

来源于橄榄绿链霉菌 A1 的高比活木聚糖酶 XYNB 的 高效表达及性质的比较分析

何永志 姚 斌* 王亚茹 袁铁峥 罗会颖

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

摘 要 高效表达高比活木聚糖酶是进一步提高木聚糖酶发酵效价、降低其生产成本的有效途径。将橄榄绿链霉菌 (*Streptomyces olivaceoviridis*) A1 的高比活木聚糖酶成熟蛋白编码基因 *xynB* 克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9 中, 转化毕赤酵母得到重组酵母, 在重组酵母中木聚糖酶基因得到了高效分泌表达, 且表达产物具有生物学活性。在 3L 发酵罐中蛋白表达量约 1.4mg/mL, 酶活性(效价)为 1200IU/mL。SDS-PAGE 分析表明, 表达的木聚糖酶 XYNBa 为糖基化蛋白, 分子量为 31kD, 经脱糖基化处理得到 21kD 的 XYNBb, 与橄榄绿链霉菌 A1 所产原酶 XYNB 大小一致。通过对 XYNB、XYNBa 及 XYNBb 酶学性质的比较发现: 三者在必活性、 V_{max} 及热稳定性方面有较大差异。该酶对不同木聚糖的酶解产物的糖份分析表明, 酶解产物的主要成分为木二糖、木三糖和木四糖, 占总糖含量的 95% 以上。

关键词 高比活木聚糖酶, 高效表达, 毕赤酵母, 酶学性质

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)03-0340-05

木聚糖(Xylan)是半纤维素的重要组分, 在植物细胞壁中的含量仅次于纤维素, 是一种重要的可再生资源^[1]。木聚糖酶(β -1, 4-D-xylanohydrolase, EC3.2.1.8)是一类可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的水解酶, 在饲料、制浆造纸、食品医药等行业中有着广阔的应用前景^[2]。

木聚糖酶广泛存在于微生物中, 目前已从不同来源的微生物中分离到许多不同性质的木聚糖酶, 按照其氨基酸序列的同源性, 木聚糖酶被归入多聚糖代谢酶类的第 10、11 组, 这两组木聚糖酶在作用方式、分子量、净电荷、不带电荷的碱性和酸性氨基酸的比例等方面均有较大差异^[3]。自 70 年代末开展木聚糖酶基因的研究工作以来已有上百种来自细菌和真菌的木聚糖酶基因被克隆并在原核和真核中进行了同源和异源重组表达^[4-7]。通过重组微生物反应器高效表达木聚糖酶, 提高发酵效价, 以进一步降低其生产成本是目前的研究热点之一^[2,3]。

橄榄绿链霉菌(*Streptomyces olivaceoviridis*) A1 所产木聚糖酶 XYNB 是一性质优良的、在目前发现的酶中比活性最高的木聚糖酶(属第 11 组木聚糖酶), 我们已报道了它的纯化、酶学性质研究、基因克隆和在大肠杆菌中的表达^[8], 本研究进一步将 *xynB* 在

毕赤酵母中实现了高效分泌表达, 并对表达的木聚糖酶的酶学性质及对不同木聚糖的酶解产物进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 木聚糖酶基因 *xynB*(EMBL 收录号 AJ292317)为本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 中克隆^[8]; 大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109、质粒载体 pUC19 等为本实验室保存; 毕赤酵母菌株 GS115、表达质粒 pPIC9 为 Invitrogen 公司产品, 由加拿大 Alberta 大学 D. Luo 博士惠赠。

1.1.2 工具酶和生化试剂: 限制性内切酶 *EcoR* I、*Bgl* II、*Kpn* I、*Sma* I 等购自 Gibco 公司; T4 DNA 连接酶和脱糖基化酶(Endoglycosidase H, Endo H)为 Biolab 公司产品; 蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品; 可溶性木聚糖 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (from Birchwood)购自 Sigma 公司; 来源于玉米芯的木聚糖为本研究所石波研究员制备、惠赠; 其它化学试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB、YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 的配制方法见参考文献 [7]。

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA214041)

* 通讯作者。Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

作者简介: 何永志(1976-), 男, 江苏镇江人, 硕士, 从事微生物酶分子生物学研究。E-mail: yongzhihe@163.com

其他作者: 史秀云, 伍宁丰, 范云六

收稿日期: 2003-08-06, 修回日期: 2003-12-24

1.2 方法

1.2.1 酵母重组表达载体的构建:参照文献 [9] 进行。将不带原基因信号肽编码序列的木聚糖酶基因经 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切后以正确的阅读框架插入到毕赤酵母表达载体 pPIC9 的 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切位点,得到重组质粒 pPIC9-xynB。

1.2.2 酵母的电击转化和筛选:将重组质粒 pPIC9-xynB 用 *Bgl* II 酶切使之线性化,电击转化进入毕赤酵母。挑取阳性转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

1.2.3 木聚糖酶活性的测定:采用国际通用的 Somogyi-Nelson 法,在 pH5.0、55℃ 下测定。酶活单位定义:在一定条件下,每分钟分解木聚糖生成 1 μ mol 木糖所需的酶量为 1 个活性单位 (IU)。

1.2.4 重组酵母的培养、诱导表达和检测:重组酵母于 10mL BMGY 中,30℃ 剧烈振摇使细胞生长至饱和状态 (A_{600} 为 10 ~ 20),离心收集菌体,加入 10mL 诱导培养基 BMMY,30℃ 下继续诱导培养,每 12h 取样,测酶活性,直至 72h,筛选出高表达菌株,同时进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 发酵罐水平木聚糖酶的表达:选取摇床水平上表达活性最高的转化子,研究其发酵罐条件下木聚糖酶的表达。挑取转化子单菌落接种于 50mL YPD 液体培养基中,30℃ 摇床培养过夜,转接入 200mL YPD 培养基中,30℃ 摇床培养至 OD_{600} 为 7 ~ 14,接种于盛有 1.5L 培养基(无机盐离子和葡萄糖)的 3.7L 发酵罐(KLF2000 型)中进行发酵。发酵过程在温度 30℃、pH4.5 条件下进行,发酵罐搅拌器转速 1000r/min,发酵过程中溶氧 (dO_2) 不低于 20%。

1.2.6 重组木聚糖酶的纯化和脱糖基化处理:发酵上清液经脱盐柱 Hiprep Desalting 26/10 (Amersham pharmacia biotech 预装柱)脱盐后,再经过分子筛 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech 预装柱)纯化,得到纯蛋白 XYNBa。木聚糖酶的脱糖基化采用在非变性的条件下(酶解时不加入变性剂)进行。取经纯化的重组木聚糖酶酶液 40 μ L (约 40 μ g 蛋白),加入 4 μ L 10 × G5 Buffer 和 2 μ L 脱糖基化酶 Endo H,于 37℃ 反应 1h,得到脱糖基的酶蛋白 XYNBb。来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 的原本木聚糖酶 XYNB 的纯化见参考文献 [8]。

1.2.7 酶学性质的分析:最适 pH 和 pH 稳定性的测定:在不同的 pH 下进行酶促反应以测定其最适 pH。所用缓冲液为 pH2.2 ~ 8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠系列缓冲液,55℃ 下测定酶活性。将酶液在不同

pH 值的缓冲液中于 55℃ 下处理 30min,再在 pH5.0、55℃ 下测定酶活性以研究酶的 pH 稳定性。最适反应温度和热稳定性的测定:在 pH5.0 及不同温度下进行酶促反应测定最适反应温度。耐温性测定为在不同温度(60℃、70℃)下处理,并在不同时间取样后迅速置于冰上,在 pH5.0、55℃ 下测定酶活性。金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响:在酶促反应体系中加入不同的化学试剂,研究不同化学试剂对酶活性的影响。各种化合物(终浓度为 1mmol/L)与酶液在 55℃ 下保温 30min,稀释后在 pH5.0、55℃ 下测定酶活性。 K_m 值及 V_{max} 的测定:用不同浓度的木聚糖底物,在 pH5.0、55℃ 下测定酶活性,利用米氏方程双倒数法求得 K_m 值及 V_{max} 。酶比活性的测定:通过考马斯亮蓝法测定样品酶液中的蛋白含量,同时测得其木聚糖酶酶活性,计算出酶的比活性。比活单位的定义为:每 mg 酶蛋白所含的酶活性单位。纤维素酶活性测定:用 0.5% 甲基纤维素 M20 作底物,按 Somogyi-Nelson 法测定。抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力测定:木聚糖酶用 80U/mL 的胃蛋白酶和 150U/mL 的胰蛋白酶在 37℃ 下分别处理 2h,稀释后测定酶活性。

1.2.8 木聚糖酶解产物的分析:分别以 1% 的桦木木聚糖 (Sigma) 和玉米芯木聚糖 (自制) 为底物,55℃ 充分水解 4h。酶解产物进行薄层层析和高效液相色谱分析。薄层层析中展层剂为正丁醇:吡啶:水为 6:4:3,显色剂为 2% 二苯胺丙酮:2% 苯胺丙酮:85% 磷酸为 5:5:1。硅胶板于展层剂中上行展层 3 次,显色后于 85℃ 烤箱中烤 10min,糖呈蓝灰色斑点。液相色谱分析采用美国 Waters 244 型高压液相色谱仪,柱型号为 Hypersil NH₂ 5m (0.46cm × 30cm),流动相为乙腈:水 70:30,采用归一法计算样品中各组分占有所有出峰组分的百分比。

2 结果

2.1 重组酵母表达载体的构建

xynB 基因通过 *EcoR* I 和 *Sma* I 位点以正确的阅读框架与酵母表达载体 pPIC9 的 α -因子信号肽序列的 3' 端融合,得到重组表达载体 pPIC9-xynB (图 1)。重组质粒通过酶切鉴定,证明其构建是正确的。

2.2 酵母的电击转化和筛选

由于受体菌株 GS115 为 His 为缺陷型 (*His*⁻、*Mut*⁺) 重组载体上带有 *his4* 基因而无酵母复制起始子,这样在不加 His 的基本培养基 RDB 上只有

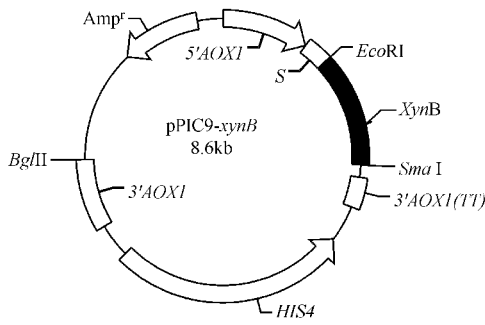


图1 重组表达质粒 pPIC9-xynB 的物理图谱

Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-xynB

his4 整合到酵母染色体上的重组酵母才能正常生长。另外,外源基因同源重组到酵母染色体上后会破坏受体酵母的酒精氧化酶基因,使其不能利用甲醇作为碳源而正常生长,这样,重组子(*Mut^s*)在以甲醇为唯一碳源的 MM 培养基上就不生长或生长缓慢,而在以葡萄糖为碳源的 MD 培养基上能正常生长。通过这些标记,筛选 *His⁺*、*Mut^s* 转化子。重组子在摇床水平上经甲醇诱导 48h,通过酶活测定,从 300 个转化子中筛选到 4 株高效表达木聚糖酶基因的重组子 *P. pastoris* pPIC9-xynB 22、85、95 和 258,木聚糖酶表达量达到 107.8IU/mL、113.6IU/mL、138IU/mL 和 124.3IU/mL 培养基。

2.3 发酵罐水平木聚糖酶的表达

选取在摇床水平上表达量最高的菌株 *P. pastoris* pPIC9-xynB 95 进行 3L 发酵罐水平上的研究。在甲醇未诱导之前,处于菌株培养和碳源饲喂阶段,在这两个阶段内,菌体大量增长,菌体湿重可达 192g/L,但在发酵液上清中检测不到木聚糖酶活性。随着甲醇的诱导,上清中木聚糖酶酶活性显著增加,酶蛋白不断积累(图 2)。甲醇诱导 120h 后蛋白表达量为 1.4mg/mL,木聚糖酶活性(效价)达 1200IU/mL。高于目前文献报道的木聚糖酶基因异源表达的水平^[4-7]。

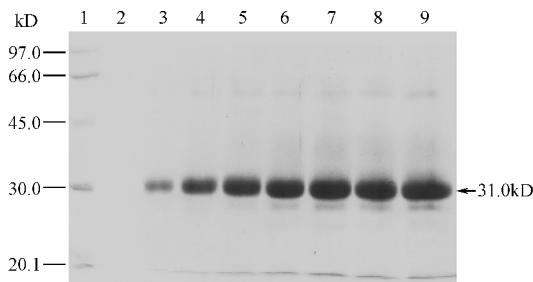


图2 发酵罐中木聚糖酶经甲醇诱导不同时间内的表达量
Fig.2 SDS-PAGE of expressed xylanase proteins in fermentor with different induction time

1. Standard protein molecular weight; 2. Fermentation broth before induced by methanol; 3-9. Fermentation broth after induced by methanol for 12h 24h 36h 48h 72h 96h 120h.

2.4 重组木聚糖酶的纯化和脱糖基化

经纯化重组木聚糖酶 XYNBa 的比活从发酵液的 656.25IU/mg 提高到 883.66IU/mg,回收率为 83%。SDS-PAGE 验证为单一条带,分子量为 31kD,大于橄榄绿链霉菌 A1 所产原酶 XYNB 的 21kD^[8]。对该酶的氨基酸序列进行分析,有 3 处潜在的 N-连接型糖基化位点,进一步对 XYNBa 进行了脱糖基化处理得到 XYNBb,其分子量恢复到 21kD(图 3),说明糖基化修饰是造成表达蛋白分子量偏大的原因。

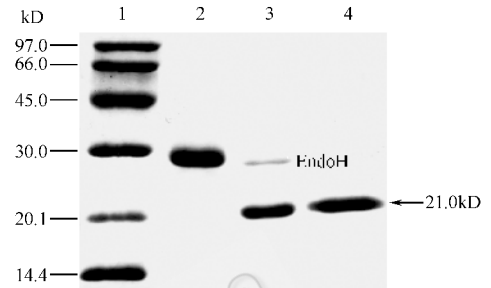


图3 木聚糖酶脱糖基化后的 SDS-PAGE 谱图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of deglycosylation of XYNBa

1. Standard protein molecular weight; 2. Purified XYNBa; 3. XYNBb; 4. XYNB.

2.5 酶学性质的比较

对重组酵母表达的木聚糖酶 XYNBa 以及进一步脱糖基化的 XYNBb 与橄榄绿链霉菌所产原酶 XYNB 的酶学性质进行了比较。结果(表 1)如下:(1) XYNBa 在热稳定性上明显优于 XYNBb 和原酶 XYNB,60℃ 处理 30min,XYNBa 的剩余酶活性为 70%,XYNBb 和原酶 XYNB 分别为 50% 和 49.6%(图 4-A),70℃ 处理 30min,XYNBa 还能保持 20% 的活性,而 XYNBb 和 XYNB 的酶活已基本丧失(图 4-B)。XYNBa 脱糖基化后,热稳定性下降到与原酶相当,证明 XYNBa 热稳定性的提高是由于糖基化导致的;(2)在最适温度上,XYNBa 为 60℃,与原酶一样,说明糖基化作用只提高了酶的热稳定性,而未改变酶的最适反应温度。而 XYNBa 脱糖基化后

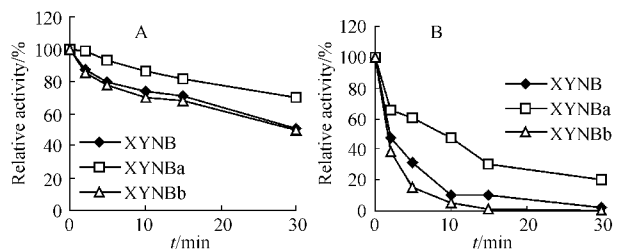


图4 XYNBa、XYNBb 和 XYNB 在 60℃(A)和 70℃(B)下的热稳定性比较

Fig.4 Comparison of thermal stability of xylanase XYNBa, XYNBb and

XYNB treated with EndoH. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1 木聚糖酶 XYNB、XYNBa 和 XYNBb 的酶学性质比较

Table 1 Comparison of enzyme properties of XYNB, XYNBa and XYNBb

Properties of enzyme	XYNB	XYNBa	XYNBb
Optimum temperature / °C	60	60	50
Optimum pH	5.2	5.2	5.0
pH stability	4.0~8.8	3~8.8	4~8.8
Molecular weight/kD	23	31	23
Km(g/Kg)	21.56	20.87	27.10
Vmax($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$)	27623	4568	5329
Specific activity/(IU/mg)	2869.78	883.88	832.51
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	Mg ²⁺ 、Cr ³⁺ activate slightly Mn ²⁺ 、Fe ²⁺ inhibit slightly EDTA、SDS show no effects on activity	K ⁺ 、Ni ²⁺ activate slightly Mn ²⁺ inhibit slightly EDTA、SDS show no effects on activity	Mg ²⁺ 、Ni ²⁺ activate slightly Mn ²⁺ 、Fe ²⁺ inhibit slightly EDTA、SDS show no effects on activity
Cellulase activity	No activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain above 95% of its activity	Retain above 95% of its activity	Retain above 95% of its activity

最适温度下降到 50℃,其原因不明;(3)表达的木聚糖酶,无论是否脱糖基化,其比活性较原酶 XYNB 大幅度下降,仅有原酶的 1/3,同时, V_{max} 也仅有原酶的 1/5 左右,其原因正在进一步研究之中;(4)在其他酶学性质上,三者之间没有显著差异。

2.6 木聚糖酶解产物的分析

以 1% 的桦木木聚糖(Sigma 公司产品)和玉米芯木聚糖(粗制品)为底物,加入过量酶液充分降解,酶解产物的薄层层析表明:桦木木聚糖酶解产物中主要成分为木三糖、木二糖和木四糖;玉米芯木聚糖酶解产物中主要成分为木二糖和木三糖。酶解产物的 HPLC 分析进一步证实了薄层层析的结果,并得到酶解产物中各种糖分的百分含量:桦木木聚糖酶解产物中主要是木三糖,占 68.43%,木二糖和木四糖分别占 11.79% 和 16.50%,木糖的比例仅占 3.28%。玉米芯木聚糖酶解产物中主要是木二糖,占 81.78%,有少量的木三糖,占 11.55%,木糖比例仅有 0.95%,无木四糖。2 种木聚糖酶解产物中低聚木糖的比例均在 95% 以上。

3 讨论

毕赤酵母中分泌表达蛋白常有糖基化的现象^[10],毕赤酵母表达的木聚糖酶 XYNBa 的分子量为 31kD,大于橄榄绿链霉菌 A1 所产原酶 XYNB 的 21kD^[8]。通过对氨基酸序列分析,发现有 3 处潜在的 N-连接型糖基化位点(Asn7-Gln8-Thr9, Asn36-Tyr37-Ser38, Asn186-Ile187-Thr188),脱糖基化实验进一步证实 XYNBa 为糖蛋白。糖基化作用不仅与

蛋白分泌出细胞有一定关系,还能通过对构象的改变增强蛋白的稳定性^[11]。据 Jiang 的报道^[12],用毕赤酵母表达的重组脂肪酶糖基化后,耐热温度从 52℃ 升至 58℃,而其它性质与大肠杆菌表达的非糖基化脂肪酶没有明显的差异。在本实验中,毕赤酵母表达的木聚糖酶 XYNBa,由于糖基化的作用,在热稳定性上明显优于原酶 XYNB 及脱糖基化的 XYNBb。

原酶 XYNB 其比活性高达 2869.78U/mg^[8],高于目前报道的各种来源的木聚糖酶。这种高比活的木聚糖酶除了具有较好的应用价值外,也是木聚糖酶催化机理研究的优良材料。但此酶经酵母表达后比活性大幅度下降,已证明不是因糖基化造成的,且表达酶的 N 端部分氨基酸序列测定结果也与原酶一致,其原因还需进一步研究。

利用木聚糖酶生产低聚木糖是目前的研究热点之一,酶法制备由于水解条件温和、无毒性副产物产生、产物均一等优点已成为低聚木糖的理想制备方法^[2,13]。除了木聚糖酶的应用成本外,酶解产物中存在大量木糖而使低聚木糖分离困难是目前存在的主要问题。使用通过基因工程技术生产的高纯度内切型木聚糖酶则能避免木糖的产生,获得高纯度的低聚木糖。本研究利用重组毕赤酵母表达的内切木聚糖酶,不同木聚糖经该酶降解后,产物为以木二糖、木三糖、木四糖为主的低聚合度的木寡糖,占总糖含量的 95% 以上,而木糖的含量极低,使其在低聚木糖的大规模制备方面具有巨大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Gregory A C E, O'Connell A P, Paul B G. Xylans. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1998, **15**(4): 439 - 455.
- [2] Subramaniam S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, **22**(1): 33 - 64.
- [3] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, **23**: 411 - 456.
- [4] Nicolas P, Dieter K, Francois S, et al. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: Dependence on number of ribosome-binding sites. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 756 - 759.
- [5] Ruiz-Arribas A, Fernandez-Abalos J M, Sanchez P, et al. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xysl) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **61**(6): 2414 - 2419.
- [6] Rose S H, van Zyl W H. Constitutive expression of the *Trichoderma reesei* beta-1,4-xylanase gene (*xyn2*) and the beta-1,4-endo-glucanase gene (*egl*) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(4): 461 - 468.
- [7] Zhang H L, Yao B, Wang Y R, et al. Expression of xylanase gene *xynA* from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Chinese J Biotechnol*, 2003, **19**(1): 76 - 80.
- [8] Zhang H L, Yao B, Wang Y R, et al. Characterization, gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(8): 761 - 765.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Roger K, Francis J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, **30**: 193 - 200.
- [11] Tang S J, Shaw J F, Sun K H, et al. Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Pichia pastoris*: comparison of glycosylation, activity, and stability. *Arch Biochem Biophys* 2001, **387**(1): 93 - 98.
- [12] Jiang S T, Chen G H, Tang S J, et al. Effect of glycosylation modification (N-Q(108)I- > N-Q(108)T) on the freezing stability of recombinant chicken cystatin overexpressed in *Pichia pastoris* X-33. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**(19): 5313 - 5317.
- [13] Jeong K J, Park I Y, Kim M S, et al. High-level expression of an endoxylanase gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the production of xylobiose from xylan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**(1): 113 - 118.

Overexpression of *Streptomyces olivaceoviridis* A1 Xylanase with High Specific Activity and Analysis of Enzymic Properties

HE Yong-Zhi YAO Bin* WANG Ya-Ru YUAN Tie-Zheng LUO Hui-Ying

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: High-level expression of xylanase with high specific activity is an effective way to improve xylanase fermentation potency in recombinant host and decrease its production costs. The gene *xynB* encoding the mature protein of xylanase with high specific activity from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 was cloned into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9 and introduced into the host *Pichia pastoris* by electroporation. The results of SDS-PAGE and activity assay of the xylanase expressed by recombinant *P. pastoris* showed that the xylanase gene *xynB* was overexpressed and secreted, and the expressed xylanase had normal bioactivity. In 3L fermentor, the expression level of xylanase protein in recombinant *P. pastoris* was 1.4mg/mL, and the xylanase activity exceeded 1200IU/mL. The results of SDS-PAGE showed that the expressed xylanase (XYNBa) could be modified by glycosylation, had a single apparent molecular weight of about 31kD, while the deglycosylated xylanase (XYNBb) treated with Endo H had an apparent molecular weight of about 21kD, which was as same as that of original xylanase (XYNB) from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. The results of the researches on enzymatic properties revealed that there were remarkable differences on specific activity, V_{max} and thermal stability among XYNB, XYNBa, XYNBb. The analysis of enzymatic hydrolysate for different xylans revealed that the main constitutions of enzymatic hydrolysate were xylobiose, xylotriose and xyloquaiose, which account for more than 95% of all hydrolysate.

Key words: Xylanase with high specific activity, Overexpression, *Pichia pastoris*, Enzymatic properties

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214041)

* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

Other authors: SHI Xiu-Yun, WU Ning-Feng, FAN Yun-Liu

Received date: 08-06-2003