

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

杨梦华¹ 李颖^{1*} 关国华¹ 江正强²

(¹中国农业大学生物学院 北京 100094)

(²中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要:以海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8 菌株基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增出木聚糖酶(XylanaseB)基因,将此基因克隆至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+)和毕赤酵母表达载体 pPIC9K,并分别转化大肠杆菌 BL21 和毕赤酵母 GS115。该木聚糖酶在大肠杆菌细胞中表达量高,但不能分泌;而在毕赤酵母细胞的表达产物可分泌至胞外。酶学性质分析表明,此酶分子量约为 40kD,其最适反应温度为 90℃,最适反应 pH 值为 6.65,且在碱性条件下稳定,具有重要的工业应用前景。

关键词: 耐高温木聚糖酶,大肠杆菌,巴斯德毕赤酵母,重组蛋白,异源表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0236-05

β -1,4-D-木聚糖水解酶(EC3.2.1.8)能降解木聚糖主链上木糖残基之间的 β -1,4 糖苷键,从而把多糖的碳链骨架降解成短链的木寡糖^[1]。因此木聚糖酶在食品、饲料、造纸等工业领域上有着广泛的应用价值。Winterhalter 等^[2]在 1995 年首次克隆了海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 的木聚糖酶 A(XynA)基因,并将其在大肠杆菌中表达成功;同年 Christoph 等^[3]也从该菌中纯化得到木聚糖酶 B(XynB),并报道了其主要的酶学性质,由此获知该木聚糖酶 B(XynB)最适反应温度高、热稳定性好以及在偏碱性的条件下稳定,具有适合于工业应用的理想特性。但此后并没有看到关于该酶应用于生产的报道。分析其原因可能在于,其一,在原始菌株中该酶表达量很低,加之菌株为严格厌氧的极端耐热菌,培养困难;其二,尽管 Jiang 等^[4]将其基因在大肠杆菌中表达,但该酶不能分泌,须进行破壁提取,因而限制了其在工业上的应用。

巴斯德毕赤酵母表达系统近年来被广泛应用,由于其可将目的基因产物分泌至胞外,受到人们的广泛关注,已成功表达多种外源蛋白^[5-7]。极端环境微生物的生存特点决定了它们可能具有的特殊功能,本研究克隆了海栖热袍菌 MSB8 菌株木聚糖酶(XynB)的基因,并分别在大肠杆菌和毕赤酵母中高效表达,从而为工业应用提供了新的酶资源。

1 材料和方法

1.1 菌株、载体和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B、BL21 及表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存;质粒 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司;巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 及其表达载体 pPIC9K 由广西大学黄日波教授馈赠;海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) MSB8 菌株基因组 DNA 由中国农业大学食品学院江正强副教授提供。

各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, G418、木聚糖酶的底物燕麦木聚糖(Oat speltis xylan)和 Remazol Brilliant Blue R-D-Xylar(RBB-Xylan)以及酶活测定相关试剂对胺基二甲基苯肼(PHBAH)购自 Sigma 公司。引物合成及序列测定均由上海 Sangon 公司完成。

1.2 表达载体的构建

根据 GenBank 中 XynB 基因的序列以及大肠杆菌和毕赤酵母表达载体上的多克隆位点的特征,设计合成了以下两对引物: P₁: (FW) 5'-ATA GCGGCCGC TATGAAAATATTACCTTCTGTG-3'; P₂: (REV) 5'-ATAGCGGCCGCTCATTTTCTTTCTTCTATCTTTT-3'; P₃: (FW) 5'-CCCCATGGAAATATTACCTTCTGTGTTG-3';

基金项目: 国家 863 计划(2001AA214171)

* 通讯作者。Tel 86-10-62733751 E-mail yingli528@vip.sina.com

作者简介: 杨梦华(1978-),女,广东人,硕士研究生,从事真菌遗传学研究。

收稿日期: 2004-08-19, 修回日期: 2004-10-25

P₄ : (REV) 5'-CCCAAGCTTCTTTCTTCTATCTTTT-TCTCC-3'.

引物 P₁、P₂ 分别设计有 *Not* I 酶切位点, P₃、P₄ 两端分别设计有 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点(下划线部分)。分别以 P₁/P₂ 或 P₃/P₄ 作为引物,以海栖热孢菌 MSB8 菌株基因组 DNA 作为模板,反应体系(20 μ L): 10 \times Buffer(含 Mg²⁺) 2 μ L; dNTP(各 2.5mmol/L) 0.5 μ L; 正、反向引物各(10pm/ μ L) 0.5 μ L; 模板(1ng/ μ L) 1 μ L; *Taq* 酶(10U/ μ L) 0.2 μ L; ddH₂O 15.3 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增得到两个两端带有不同酶切位点的木聚糖酶 *xynB* 基因片段。扩增产物分别回收并连接至 pGEM-T Easy 载体,转化大肠杆菌 DH10B,提取重组质粒酶切鉴定,经序列测定分析,保证其阅读框正确。将以 P₃-P₄ 为引物扩增获得的 PCR 产物经 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切后,再连接至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+),以 P₁-P₂ 为引物的扩增产物经 *Not*I 酶切后,连接至毕赤酵母表达载体 pPIC9K,将重组质粒 pPIC9K-*xynB* 转化大肠杆菌 DH10B,挑选出阳性转化子。

1.3 转化及转化子表型鉴定

将大肠杆菌表达载体 pET-28a-*xynB* 电击转化 BL21 菌株,在含卡那霉素的抗性平板上筛选转化子,提取质粒并进行酶切鉴定。提取质粒 pPIC9K-*xynB* 经 *Sal* I 酶切线性化后,电击法转化毕赤酵母 GS115 菌株,采用不含组氨酸的 MD (Minimal dextrose) 平板 [1.34% YNB, 2% Glucose, (4 \times 10⁻⁵)% Biotin, 1.5% Agar] 筛选出发生同源重组的 His⁺ 转化子,然后将阳性克隆分别点接在 MD 和 MM (Minimal methanol) 平板上,进行 Mut⁺/Mut⁻ 表型鉴定。在两种平板均能正常生长的转化子为 Mut⁺/His⁺ 型,而在 MD 平板上能正常生长,在 MM 平板上不生长或者生长缓慢的为 Mut⁻/His⁺ 型。

1.4 用 G418 浓度梯度筛选毕赤酵母高拷贝转化子

取 2mL 无菌水将在 MD 平板上生长的转化子洗脱并悬浮,轻微的振荡后稀释,以 10⁵/mL 的细胞浓度分别在含 G418 浓度为 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 和 6.0mg/mL 的 YPD 平板(每升含 Yeast Extract 10g, Peptone 20g, Glucose 20g, Agar 20g) 上涂布,挑选在含 6.0mg/mL G418 的平板上生长的转化子,再经含 8.0mg/mL G418 的培养液筛选。

1.5 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

挑取大肠杆菌阳性转化子于 5mL 含 50 μ g/mL

LB (Kan⁺) 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~13h,以 1% 的接种量转接到装有 50mL 相同培养基的 500mL 三角瓶中,加入 50 μ L 1mol/L IPTG,于 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 16h 后,离心收集菌体,用 5mL 50mmol/L MES 缓冲液(pH6.5)悬浮细胞,于冰浴中用超声波破碎细胞,离心取上清在 70 $^{\circ}$ C 下水浴 20min,再次离心,除去不耐热且变性的杂蛋白,将上清进行 SDS-PAGE 检测。

挑选具有高拷贝数的 His⁺/Mut⁺ 的毕赤酵母阳性转化子,接种于 5mL BMGY 培养基[每升含 Yeast extract 10g, Peptone 20g, 100mmol Potassium phosphate, pH6.0, 1.34% YNB, Glycerol 10g, (4 \times 10⁻⁵)% Biotin] 于 30 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 6.0 左右,离心收集菌体,转接到装有 50mL BMMY 培养基(BMGY 培养基中的 1% Glycerol 改为 0.5% Methanol) 的 500mL 三角瓶中,继续培养,每 12h 补加 100% 甲醇于培养基至终浓度为 0.5%,诱导表达 7d。离心弃去细胞,收集上清,70 $^{\circ}$ C 下水浴保温 20min 后离心取上清,经透析除盐并超滤浓缩后进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 重组木聚糖酶活性测定和酶学性质分析

木聚糖酶 *XynB* 酶活检测采用 RBB-木聚糖酶法^[8]。酶反应温度设定为 70 $^{\circ}$ C。1 个酶活单位 (Unit) 定义为:在上述反应条件下,测定 OD₅₉₅ 数值每分钟上升为 1 时所需的酶量为 1 个酶活单位。最适 pH 值和 pH 稳定性的测定采用如下缓冲体系: MES (pH 5.59~7.37), MOPS (pH 7.8), CHES (pH 8.64~10.18) 及 CAPS (pH 10.8)。pH 稳定性的测定采用将酶液在与各缓冲液混合后,70 $^{\circ}$ C 下保温 30min,置冰浴中冷却 30min 后,测定其残留酶活。酶反应最适温度的测定在 0~100 $^{\circ}$ C 的范围内进行;另将酶液分别置于各温度条件下保温 30min 后,置冰浴中冷却后测定其残留酶活,从而确定该酶在不同温度下的稳定性。

根据文献报道,本实验还尝试了采用 PHBAH 法^[9]测定酶活,用燕麦木聚糖作为底物,反应温度设定为 70 $^{\circ}$ C。1 个酶活单位定义 (One international unit) 为:每分钟释放 1 μ mol 木糖所需的酶量为 1 个酶活单位。

大肠杆菌粗酶提取液的蛋白质含量及毕赤酵母诱导培养液上清经处理后的蛋白质含量,均采用考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法)^[10] 进行测定。

2 结果和分析

2.1 表达载体 pET-28a-*xynB* 和 pPIC9K-*xynB* 的构建

以 P3、P4 为引物扩增出的 *xynB* 基因片段大小约为 1.0kb, PCR 产物经 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切后连接至 pET-28a (+) 上, 构建成大肠杆菌表达载体 pET-28a-*xynB*。重组质粒 pET-28a-*xynB* 经 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切检测, 得到外源片段 (~1.0kb) 和载体 pET-28a (5.4kb) 大小; 重组质粒 pET-28a-*xynB* 经 *Hind* III 酶切检测, 得到 6.4kb 的片段。

用 P1、P2 引物扩增出的 *xynB* 基因(约 1.0kb) 经 *Not* I 酶切后, 连接至毕赤酵母表达载体 pPIC9K-*xynB*。重组质粒 pPIC9K-*xynB* 经 *Not* I 酶切检测, 外源片段 (~1.0kb) 和载体 pPIC9K (9.3kb) 大小正确, 重组质粒 pPIC9K-*xynB* 经 *Sal* I 酶切检测得到 10.3kb 的片段。从 pPIC9K-*xynB* 5' 端再次测序, 得到外源基因正向插入的表达载体 pPIC9K-*xynB*。pPIC9K 上含有酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 α 因子的前导肽 (α -Factor secreted signal) 序列, 可引导表达产物分泌至胞外。

分析 pET-28a-*xynB* 与 pPIC9k-*xynB* 上 *xynB* 基因的测序结果, 发现两个目的片段完全一致。基因全长为 1044 个碱基对, 对应于 348 个氨基酸。将此序列与 Karen E. Nelson 等在 GenBank 中注册的木聚糖酶基因 *xynB* (AF100063) 进行同源比较, 得知我们获得基因的第 64 位碱基与前人公布的序列有所不同, 由腺嘌呤 (A) 改变为鸟嘌呤 (G), 因此该基因产物的第 22 位氨基酸也相应的由天冬酰胺 (Asn) 转变为天冬氨酸 (Asp)。该基因被命名为 *mxynB*₍₆₄₎, 已将其在 GenBank 中注册, 注册号为 AY340789。

2.2 毕赤酵母高拷贝转化子的筛选

由于毕赤酵母中表达质粒的拷贝数与平板中 G418 的浓度具有一定的比例关系, 因此利用含有不同浓度的 G418 的 YPD 平板可以快速推测出整合至基因组的外源基因的拷贝数^[11]。将 MD 平板上长出的酵母转化子, 经无菌水悬浮后, 稀释 200 倍 (约 10^5 cells/mL), 在含有 G418 (6mg/mL) 的 YPD 平板上挑选了 4 个转化子 (GS115-9K-*xynB* I、II、III、IV), 分别接种到含有 G418 (10mg/mL) 的 YPD 液体培养基中, 摇床培养表明这 4 个转化子都生长良好, 推测每个转化子基因组整合外源木聚糖酶基因约 20 个拷贝左右。分别挑选这 4 个转化子进行摇瓶诱导培养, 发现其外源蛋白表达分泌量基本相同, 随机挑选

出其中一个转化子进行后续实验。

2.3 重组蛋白的表达和酶活检测

大肠杆菌 BL21-*xynB* 经 IPTG 诱导培养, 细胞经超声波破碎, 离心收集上清, 此粗酶提取液在 70°C 处理 20min 后再次离心收集上清, 经 SDS-PAGE 检测重组蛋白。图 1-A 泳道 1 和 2 是培养过程中采用 IPTG 诱导后所获得的表达产物, 目的蛋白量大, 而未加诱导物的表达产物 (图 1-A 泳道 3 和 4) 在相同蛋白上样量的情况下, 目的蛋白量明显少些。挑选毕赤酵母阳性转化子 GS115-9K-*xynB* II (Mut⁺/His⁺) 及阴性对照 GS115-9K, 在含有甲醇的培养基中诱导表达 7d, 收集培养液, 由于分泌蛋白量少, 将培养液先经 70°C 处理 20min 后离心, 再经超滤膜超滤浓缩 15 倍后, 进行 SDS-PAGE 检测 (图 1-B)。从两个蛋白电泳图中可见, 在约 40kD 左右都有一条明显的蛋白带 (图中箭头所指处), 证明蛋白大小与从该木聚糖酶氨基酸序列估计的蛋白分子量相符。

在相同条件下, 采用 PHBAH 法在 70°C 进行初步酶活检测表明, 在重组大肠杆菌的粗酶提取液中, 木聚糖酶的比活为 67U/mg, 而在重组毕赤酵母诱导培养液上清中, 木聚糖酶比活为 50U/mg。

在摇瓶培养的条件下, 毕赤酵母向培养液中分泌的目的蛋白量并不多, 很可能是由于摇瓶中供养和通气不足所致。为了进一步研究毕赤酵母中异源表达的重组木聚糖酶的应用价值, 随后对其进行了初步的性质分析。

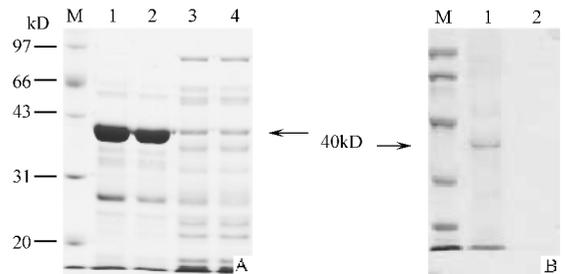


图 1 重组木聚糖酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis for the XynB in *E. coli* (A) and *P. pastoris* (B)

M, Molecular weight marker; A: 1 and 2, The expressed protein in *E. coli* induced by IPTG; 3 and 4, The expressed protein in *E. coli* without induction; B: 1, Recombinant protein secreted by GS115-9K-*xynB*; 2, Negative control of GS115-9K. The XynB showed as arrowhead.

2.4 pH 和温度稳定性

由于目的基因来源于极端耐热菌, 该木聚糖酶具有良好的热稳定性。因此在测定其酶学性质时, 将 RBB-木聚糖酶法^[7]中的测定温度由原方法建议

的 50℃ 提高至 70℃。实验结果显示,该木聚糖酶的最适反应 pH 值为 6.65;在 70℃ 反应条件下,该酶在不同 pH 值(5.59~10.8)的范围内处理 30min 后,仍能保持最大酶活力的 80%(图 2-A)。

从最适温度及温度稳定性的测定结果可知,该酶最适反应温度为 90℃;如果以 90℃ 时测定的酶活定义为 100%,该酶在 100℃ 处理 30min 后,仍能保留最大酶活力的 70%(图 2-B)。由此可见,该木聚糖酶具有在高温和偏碱性条件下稳定的特点,尤其适用于造纸工业中纸浆漂白的工艺。

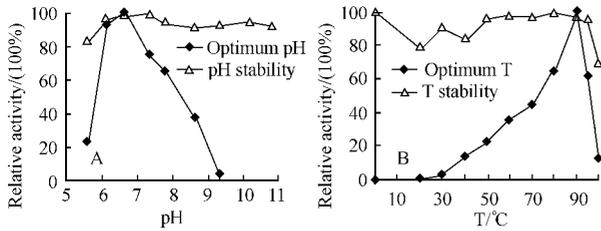


图 2 pH 值和温度对木聚糖酶(XynB)酶活的影响

Fig.2 Effects of pH (A) and temperature (B) on XynB relative activity

3 讨论

海栖热袍菌 MSB8 菌株的耐高温木聚糖酶基因可在大肠杆菌和毕赤酵母中均实现高效表达,该木聚糖酶序列第 22 位氨基酸与前人公布的不一致,但其酶学性质良好,在高温及偏碱性的条件下稳定,与 Jiang 等所报道的略有差异,主要表现在最适 pH 值^[4]。该酶最适 pH 为 6.65,高于 Jiang 等报道的 pH 6.14,是否由于第 22 位氨基酸不同所致,还须探讨。此外, Jiang 等采用 RBB 法测定酶活,温度条件为 50℃,而我们用相同的方法,发现提高反应温度在 70℃ 时,测定效果最好。由于文献报道测定木聚糖酶的方法不统一,如 DNS 法^[3],RBB 法和 PHBAH 法,不同方法中所用底物、反应温度有差别,酶活的计算方法不同,各文献报道的数据缺乏严格的可比性,有人建议耐热木聚糖酶酶活测定最好采用 PHBAH 法^[9]。本实验中比较过同一种酶 3 种方法的测定结果,发现用 RBB-木聚糖酶法推算的酶活数据一般高于 PHBAH 法 2~3 倍,DNS 法测定结果比 RBB 法高 2 倍左右,比 PHBAH 法高 5~6 倍,但无论采用哪种方法测定, $m_{xynB_{64}}$ 基因表达产物的酶活都高于前人的报道。

尽管目前对于大肠杆菌胞内重组蛋白的提取并不困难^[12],但是,如果重组蛋白可以直接被分泌到胞外,会更有利于工业化的应用。酵母具有生长速

度快,便于操作等优点。近年来酵母表达系统已成功应用于生物技术领域和工业生产中,包括多形汉逊酵母、巴斯德毕赤酵母和乳酸克鲁维酵母等表达体系,均在不同程度上表达了许多外源蛋白基因^[13]。Berquist 等^[14]克隆了来自于 *Thermotoga* strain FjSS3B.1 的木聚糖酶(XynA)基因,并在乳酸克鲁维酵母中表达。作为甲基营养型的毕赤酵母表达系统具有许多优点^[15],较另外两种系统应用更为广泛^[16~20]。本研究利用该系统表达耐高温木聚糖酶基因 $m_{xynB_{64}}$,重组木聚糖酶作为一种主要的蛋白产物被分泌到胞外,可有效地简化后续的纯化步骤。本实验所构建的重组毕赤酵母菌株在 500mL 摇瓶诱导培养,外源蛋白分泌量较低,推测主要与摇瓶培养中供氧受到限制有关,而且当细胞达到一定密度时($OD_{600} = 20$),摇瓶中养料的缺乏和代谢产物的增多都会对外源蛋白的表达和分泌造成一定的影响。在随后进行的发酵罐高密度培养细胞的实验中,采取适当调节氧分压和定量流加诱导剂及营养成分的策略,在 5L 自动发酵罐中诱导培养 5d 后测定,结果分泌到胞外的目的蛋白量已达 207mg/L,以 PHBAH 方法测定得知该酶比活达 577U/mg 蛋白(资料另附),由此看来,这个来源于细菌的木聚糖酶基因在真核细胞中分泌表达尚有一定潜力。优化培养正在进行,有望进一步提高重组蛋白的分泌能力。本实验所构建的重组毕赤酵母菌株所表达的木聚糖酶,具有耐高温和偏碱性条件下稳定的特点,因而它具有重要的工业应用价值。

参 考 文 献

- [1] Neeta K, Abhay S, Mala R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, **23**: 411 - 456.
- [2] Winterhalter C, Heinrich P, Candussio A, et al. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol*, 1995, **15**(3): 431 - 444.
- [3] Winterhalter C, Liebl W. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(5): 1810 - 1815.
- [4] Jiang Z Q, Kiyoshi H, Mohammad M A, et al. Characterization of a thermostable family 10 endo-xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-beta-D-xyloside. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **92**(5): 423 - 428.
- [5] Chen X H, Ao J Q, Yang L, et al. Expression of human interleukin-12 gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **18**(4): 473 - 477.

- [6] Kalidas C , Joshi L , Batt C. Characterization of glycosylated variants of β -lactoglobulin expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Engineering* , 2001 , **14** (3) 201 – 207.
- [7] Rodriguea E , Mullaney E J , Lei X G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communication* , 2000 , **268** 373 – 378.
- [8] Biely P , Mislovicova D , Toman R. Remazol brilliant blue-xylan A soluble chromogenic substrate for xylanase. *Methods Enzymol* , 1988 , **160** 536 – 541.
- [9] Lever M. Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochemical Medicine* , 1973 , **7** 274 – 281.
- [10] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术(第二版).北京:高等教育出版社,1997,138–140.
- [11] Scorer C A , Clare J J , McCombie W R. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *BioTechnology* , 1994 , **12** :181 – 184.
- [12] Shirgaonkar I Z , Lothe R R , Pandit A B. Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and high-speed devices. *Biotechnol Prog* , 1998 , **14** (4) 657 – 660.
- [13] Gellissen G , Hollenberg C P. Application of yeasts in gene expression studies : a comparison of *Saccharomyces cerevisiae* , *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* , 1997 , **190** 87 – 97.
- [14] Walsh D J , Gibbs M D , Bergquist P L. Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile , *Thermotoga* strain FjSS3B.1 , in *Kluyveromyces lactis*. *Extremophiles* , 1998 , **2** :9 – 14.
- [15] Cregg J M , Vedvick T S , Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* , 1993 , **11** 905 – 910.
- [16] Berrin J G , Williamson G , Puigserver A , et al. High-level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Engineer and Purification* , 2000 , **19** :179 – 187.
- [17] Damaso M T , Almeida M S , Kurtenbach E , et al. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , **69** 6064 – 6072.
- [18] 江正兵,宋慧婷,马立新.短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究.生物工程学报,2003,19(1):49–55.
- [19] 陆键,曹钰,陈坚.运用定点突变提高重组木聚糖酶在毕赤酵母中的表达.微生物学报,2002,44(4):425–430.
- [20] 张红莲,姚斌,王亚茹,等.链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* AI 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达.生物工程学报,2003,19(1):41–45.

High-level expression of an extreme-thermostable xylanase B from *Thermotoga maritima* MSB8 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*

YANG Meng-hua¹ LI Ying^{1*} GUAN Guo-hua¹ JIANG Zheng-qiang²

(¹ College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

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

Abstract : The family 10 xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* MSB8 is extremely thermostable and great potential in the applications of various fields of industry. The gene *mxynB*₍₆₄₎ was amplified by the method of PCR with the template of the genomic DNA of *Thermotoga maritima* MSB8 , and cloned into the expression vectors of *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* respectively. Xylanase B (40kD) was successfully expressed by the two heterologous protein expression systems with high-level production. The recombinant protein of XynB expressed in *Pichia pastoris* showed extreme thermostability and pH stability , which was optimally active at 90°C and quite stable over the pH range of pH 5.0 ~ 10.8 at 70°C. After incubation of the enzyme at 100°C for 30min , XynB retained 70% higher residual activity. The recombinant XynB expressed in *Pichia pastoris* is of great use in a variety of industrial and agricultural applications.

Key words : Thermostable xylanase , *Escherichia coli* , *Pichia pastoris* , Recombinant protein , Heterologous expression

Foundation item : National Programs for High Technology Research Development (2001AA214171)

* Corresponding author. Tel 86-10-62733751 ; E-mail : yingli528@vip.sina.com

Received date 08-19-2004