115 中的分泌表达。以桦木木聚糖为底物, reXyl11^M 酶液的酶活性可达到 105.3 U/mL,明显高于其它在毕赤酵母表达的耐热木聚糖酶,如张慧敏等^[12]克隆了来自于细菌的耐热木聚糖酶基因 *Syxn11*,并在 *P. pastoris* GS115 中进行了表达,其最高酶活性为 17.74 U/mL; Ghaffar 等克隆了来自于 *Chaetomium thermophilum* 的耐热木聚糖酶基因 *xyn11A*,在 *P. pastoris* GS115 中表达最高酶活性为 15.6 U/mL^[14]; Berrin 等^[15]将黑曲霉的 *xynA* 基因在巴斯德毕赤酵母中表达,分泌量仅为 15.6 U/mL; 杨梦华等克隆了海栖热袍 MSB8 菌的 *XylB* 基因在 *P. pastoris* 中表达,培养液上清液木聚糖酶比活为 50 U/mL^[16]。经 SDS-PAGE 分析 reXyl11^M 的表观相对分子质量约为 34 000。初步的酶学性质研究表明,该酶的最适反应温度为 70 °C,并在 30~75 °C 较稳定;最适反应 pH 为 6.0,在 pH 6.5~7.5 范围内稳定;Co²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、Li⁺对酶活性有强烈的激活作用;Fe³⁺有明显的抑制作用,其它金属离子及 EDTA 对 reXyl11^M 酶活性影响不大。这些优良的酶学特性表明了该酶在烘焙体系以及其他领域具有广泛的应用潜力。

- [5] Courtin C M, Delcour. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making[J]. **Cereal Science**, 2002(35):225-243.
- [6] Courtin C M, Gelders G G, Delcour J A. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour bread making[J]. **Cereal Chemistry**, 2001(5):564-571.
- [7] Jiang Z Q, Yang S Q, Tan S S, et al. Characterization of xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2005(41):69-7.
- [8] Cheng Y F, Yang C F, Liu W H. Cloning and expression of thermobifida xylanase gene in the methylophilic yeast *Pichia pastoris* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005(37):541-546.
- [9] Jin G Z, Duan Z Y, Zhang L F, et al. Expression of the fusion protein human serumalbumin/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010(29):595-601.
- [10] Zhou C Y, Bai J Y, Deng S S, et al. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*[J]. **Bioresource Technology**, 2008(99):831-838.
- [11] Zachary J M, Eugenia M, Wei L, et al. Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ R1[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2010, 404(4):650-664.
- [12] 张慧敏, 李剑芳, 邬敏辰, 等. 耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(2):124-128.
ZHANG Huiming, LI Jianfang, WU Mingcheng, et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013(32):124-128. (in Chinese)
- [13] 湛斌, 唐雪明, 沈微, 等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 23(4):43-47.
CHEN Bin, TANG Xueming, SHEN Wei, et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and its preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 23(4):43-47. (in Chinese)
- [14] Ghaffar A, Khan S A, Mukhtar Z, et al. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115[J]. **Molecular Biology Reports**, 2011(38):3227-3233.
- [15] Berrin J G, Williamson G, Puigserver A, et al. High-level production of recombinant fungal endo-beta-1,4-xylanase in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2000(1):179-187.
- [16] 杨梦华, 李颖, 关国华, 等. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2005(2):236-240.
YANG Menghua, LI Ying, GUAN Guohua, et al. Efficient expression of therostable xylanase gene in *E.coli* and in *Pichia pastoris*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2005(2):236-240. (in Chinese)
- [17] 邹永龙, 桑月婵, 彭建新, 等. β -1,4-内切木聚糖酶的分离纯化及其性质[J]. 植物学报, 1999, 41(11):1212-1216.
ZOU Yonglong, SANG Yuechan, PENG Jianxin, et al. Purification and properties of β -1,4-endoxylanase[J]. **Acta Botanica Sinica**, 1999(41):1212-1216. (in Chinese)