

饱和突变改善米曲霉 11 家族木聚糖酶 AEx11A 的催化特性

刘艳¹, 张婷¹, 阚婷婷², 李剑芳¹, 邬敏辰^{*3}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为改善米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 11 家族木聚糖酶 AEx11A 的催化特性, 作者采用全质粒 PCR 方法对 AEx11A 基因 (AEx11A) 中编码 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、Pro¹²⁹ 和 Ile¹³² 的密码子实施饱和突变, 构建饱和突变文库。以木聚糖酶的酶活性为指标, 采用 DNS 法从文库中筛选出酶活性提高 30% 以上的转化子。对其中酶活性提高最明显的两个位点 Thr⁹⁸ 和 Val¹²⁴ 实施迭代饱和突变, 筛选出最优突变子 AEx11A^{T98D-V124Q}, 其纯化后的比活性及催化效率分别为 AEx11A 的 3.04 和 2.74 倍。此外, 突变酶 AEx11A^{V124T} 的热稳定性较 AEx11A 有一定的提高, 其余 2 个突变酶的温度特性与 AEx11A 差异不大。

关键词: 饱和突变; 米曲霉; 木聚糖酶; 催化特性

中图分类号: TS 201.25 文章编号: 1673-1689(2020)05-0031-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.005

Improvement in the Catalytic Properties of A GH 11 Xylanase AEx11A, from *Aspergillus oryzae* by Saturated Mutagenesis

LIU Yan¹, ZHANG Ting¹, KAN Tingting², LI Jianfang¹, WU Minchen^{*3}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to improve the catalytic properties of AEx11A, a glycoside hydrolase (GH) family 11 xylanase from *Aspergillus oryzae*, the Thr⁹⁸, Asn¹⁰⁰, Val¹²⁴, Pro¹²⁹ and Ile¹³²-encoding codons in AEx11A were selected for saturated mutagenesis by whole-plasmid PCR technique. Then, the mutagenesis libraries of AEx11A were constructed by transforming these variants into *E. coli* BL21 (DE3), respectively. Using the enzyme activity of xylanase as criterion, transformants having an increase of more than 30% in activities were selected from the libraries by DNS method. Two mutation sites (Thr98 and Val124) with remarkably increased enzyme activities were subjected to iterative saturation mutation (ISM) and the optimal mutant, AEx11A^{T98D-V124Q}, was selected. The

收稿日期: 2018-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(21176117); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(SJCX17_0467); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(JSCX17_0503)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程方面的研究。E-mail: biowmc@126.com

specific activity and catalytic efficiency of purified AEx11A^{T98D-V124Q} were 3.04- and 2.74-fold those of AEx11A. An improvement in the thermostability of AEx11A^{V124T} was observed compared with that of AEx11A, while the temperature properties of the other two mutants almost had no changes.

Keywords: Saturated mutagenesis, *Aspergillus oryzae*, xylanase, catalytic properties

木聚糖 (xylan) 是半纤维素的重要组成成分, 是一种重要的可再生生物资源^[1]。内切 β -1,4-木聚糖酶简称为木聚糖酶 (xylanases, EC 3.2.1.8), 能够水解木聚糖分子主链内部的 β -1,4-糖苷键, 广泛应用于食品、造纸和饲料等领域^[2]。

迄今为止, 已有多种不同来源的木聚糖酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 等宿主菌中实现了异源表达^[3-5]。不同来源的木聚糖酶酶学性质各有不同, 研究发现天然存在的木聚糖酶极少可以兼具高活性和高耐热性。因此, 越来越多的研究者对木聚糖酶进行分子改造以期获得酶学性质优良的工业化木聚糖酶^[6-8]。目前对于木聚糖酶的分子改造研究主要集中在对酶的耐热性改造方面^[9-11]。然而, 大多数改造后的木聚糖酶在耐热性提高的同时伴随着活性的下降, 这在一定程度上限制了耐热木聚糖酶在工业中的应用^[12-14]。因此, 一些研究者开始以耐热性较高的天然木聚糖酶为出发菌株, 通过基因突变来提高其酶活性, 以期获得耐热性和活性俱佳的突变木聚糖酶^[15-16]。罗建杰等^[17]利用 PCR 方法将木聚糖酶 XYN-W 的 C 端 57 个氨基酸序列去除, 比活性提高了 43.9%。王谦等^[18]对木聚糖酶 ATX 活性位点附近的单一氨基酸实施定点突变 (L49P) 来增强木聚糖酶的活性, K_{cat}/K_m 值较原酶提高了 51.7%。虽然很多研究者通过基因突变技术对木聚糖酶进行了分子改造并取得了一定的成果, 但仍未能达到工业化应用的水平, 改善木聚糖酶催化特性的分子改造研究还有待进行。

作者所在实验室从米曲霉基因组中克隆了一个木聚糖酶基因 *Aoxyn11A*, 并通过 N 端替换提高了该酶的热稳定性, 突变酶 AEx11A 的最适温度高达 75 °C, 比原酶高 25 °C, 70 °C 的半衰期 $t_{1/2}$ ⁷⁰ 由原酶的 1 min 提高为 197 min, 但比活性下降为原酶的 63%, 一定程度上限制了木聚糖酶 AEx11A 在工业中的应用。为改善木聚糖酶 AEx11A 的催化特性, 本研究基于生物信息学分析结果, 拟对 AEx11A 中编

码 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、Pro¹²⁹ 和 Ile¹³² 的密码子实施饱和和突变, 构建饱和突变文库, 并从中获得表达酶活性最高的突变子。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3): 购自 Invitrogen 公司; 重组质粒 pET-28a-AEx11A: 作者所在实验室构建和保存。

1.2 主要试剂和培养基

rTaq DNA 聚合酶、高保真 PrimeSTAR、DNA 和蛋白质 Marker: 购自 TaKaRa 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨: 购自 Sangon 公司; 考马斯亮蓝 G-250、桦木木聚糖: 购自 Sigma 公司; 其它试剂均为国产或进口分析纯。

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 121 °C 高温灭菌 20 min; LB 固体培养基: 加入琼脂 18 g/L 到 LB 液体培养基中, 121 °C 高温灭菌 20 min; LB 抗性培养基: 添加终质量浓度达 100 μ g/mL 的卡那霉素。

1.3 木聚糖酶的同源建模及分子对接

选择与木聚糖酶 AEx11A 一级结构同源性较高, 来源于 *E. coli* 的木聚糖酶晶体结构 (PDB: 2VGD) 为模板, 运用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维结构模拟。使用 ChemDraw 3D Ultra 12.0 构建 XYN (木二糖) 的三维结构并进行能量最小化。以 AEx11A 的三维结构为受体, 运用 AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu>) 程序, 将底物 XYN 对接至酶活性中心的合适位置。采用 PyMOL (<http://pymol.org/>) 分析对接后 AEx11A 的三维结构。

1.4 引物设计

基于 AEx11A 一级结构和三维结构分析, 拟在 AEx11A 的 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、Pro¹²⁹ 和 Ile¹³² 位点进行饱和突变。依据 AEx11A 核苷酸序列及目的突变位点设计 PCR 引物, 由 Sangon 上海公司合成, 见表 1。

表 1 饱和突变的引物

Table 1 PCR primers for the saturation mutation

引物名称	引物序列 (5'→3')	长度/ bp
T98X-F	AGTCGTACGGC <u>NNK</u> TACAACCCGGCA	27
N100X-F	TACGGCACATAC <u>NNK</u> CCCAGGCGAG	23
V124X-F	TCTATACCTCT <u>NNK</u> CGAACCAATGCAC	27
P129X-F	ACCAATGCAN <u>NNK</u> TCTATCATCGGGAC	26
I132X-F	ACCATCTATC <u>NNK</u> GGGACGGCGAC	24
T7-R	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20

注:下划线部分为突变位点。

1.5 突变文库的构建和筛选

以 pET-28a-AEx11A 为模板, T98X-F、N100X-F、V124X-F、P129X-F 和 I132X-F 为上游引物, T7-R 为下游引物, 采用全质粒 PCR (whole-plasmid PCR) 对 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、Pro¹²⁹ 和 Ile¹³² 密码子实施饱和突变, 将 PCR 产物用 Dpn I 消化, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 构建饱和突变文库。每个突变点从平板上挑选 97 个转化子 (*E. coli*/AEx11A^{T98X}、*E. coli*/AEx11A^{N100X}、*E. coli*/AEx11A^{V124X}、*E. coli*/AEx11A^{P129X} 和 *E. coli*/AEx11A^{I132X}, X 代表任意氨基酸), 接种于 1 mL LB 抗性培养基中, 37 ℃、220 r/min 培养 12 h, 以 2% 接种体积分数转接至 1 mL 相同的培养基, 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6~0.8 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG、28 ℃诱导表达 5 h, 4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 加入 200 μL、1 mg/mL 溶菌酶溶液后, 反复冻融破碎细胞, 离心后收集上清液即为粗酶液。将酶液适当稀释后取 5 μL 加入 95 μL 0.5 g/dL 桦木木聚糖溶液 (pH 5.5、50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液) 中, 借助 PCR 仪进行催化和显色反应 (75 ℃ 10 min, 加 50 μL DNS 试剂, 95 ℃ 5 min, 冷却至 10 ℃), 加入 96 孔板中, 用酶标仪测定 OD₅₄₀ 值。酶活性大于原酶 30% 的突变木聚糖酶所对应的突变子定义为正突变子, 对其进行 DNA 测序。对其中酶活性提高较明显的位点进行迭代饱和突变, DNS 法筛选最优突变子。

1.6 木聚糖酶的表达和纯化

将原酶和筛选得到的突变酶分别接种于含 100 μg/mL 卡那霉素的 100 mL LB 培养基中进行诱导表达, 收集菌体。加入适当破碎液 (pH 5.5、50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液) 重悬菌体, 冰浴条件下, 超声波破碎细胞, 4 ℃、12 000 r/min 离心收集上

清液, 并经 0.22 μm 滤膜过滤后, 取上清液加样至 Ni-NTA 亲和层析柱 (北京 Tiandz 公司), 以纯化目的酶蛋白。

1.7 木聚糖酶的活性测定及蛋白质分析

采用 DNS 法^[19]测定木聚糖酶活性, 通过 SDS-PAGE 分析重组表达产物; Bradford 法^[20]测定蛋白质质量浓度。

1.8 木聚糖酶酶学性质测定

1.8.1 最适反应温度及温度稳定性 将适当稀释的酶液于 60~85 ℃ 下反应, 每隔 5 ℃ 测定酶活性, 以最高者为 100%, 作温度-相对酶活性曲线。将酶液于最适温度保温不同时间, 每隔一段时间测定残余酶活, 以未经保温处理酶液的酶活性定义为 100%, 作时间-相对酶活性曲线。当残余酶活达到 80% 以上即定义为稳定。反应所使用的缓冲液为 pH 5.5、50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液。

1.8.2 最适 pH 及 pH 稳定性 将适当稀释的酶液在 pH 3.5~7.5 下于最适温度反应, 每隔 0.5 个 pH 测定酶活性, 以最高者为 100%, 作 pH-相对酶活性曲线。将酶液在不同 pH 值下于最适温度保温 1 h, 测定残余酶活, 以最高者为 100%, 作 pH-相对酶活性曲线。当残余酶活达到 80% 以上即定义为稳定。反应所使用的缓冲液为 50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 3.0~8.0)。

1.8.3 动力学参数的测定 以不同质量浓度 (1.0~10.0 mg/mL) 的木聚糖溶液 (pH 5.5) 为底物, 在木聚糖酶最适条件下测定酶活性, 采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合, 计算酶的 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的选定

通过搜索蛋白质 PDB 数据库, 获得与木聚糖酶 AEx11A 的蛋白质序列一致性为 76% 的木聚糖酶晶体结构 (PDB:2VGD), 以 2VGD 为模板, 利用 SWISS-MODEL 对木聚糖酶 AEx11A 进行三维结构模拟, 对模拟后的 AEx11A 进行分子对接。对接结果见图 1。催化中心 Glu89 和 Glu180 位于底物结合口袋处。通过对 AEx11A 的三维结构进行保守性分析和氨基酸位置及理化性质分析, 筛选出 5 个待突变的位点, 分别为 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、Pro¹²⁹ 和 Ile¹³²。

2.2 突变文库的构建和最优突变子筛选

按照 1.5 的方法, 构建饱和突变文库, DNS 法筛

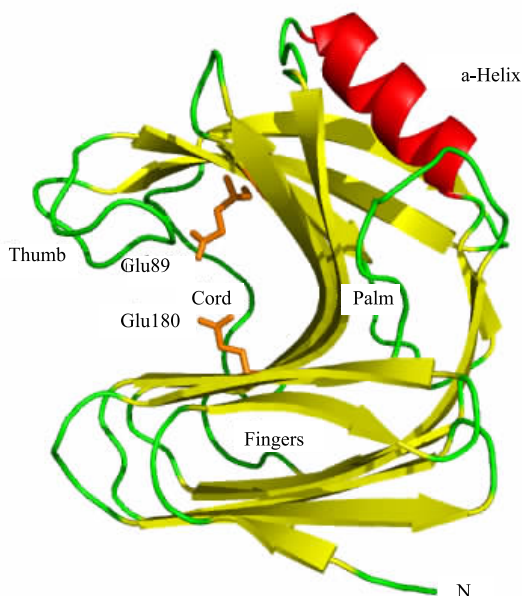


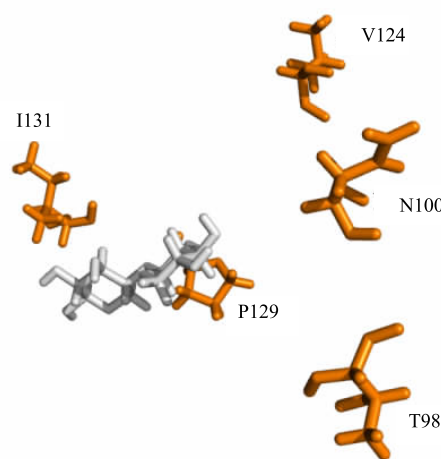
图1 AEx11A 的三维结构及突变位点

Fig. 1 Three-dimensional structure of AEx11A

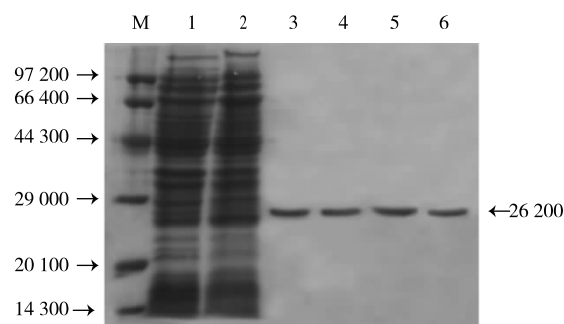
选酶活性提高的突变子。结果显示,从 *E. coli/AEx11A*^{T98X} 突变文库中筛选出 6 个酶活性大于原酶 30% 的转化子,选出酶活性最好的 3 个转化子测序, DNA 测序结果表明,这 3 个转化子均表达出 AEx11A^{T98D}。从 *E. coli/AEx11A*^{V124X} 突变文库中筛选出 4 个酶活性大于原酶 30% 的转化子,选出酶活性最好的 3 个转化子测序, DNA 测序结果表明,这 3 个转化子均表达出 AEx11A^{V124T}。而 *E. coli/AEx11A*^{P129X}、*E. coli/AEx11A*^{I131X} 和 *E. coli/AEx11A*^{I132X} 突变文库中没有筛选出酶活性提高 30% 的转化子。以 pET-28a-AEx11A^{T98D} 为模板,在 Val¹²⁴ 位点实施迭代饱和突变,筛选得到最优转化子 *E. coli/AEx11A*^{T98D-V124Q}。

2.3 木聚糖酶的表达和纯化

重组菌 *E. coli/AEx11A*、*E. coli/AEx11A*^{T98D}、*E. coli/AEx11A*^{V124T} 和 *E. coli/AEx11A*^{T98D-V124Q} 及对照 *E. coli/pET-28a* 经 IPTG 诱导表达和超声波破碎后,测定上清液的酶活性。结果表明,重组 AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T}、AEx11A^{T98D-V124Q} 的粗酶液酶活性依次为 77.95、58.86、97.13 U/mL,分别是 AEx11A (30.90 U/mL) 2.52、1.90、3.14 倍。将上清液采用 Ni-NTA 柱纯化, AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 对木聚糖的比活性依次为 1 451.6、1 120.5、1 859.4 U/mg,分别为 AEx11A (612.3 U/mg) 的 2.37、1.83、3.04 倍。



SDS-PAGE 分析显示,纯化后的 AEx11A、AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 均约在相对分子质量 26 200 处呈现单一条带,见图 2。



M: 蛋白质 marker; 1: *E. coli/pET-28a*; 2: AEx11A 粗酶液; 3: AEx11A 纯酶液; 4: AEx11A^{T98D} 纯酶液; 5: AEx11A^{V124T} 纯酶液; 6: AEx11A^{T98D-V124Q} 纯酶液。

图2 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed products

2.4 酶学性质分析

2.4.1 温度对木聚糖酶活性的影响 采用 DNS 法测定不同温度下 (60~85 °C) 的酶活性,结果见图3。AEx11A 与各突变酶的最适温度均为 75 °C, AEx11A 在 75 °C 的半衰期 $t_{1/2}^{75}$ 为 174 min,与 AEx11A^{T98D} (179 min) 和 AEx11A^{T98D-V124Q} (188 min) 相差不大,而 AEx11A^{V124T} 的 $t_{1/2}^{75}$ 为 270 min,是 AEx11A 的 1.55 倍,热稳定性稍高于 AEx11A。

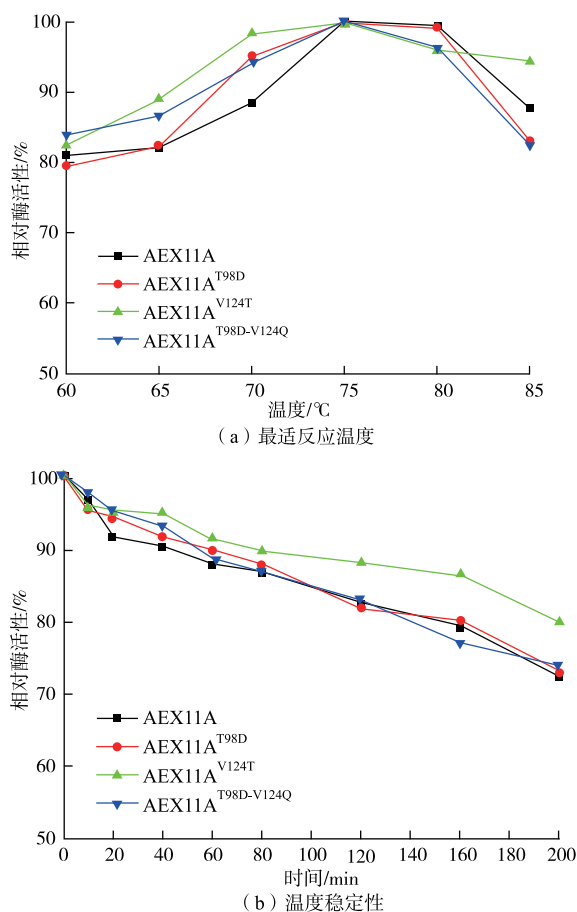


图 3 木聚糖酶的最适温度及温度稳定性

Fig. 3 Temperature optimum and thermostability of xylanase

2.4.2 pH 对木聚糖酶活性的影响 采用 DNS 法测定酶液在不同 pH 值下的酶活性, 结果见图 4。AEx11A 与各突变酶的最适 pH 均为 6.0, pH 稳定性基本无差异。AEx11A 和 AEx11A^{V124T} 在 pH 5.0~7.5 之间保持稳定, AEx11A^{T98D} 在 pH 5.0~6.5 之间保持稳定, AEx11A^{T98D-V124Q} 在 pH 5.0~7.0 之间保持稳定。

2.4.3 动力学参数测定 AEx11A、AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 的动力学参数见表 2。突变酶的 K_m 值与原酶相比均有所下降, 对底物的亲和力增强。催化效率 k_{cat}/K_m 值存在明显的不同, AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 的 k_{cat}/K_m 值分别为 AEx11A 的 2.02、1.49 和 2.74 倍。表 3 列出了一些 GH11 家族木聚糖酶的动力学参数, 最优突变子 AEx11A^{T98D-V124Q} 的 K_m 值与其它 GH11 家族木聚糖酶相比较低, 且催化效率 k_{cat}/K_m 值处于较高水平, 这可能是由于有效的突变使得酶与底物的亲和力增强。

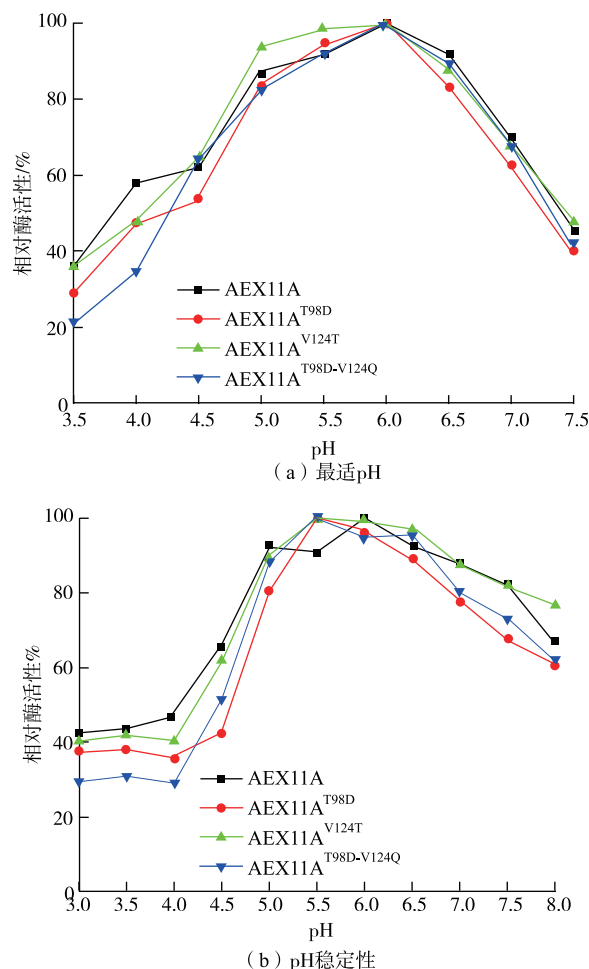


图 4 木聚糖酶的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 4 pH optimum (a) and pH stability (b) of xylanase

表 2 木聚糖酶的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of xylanase

名称	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/(mg/mL)$	k_{cat}/K_m ($mL/(mg \cdot s)$)	倍数
AEx11A	1 436±40	2.87±0.07	500	1.00
AEx11A ^{T98D}	2 082±31	2.06±0.06	1 011	2.02
AEx11A ^{V124T}	1 727±23	2.32±0.06	744	1.49
AEx11A ^{T98D-V124Q}	2 366±52	1.73±0.05	1 368	2.74

3 结 语

作者对木聚糖酶 AEx11A 进行了蛋白质水平的改造, 通过对 AEx11A 中编码 Thr⁹⁸、Asn¹⁰⁰、Val¹²⁴、

表 3 GH11 家族木聚糖酶动力学参数比较

Table 3 Comparison of the kinetic parameters of several GH11 family xylanases

名称	来源	宿主	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/(mg/mL)$	$k_{cat}/K_m/(mL/(mg \cdot s))$	文献
AEx11A ^{T98D-V124Q}	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>E. coli</i>	2 366±52	1.73±0.05	1 368	本研究
rAfxynA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>E. coli</i>	/	2.55	/	[21]
XynII	<i>Aspergillus usamii</i>	<i>P. pastoris</i>	1 294	5.56	232.8	[22]
reAusXyn11D	<i>Aspergillus usamii</i>	<i>P. pastoris</i>	208.9	6.32	33	[23]
rePPBaxA10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>P. pastoris</i>	13.1	5.41	2.42	[24]
ATx	<i>Aspergillus niger</i>	<i>E. coli</i>	90.76	4.46	20.34	[18]
FSI-A124	<i>Aspergillus niger</i>	<i>E. coli</i>	131.10	4.25	30.86	[18]

Pro¹²⁹ 和 Ile¹³² 的密码子实施饱和突变,采用 DNS 显色法筛选得到 2 个酶活性提高明显的突变子 AEx11A^{T98D} 和 AEx11A^{V124T},在此基础上进行迭代饱和突变,筛选得到最优突变子 AEx11A^{T98D-V124Q}。纯化后突变酶 AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 的比活性分别为 AEx11A 的 2.37、1.83 和 3.04 倍。酶学性质研究发现,突变酶 AEx11A^{V124T} 的热稳定性较 AEx11A 有一定提高,各突变酶的 pH 特性与

AEx11A 差异不大。突变酶的 K_m 值与 AEx11A 相比均下降,对底物的亲和力增强,AEx11A^{T98D}、AEx11A^{V124T} 和 AEx11A^{T98D-V124Q} 的催化效率分别为 AEx11A 的 2.02、1.49 和 2.74 倍。该研究表明,Thr⁹⁸ 和 Val¹²⁴ 位点的分子改造能够有效改善 AEx11A 的催化特性,为以后木聚糖酶的进一步改造奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 孙超,陈卫平. 微生物木聚糖酶及其应用研究进展[J]. 中国酿造,2013,32(4):24-29.
- [3] LI J F,ZHANG H M,WU M C,et al. Expression and characterization of hyperthermotolerant xylanases,SyXyn11P and SyXyn11E,in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2014,172(7):3476-3487.
- [4] 卢桂义,郭敏辰,黄卫宁,等. 嗜热裂孢菌木聚糖酶在毕赤酵母中的表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(5):492-497.
- [5] 连昭. 乳酸克鲁维酵母表达异源木聚糖酶 B 工程菌改造及蛋白分泌机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2015.
- [6] BAI W Q,CAO Y F,LIU J,et al. Improvement of alkalophilicity of an alkaline xylanase xyn11A-LC from *Bacillus sp.* SN5 by random mutation and Glu135 saturation mutagenesis[J]. **Bmc Biotechnology**,2016,16(1):77-85.
- [7] RANGANTAHAN K,VASANTHY A. Improvement of *Bacillus pumilus* for higher xylanase production by mutation[J]. **Jacobs Journal of Enzymology and Enzyme Engineering**,2015,1(1):1-8.
- [8] ZOUARI A D,HMIDA S A,BEN H H,et al. Improvement of *Trichoderma reesei* xylanase II thermal stability by serine to threonine surface mutations[J]. **Interntaional Journal of Biological Macromolecules**,2015,72(8):163-170.
- [9] ZHOU C Y,ZHANG M C,WANG Y T,et al. Enhancement of the thermo-alkali-stability of xylanase II from *Aspergillus usamii* E001 by site-directed mutagenesis[J]. **African Journal of Microbiology Research**,2013,7(16):1535-1542.
- [10] WANG K,LUO H Y,TIAN J,et al. Thermostability improvement of a streptomyces xylanase by introducing proline and glutamic acid residues[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2014,80(7):2158-2165.
- [11] ZHANG S,ZHANG K,CHEN X Z,et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2010,395(2):200-206.
- [12] 吴芹,胡蝶,李雪晴,等. Y13F 定点突变改良米曲霉中温木聚糖酶的耐热性[J]. 中国生物工程杂志,2016,36(12):36-41.
- [13] 陈忠法,唐存多,汪俊卿,等. 米曲霉木聚糖酶 N 端引入二硫键对其热稳定性的影响[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(7):686-691.
- [14] GAO S J,WANG J Q,WU M C,et al. Engineering hyperthermostability into a mesophilic family 11 xylanase from *Aspergillus*

- oryzae* by in silico design of N-terminus substitution[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2013, 110(4): 1028-1038.
- [15] LI Q, SUN B G, JIA H Y, et al. Engineering a xylanase from *Streptomyces rochei* L10904 by mutation to improve its catalytic characteristics[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, 101(3): 366-372.
- [16] KAZUYO F, HONG S Y, YEON Y J, et al. Enhancing the activity of *Bacillus circulans* xylanase by modulating the flexibility of the hinge region[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2014, 41(8): 1181-1190.
- [17] 罗建杰, 王亚茹, 袁铁铮, 等. 高比活木聚糖酶 XYN-W 及其突变体在酵母中的高效表达[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(5): 80-85.
- [18] WANG Q, ZHAO L L, SUN J Y, et al. Enhancing catalytic activity of a hybrid xylanase through single substitution of Leu to Pro near the active site[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012, 28(3): 929-935.
- [19] LI J F, ZHAO S G, TANG C D, et al. Cloning and functional expression of an acidophilic β -mannanase gene (Anman5A) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2012, 60(3): 765-773.
- [20] 胡方凯. *Clostridium clariflavum* DSM 19732 中木聚糖酶基因克隆表达及酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [21] 杨齐, 毛丽春, 荆垒, 等. 烟曲霉 FC2-2 木聚糖酶基因的大肠杆菌表达产物的表征[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(7): 1451-1456.
- [22] 周晨妍, 王武, 邬敏辰. 突变木聚糖酶基因 xynIIC 在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2009(10): 19-22.
- [23] 张慧敏. 计算机辅助设计提高宇佐美曲霉 GHF11 木聚糖酶热稳定性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [24] 徐馨. 解淀粉芽孢杆菌木聚糖酶 A 基因在毕赤酵母中的分泌表达及其定向进化研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2016.

会 议 消 息

会议名称: 第十三届全国生物医药色谱及相关技术学术交流会

会议时间: 2020 年 9 月 11-14 日

会议地点: 吉林省延边市

主 办 方: 中国化学会色谱专业委员会

共同主办: 北京色谱学会

承 办 方: 延边大学、北京理化分析测试技术学会

会议主题: 生物医药色谱新时代

大会主席: 刘虎威

预计规模: 400 人

会议网站: <http://www.chemsoc.org.cn/meeting/BMC2020/>

联 系 人: 何苗

电子邮箱: 121259459@qq.com

电 话: 0433-2732456

会议内容: 色谱技术及相关技术, 包括气相色谱、液相色谱、离子色谱、毛细管电泳、芯片技术及联用技术等生命科学、生物技术、医药、食品及环境等相关领域应用中的理论、方法与技术。