

酶活提高的木聚糖酶及其制备方法

5 相关申请的交叉援引

本申请要求申请号为 CN202311613123.8、申请日为 2023 年 11 月 28 日的中国专利申请的优先权，该申请通过引用将其全部内容并入本文。

技术领域

10 本发明涉及木聚糖酶以及编码所述木聚糖酶的多核苷酸。本发明还涉及包含这些多核苷酸的重组载体和宿主细胞，以及制备这些木聚糖酶和宿主细胞的方法。

背景技术

木聚糖酶作为降解木聚糖的一类酶，在饲料行业具有重要作用。通过将饲料中动物
15 无法消化利用的抗营养因子-木聚糖解聚为低聚糖、木糖和阿拉伯糖等，消除抗营养因子，进一步提高饲料资源利用率，另外还有效减少动物排泄造成的环境污染，对于提高养殖经济效益、发展环境友好型畜牧业具有举足轻重的意义。木聚糖酶种类繁多，但应用于饲料行业对木聚糖酶的热稳定性需求度较高，需要满足饲料高温造粒的工艺要求。其中，来源于瘤胃真菌（*Neocallimastix patriciarum*）的 GH11 家族木聚糖酶，具有较高的酶活和较好的耐热性能。Chen et al 通过对来源于 *Neocallimastix patriciarum* 的木聚糖
20 酶进行随机突变，筛选到了比酶活和碱性表现更好的重组木聚糖酶 Xyn-CDBFV（Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase, 2001 Dec; 47(12):1088-94. doi: 10.1139/w01-118）。

此后，研究者围绕 Xyn-CDBFV 进行了大量关于如何提高比酶活及耐热性能方面的
25 改造。例如，Zhang et al 通过将碳水结合模块 CBM 与 CDBFV 融合表达在毕赤酵母中，有效提高了木聚糖酶水解还原糖的比例。中国专利 CN 114807093 A 通过在 C 端添加融合肽段的方式，显著提高了木聚糖酶 Xyn-CDBFV 的热稳定性。Cui et al 通过将溶菌酶的 N 端与木聚糖酶 Xyn-CDBFV 的 C 端在毕赤酵母中融合表达的方式，实现了重组溶菌酶与木聚糖酶的高规格生产，为复合饲料的工业化应用提供了新思路。

30 目前，众多研究者将木聚糖酶 Xyn-CDBFV 通过添加肽段或融合表达的方式在毕赤酵母中进行了重组木聚糖酶的研究。但酵母在表达一些异源蛋白时存在过度修饰和蛋白折叠等问题，从而影响异源蛋白的表达量和稳定性，并且由于毕赤酵母在生产异源蛋白时，通常需要甲醇进行诱导，在实际的工业生产中存在一定的危险性。因此，在新平台开发获得高酶活、热稳定性优异的新型木聚糖酶产品具有重要的意义，能够有效降低生
35 产成本。

发明内容

本发明提供了木聚糖酶，其包含木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列，以及连接在其 C 端的融合肽段，所述融合肽段包含 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述融合肽段还包含 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中，所述融合肽段由 SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列如 SEQ ID NO：3 所示。

10 在一些实施方案中，所述木聚糖酶包含如 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述木聚糖酶包含如 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述木聚糖酶由 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列组成。在一些实施方案中，所述木聚糖酶由 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列组成。

本发明还提供了编码所述木聚糖酶的多核苷酸。

15 在一些实施方案中，所述多核苷酸包含如 SEQ ID NO：6 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多核苷酸包含如 SEQ ID NO：7 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多核苷酸由 SEQ ID NO：6 所示的核苷酸序列组成。在一些实施方案中，所述多核苷酸由 SEQ ID NO：7 所示的核苷酸序列组成。

本发明还提供了包含所述多核苷酸的重组载体，以及包含所述多核苷酸或重组载体的宿主细胞。

在一些实施方案中，所述宿主细胞为黑曲霉或毕赤酵母。在一些实施方案中，所述宿主细胞为黑曲霉。

20 本发明还提供了制备木聚糖酶的方法，其包括在包含木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列的 C 端连接融合肽段，所述融合肽段包含如 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述融合肽段还包含 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述融合肽段由 SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列组成。

25 在一些实施方案中，所述木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列如 SEQ ID NO：3 所示。

本发明进一步提供了制备产生木聚糖酶的黑曲霉菌株的方法，其包括将所述重组载体导入黑曲霉菌株中。

30 在一些实施方案中，所述重组载体包含黑曲霉表达框序列，所述黑曲霉表达框序列包含黑曲霉糖化酶基因 gla 启动子序列、黑曲霉淀粉酶信号肽核苷酸序列、如 SEQ ID NO：6 或 7 所示的木聚糖酶核苷酸序列、黑曲霉糖化酶基因 gla 终止子序列。

在一些实施方案中，所述方法包括在导入所述重组载体后，用选择标记 amdS 平板对黑曲霉菌株进行筛选。

本发明还提供了所述木聚糖酶在饲料中的应用。

35 本发明的有益效果为：通过在 GH11 家族木聚糖酶 Xyn-CDBFV 的 C 端添加特定融合肽段的方式，可解决 Xyn-CDBFV 在黑曲霉平台表达无酶活的问题，并且本发明提供

的木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 在黑曲霉平台表达后，与木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 在毕赤酵母中的表达相比，酶活水平显著提高。

附图说明

5 图 1 比较了黑曲霉平台重组木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 在 50L 发酵罐水平的酶活表现。

图 2 比较了酵母平台重组木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 在 50L 发酵罐水平的酶活表现。

10 具体实施方式

除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同含义。

本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用将其全文并入本文。在有矛盾的情况下，以本说明书（包括定义）为准。另外，本文中所述的材料、方法和实例仅为说明性的，而并非旨在为限制性的。

术语“约”与数字变量一起使用时，一般意指该变量的值和该变量的全部值在测量或实验误差内（例如平均值的 95% 置信区间）或在更宽范围的指定值以内（例如 $\pm 5\%$ 或 $\pm 10\%$ ）。

术语“包含”或其变形形式例如“含有”、“具有”、“包括”是指包括所述的步骤或要素，但不排除任何其他步骤或要素。“由……组成”是指不包括没有列出的步骤或要素。术语“包含”特定步骤或要素及其变形形式也包括“由特定步骤或要素组成”和“基本上由特定步骤或要素组成”的情况。

当提及数值范围时，应视为具体公开了其上限和下限的具体值，以及其所包括的所有中间范围，例如在其上限或下限与任一中间值之间的中间范围，或者在其任意两个中间值之间的中间范围。并且，所述数值范围中所描述的任何中间范围、子范围以及所有单个数值可以从所述的数值范围中排除。

术语“和/或”应当理解为由该术语连接的多个要素中的任何一个要素或任意几个要素的组合。

术语“木聚糖酶”是指能够降解木聚糖的酶、多肽或蛋白质，例如能够催化木聚糖中的 β -1,4 糖苷键降解。

术语“重组”当用于核酸、蛋白质或载体时，表示核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或者通过改变天然核酸或蛋白质而被修饰。

术语“表达”在本发明的上下文中包括涉及本发明的木聚糖酶产生的任何步骤，其包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

35 术语“载体”可以是自主复制型载体，即独立于染色体而自我复制，例如质粒或人工染色体等，或者可以是在被引入宿主细胞时整合到基因组中与染色体一起复制的载体。

表达载体可以包含一个或多个允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞的可选择标记，所述标记例如可提供对抗生素、重金属的抗性等。表达载体还可以包含复制起点，以允许表达载体能够在宿主细胞中自主复制。这些元件的选择是本领域的常用技术，用这些元件构建本发明的重组表达载体的方法是本领域众所周知的，例如可参见 J.

5 Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition。

术语“宿主细胞”是指对转化、转染、转导等敏感的任何细胞类型，其可以包含本发明的多核苷酸或重组载体。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

10 术语“热稳定”是指酶具有在相对较高温度下抵抗不可逆失活（通常由变性所致）的能力，这意味着在给定的时间段暴露于指定的温度后，酶保留特定量的酶活。

除非另有说明，在本文中，核酸以 5'至 3'的方向从左向右书写，氨基酸序列则以氨基端（N 端）到羧基端（C 端）的方向从左向右书写。

15 本发明提供了木聚糖酶，所述木聚糖酶包含木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列，以及连接在其 C 端的融合肽段，所述融合肽段包含 SEQ ID NO：1 和/或 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列。木聚糖酶 Xyn-CDBFV 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：3 所示。在特定的实施方案中，融合后的木聚糖酶 Xyn-307 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：4 所示（其中加下划线部分为融合肽段 SEQ ID NO：1）。在特定的实施方案中，融合后的木聚糖酶 Xyn-309 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：5 所示（其中加下划线字体部分为融合肽段序列 SEQ ID NO：1，加粗倾斜字体部分为融合肽段序列 SEQ ID NO：2）。

20 本领域技术人员知晓，所述木聚糖酶还可以连接有其他肽段序列（包括但不限于标签序列，如组氨酸标签序列），而不影响所述木聚糖酶的功能特性（包括但不限于本文所述的酶活、热稳定性等性能），这样的木聚糖酶也包括在本文所述的木聚糖酶范围内。

25 本发明还提供了多核苷酸，其编码如上所述的木聚糖酶。在特定的实施方案中，所述的多核苷酸编码木聚糖酶 Xyn-307，其序列如 SEQ ID NO：6 所示。在特定的实施方案中，所述的多核苷酸编码木聚糖酶 Xyn-309，其核苷酸序列如 SEQ ID NO：7 所示。

30 本发明还提供了重组载体，其包含如上所述的多核苷酸。在特定的实施方案中，所述重组载体包含编码木聚糖酶 Xyn-307 的多核苷酸。在特定的实施方案中，所述重组载体包含编码木聚糖酶 Xyn-309 的多核苷酸。

本发明还提供了宿主细胞，其包含如上所述的多核苷酸或重组载体，所述宿主细胞可以为黑曲霉、毕赤酵母。在特定的实施方案中，所述宿主细胞为黑曲霉。

本发明还提供了产生木聚糖酶的黑曲霉基因工程菌的制备方法，包括以下步骤：

35 （1）基因合成含有黑曲霉糖化酶基因 gla 启动子（其核苷酸序列如 SEQ ID NO：8 所示）和终止子的 DNA 片段（其核苷酸序列如 SEQ ID NO：9 所示）；

(2) 将黑曲霉淀粉酶信号肽序列(其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示)、木聚糖酶 Xyn-307 或 Xyn-309 的核苷酸序列串联在启动子和终止子间, 构成黑曲霉表达框序列;

(3) 将所述黑曲霉表达框序列克隆至质粒中, 得到重组表达质粒;

5 (4) 将重组表达质粒克隆至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 挑选阳性转化子进行菌落 PCR 和 DNA 测序, 将测序正确的转化子进行培养并大规模抽提所述重组表达质粒;

10 (5) 将抽提的重组表达质粒线性化后, 转化黑曲霉原生质体, 用选择标记 amdS (其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示) 平板(0.8M 蔗糖+2 mL 乙酰胺+200 mL 微量元素)进行筛选;

(6) 将长出的转化子用 TB3 低糖平板活化后, 接种于产酶培养基中培养 144h, 离心取上清, 进行蛋白电泳鉴定和发酵上清液酶活检测, 从中筛选出木聚糖酶酶活高的转化子若干, 进行复筛确认, 即得到生产木聚糖酶 Xyn-307 或 Xyn-309 的黑曲霉基因工程菌。

15 本发明还提供了木聚糖酶 Xyn-307 或 Xyn-309 黑曲霉的重组菌株的摇瓶培养方法, 包括将筛选得到的 Xyn-307 或 Xyn-309 的阳性转化子接种至黑曲霉筛选培养基的摇瓶中, 摇床震荡培养, 发酵结束后离心收集上清液, 测定木聚糖酶的酶活。

在一些实施方案中, 所述摇床的培养温度为 30-35 $^{\circ}$ C。在优选的实施方案中, 所述摇床的培养温度为 34 $^{\circ}$ C。

20 在一些实施方案中, 所述摇床的转速为 180-250rpm。在优选的实施方案中, 所述摇床的转速为 220rpm。

在一些实施方案中, 所述摇床培养的周期为 5-7 天。在优选的实施方案中, 所述摇床培养的周期为 6 天。

下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述:

25 实验材料和试剂

(1) 菌株与载体

大肠杆菌 E. coli DH5 α 购自 Invitrogen 公司, 黑曲霉 CICC2462 菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 CICC, 质粒 pUC57 购自金斯瑞生物科技股份有限公司。

(2) 酶及相关分子生物试剂

30 DNA 胶回收纯化试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification Kit)、DNA 纯化试剂盒 (Fragment Purification Kit Ver. 2.0) 购自 TaKaRa。T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。其它生化试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。

(3) 培养基

35 LB 培养基: 1%胰化蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%氯化钠; 用 NaOH 调 pH 值至 7.0; 加 1.5% (w/v) 琼脂粉 (固体培养基)。

TZ 液体培养基：0.8%牛肉膏粉、0.2%酵母浸膏、0.5%蛋白胨、0.2%NaCl、3%蔗糖，pH 5.8。

STC 溶液：1M D-Sorbitol、50mM CaCl₂、10mM Tris，pH 7.5。

乙酰胺培养基：3%蔗糖、0.05%KCl、0.1%K₂HPO₄·3H₂O、0.001%FeSO₄、
5 0.0244%MgSO₄、0.06%乙酰胺、0.34%CsCl。

黑曲霉产酶培养基：葡萄糖：12%；玉米浆干粉：1.4%；豆饼粉：3%；硫酸铵：1%；磷酸二氢钾：1%；硫酸镁：0.02%；碳酸钙：0.6%；柠檬酸：0.3%；硫酸锌：0.005%；硫酸亚铁：0.005%。

木聚糖酶酶活的测定

10 本文所有对木聚糖酶酶活的测定均使用国家标准《GB/T23874-2009 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法》所规定的标准方法，即通过木聚糖被木聚糖酶催化降解所产生的还原性寡糖和单糖在沸水浴条件下与 3,5-二硝基水杨酸（DNS）试剂发生的显色反应，根据酶反应样品在 540nm 处的吸光度与空白对照样品的差值，来计算所测试的木聚糖酶的酶活。

15 酶活的具体计算公式如下：

用于酶解反应的稀释酶液中木聚糖酶的活力按公式（1）和公式（2）计算：

$$X_D = \frac{[(A_E - A_B) \times K + C_o]}{M \times t} \times 1000 \quad (1)$$

式中：

X_D——稀释酶液中木聚糖酶的活力，U/mL；

20 A_E——酶反应液的吸光度；

A_B——酶空白样的吸光度；

K——标准曲线的斜率；

C_o——标准曲线的截距；

M——木糖的摩尔质量，M（C₅H₁₀O₅）=150.2 g/mol

25 t——酶解反应时间，min；

1000——转化因子，1mmol=1000 μmol

X_D 值应在 0.04 U/mL~0.1 U/mL 之间。若不在这个范围，应调整酶液的稀释倍数，再进行分析测定。

$$X = X_D \times D_f \quad (2)$$

30 式中：

X——试样中木聚糖酶的活力，U/g 或 U/mL；

D_f——试样的稀释倍数。

实施例 1：黑曲霉平台木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 表达质粒的构建

35 (1) 将 pUC57 质粒通过 vector-F 与 vector-R 引物进行线性化；

(2)由 GenScript 公司分别合成含有黑曲霉糖化酶基因 gla 启动子和终止子的 DNA 片段、选择标记 amdS;

(3)首先, 分别将引物 amdS-F 与 amdS-R、gla-F 与 gla-R 通过 PCR 扩增出带有重组臂的 amdS 基因和含有 gla 启动子和终止子的 DNA 片段, 通过 Gibson Master Mix Kit (E2611, New England Biolabs)将上述线性化 pUC57 质粒、amdS 基因和 gla 启动子与终止子 DNA 片段进行重组得到 pGla-amdS 质粒, 测序确认序列正确。该质粒可通过 AflII 位点线性化后用于木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 基因序列的插入。

(4) 木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 表达质粒构建分别如下: 1.将引物 Xyn-F 与 Xyn-R1 通过 PCR 扩增出带有重组臂的 Xyn-CDBFV 基因, 再通过 Gibson Master Mix Kit (E2611, New England Biolabs) 将 Xyn-CDBFV 基因与线性化的 pGla-amdS 质粒进行重组得到 Xyn-CDBFV-amdS 质粒, 经测序确认序列。该质粒可通过 Hind III位点线性化后用于原生质体转化。2. 将引物 Xyn-F 与 Xyn-R2 通过 PCR 扩增出带有重组臂的 Xyn-307 基因, 再通过 Gibson Master Mix Kit (E2611, New England Biolabs) 将 Xyn-307 基因与线性化的 pGla-amdS 质粒进行重组得到 Xyn-307-amdS 质粒, 经测序确认序列。该质粒可通过 HindIII位点线性化后用于原生质体转化。3.将引物 Xyn-F 与 Xyn-R3 通过 PCR 扩增出带有重组臂的 Xyn-309 基因, 再通过 Gibson Master Mix Kit (E2611, New England Biolabs) 将 Xyn-309 基因与线性化的 pGla-amdS 质粒进行重组得到 Xyn-309-amdS 质粒, 经测序确认序列。该质粒可通过 HindIII位点线性化后用于原生质体转化。

20 相关引物序列如下:

表 1 本发明中的引物

引物名称	序列 (5'-3')
vector-F	CTTGCGTAATCATGGTCATAGC (SEQ ID NO.12)
vector-R	CGGACCCCTCCGCCAATGGCCTTGCATGCAGGCCTCTGCA (SEQ ID NO.13)
amdS-F	CTAGATCTACGCCAGGACCG (SEQ ID NO.14)
amdS-R	ATGACCATGATTACGCCAAGCTTCTGGAAACGCAACCCTG (SEQ ID NO.15)
gla-F	GCCATTGGCGGAGGGGTCCG (SEQ ID NO.16)
gla-R	CGGTCCTGGCGTAGATCTAGATGCATTGAATGACAGTGAT (SEQ ID NO.17)
Xyn-F	CAGTCCTTCTGCTCCTCCGCCTCCC (SEQ ID NO.18)
Xyn-R1	GTCACCGATGTAGACCTTGGCGTAGGG (SEQ ID NO.19)
Xyn-R2	TTACTCGGAACCGCGGCAGGTGGG (SEQ ID NO.20)
Xyn-R3	TTAGGAGGTGGAGGAGGAACCACCCTG (SEQ ID NO.21)

实施例 2：黑曲霉平台木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 表达质粒的转化整合

采用原生质体转化法将线性化木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 表达质粒导入黑曲霉 CICC2462 菌株中，具体操作步骤如下所述：

(1) 原生质体的制备：在营养丰富的 TZ 液体培养基接种黑曲霉菌丝体，培养 48h 后采用 Mira-cloth（Calbiochem 公司）过滤收集菌丝体并用 0.7M NaCl（pH 5.8）洗涤；待菌丝体滤干后转移至含纤维素酶 1%（Sigma）、蜗牛酶 1%（Sigma）和溶壁酶（Sigma）0.2%的酶解液（pH 5.8）中，在 30℃、65rpm 条件下酶解 3h；然后将含有原生质体的酶解液置于冰上并用四层擦镜纸过滤，得到的滤液经 3000rpm、4℃ 温和离心 10min 后，弃上清液，将附着在管壁上的原生质体用 STC 溶液（1M D-Sorbitol、50mM CaCl₂、10mM Tris, pH 7.5）洗涤一次，最后把原生质体重悬于适量的 STC 溶液中。

(2) 原生质体转化：将 10 μL（浓度为 1000ng/μL）用 HindIII 线性化得到的木聚糖酶表达质粒加入到 100 μL 原生质体悬浮液中混匀后室温放置 25min，然后分 3 次共加入 900 μL PEG 溶液，混匀后室温放置 25min，然后在室温离心 10min、转速为 3000rpm，弃上清液，将附着于管壁上的原生质体重悬于 1mL STC 溶液中，与预先降温至 45℃ 左右的乙酰胺培养基混合并铺平板，待平板凝固后放入 34℃ 培养箱中培养 4-5 天，将转化子挑至新的乙酰胺培养基平板中，放入 34℃ 培养箱中再培养 4-5 天，长出的转化子称为阳性转化子。

采用上述原生质体转化方法，将线性化木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 表达质粒转化到黑曲霉菌株中，得到木聚糖酶阳性转化子。

实施例 3：木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 黑曲霉重组表达菌株的摇瓶培养

将上述木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 阳性转化子接种至含有 50mL 黑曲霉产酶培养基的摇瓶中，在温度为 34℃、转速为 220rpm 的摇床上培养 6 天，离心收集发酵液上清液，并测定木聚糖酶酶活。发酵 144h 后，发酵上清酶活如表 2 所示。

表 2 发酵 144h 后黑曲霉平台木聚糖酶 Xyn-CDBFV、Xyn-307、Xyn-309 发酵上清酶活

名称	144h 发酵上清酶活（u/mL）
Xyn-CDBFV	0
Xyn-307	40000-47000
Xyn-309	62000-69000

实施例 4：木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 黑曲霉重组表达菌株在 50L 发酵罐发酵培养

将上述木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 阳性转化子黑曲霉基因工程菌发酵用 50L 发酵罐进行实验，产酶培养基实际装液量 30L。发酵条件：34℃，搅拌速度：800rpm，通气量：25LPM，发酵时长约 186h，发酵过程中每隔 4h 检测酶活。酶活检测数据如表 3 所示，酶活变化曲线如图 1 所示，Xyn-309 发酵全菌酶活最高可达 25.6 万 u/g，Xyn-307 发酵全菌酶活最高可达 16.8 万 u/g。

表 3 黑曲霉平台木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 发酵全菌酶活记录

发酵时间 (h)	Xyn-307 酶活 (u/g)	Xyn-309 酶活 (u/g)
19	4872	11752
23	5869	16182
27	7038	18691
31	9696	22064
35	12069	24477
39	15908	28692
43	17659	32442
47	27151	38407
51	30782	40083
55	35090	47633
59	39020	49323
63	42589	54185
67	47930	67501
71	58114	78723
75	63721	94377
79	74797	104846
83	81275	126238
87	82530	134678
91	95289	147123
95	104187	136142
99	110657	144557
103	113398	161172
107	123614	161190
111	118291	165066
115	125392	192894
119	150263	207134
123	152313	216790
127	156449	190800
131	155213	194522
135	155730	190137
139	154278	212091
143	158654	234893
147	161531	242564
151	157694	242089
155	164857	250810
159	164173	256931
163	168211	255511
166	168368	231464

170	165000	253033
174	145572	214525
178	142000	229011
182	145089	245104
186	139800	224225

实施例 5：木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 在毕赤酵母中的高效表达

(1) 菌株与载体

毕赤酵母 X-33 来自金斯瑞生物科技股份有限公司、载体 pPicZaA 购自 Invitrogen 公
5 司。

(2) 酶及相关分子生物试剂

内切酶、连接酶购自 TaKaRa 公司，DNA 胶回收纯化试剂盒（Agarose Gel DNA Purification Kit）、DNA 纯化试剂盒（Fragment Purification Kit Ver.2.0）购自 TaKaRa。T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。其它生化试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。
10 公司。

(3) 培养基

LB 培养基：1%胰化蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%氯化钠；用 NaOH 调 pH 值至 7.0；加 1.5%（w/v）琼脂粉（固体培养基）。

酵母 MD 筛选培养基：2%葡萄糖，1.5%琼脂粉，0.00004%生物素，1.34%YNB；
15 MM 培养基：0.5%甲醇（体积分数），1.5%琼脂粉，0.00004%生物素，1.34%YNB；
RDB 培养基：1M 山梨醇，2%葡萄糖，0.00004%生物素，1.34%YNB，0.005%氨基酸。

酵母 BMGY 诱导培养基：1%酵母提取物、2%蛋白胨、1.34%YNB、0.00004%生物素、1%甘油（体积分数）。

酵母 BMMY 诱导培养基：1%酵母提取物、2%蛋白胨、1.34%YNB、0.00004%生物素、0.5%甲醇（体积分数）。
20 物素、0.5%甲醇（体积分数）。

(4) 重组质粒的构建及在毕赤酵母中的表达

分别以合成的木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 基因为模板，连接进入表达载体 pPicZaA，使木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 基因插入到上述表达载体的信号肽序列的下游，与 α-MF 信号肽形成正确的阅读框架，构建成酵母表达载体 pPicZaA - Xyn-307、
25 pPicZaA - Xyn-309，转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α。阳性转化子进行 DNA 测序，测序表明序列正确的转化子用于大量制备重组质粒。约 5 μg 的用限制性内切酶 BglII 进行线性化的重组表达质粒，电击转化酵母 X-33 感受态细胞，涂布于 Zeocin 抗性平板并于 30℃培养 2-3 天，挑取在平板上生长的转化子进行进一步的表达实验。

(5) 毕赤酵母中高木聚糖酶活性转化子的筛选

30 用灭过菌的枪头从长有转化子的平板上挑取单菌落，按照编号点到 Zeocin 平板上，将点有转化子的平板置于 30℃培养箱中培养 1~2 天，至菌落长出。进行菌落 PCR 验证以及携带有 Xyn-307、Xyn-309 表达框的测序验证，待测序正确后。按编号从平板上挑

取转化子接种于装有 BMGY 培养基的摇瓶中，30℃、250rpm 摇床培养约 48h；将摇瓶中培养 48h 的菌液 3,000×g 离心 15min，去上清，改用含有体积分数为 0.5% 的甲醇的 BMMY 培养基，在 30℃、260rpm 诱导培养；诱导培养 48h 后，取菌液，3,000×g 离心 5min，取上清液用于酶活性检测，从中筛选出高木聚糖酶活性的转化子。

5 （6）毕赤酵母基因工程菌 Xyn-307、Xyn-309 在 50L 发酵罐的酶活表达水平

发酵罐：将上述木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 阳性转化子酵母基因工程菌发酵用 50L 发酵罐进行实验，产酶培养基实际装液量 30L。发酵条件：30℃，搅拌速度：800rpm，通气量：25LPM，发酵时长约 210h，全程检测酶活。酶活检测数据如表 4 所示，酶活变化曲线如图 2 所示，Xyn-309 发酵全菌酶活最高可达 7.2 万 u/g，Xyn-307 发

10 酵全菌酶活最高可达 6.5 万 u/g。

表 4 酵母平台木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 发酵全菌酶活记录

发酵时间（h）	Xyn-307 酶活（u/g）	Xyn-309 酶活（u/g）
22	885	1144
26	1480	1767
30	2313	3850
34	4338	5623
38	5138	8043
42	7270	11826
46	8059	12104
50	10686	16163
54	11887	17846
58	13018	19557
62	14309	20895
66	17899	21563
70	19169	24386
74	20352	25121
78	21887	28436
82	25762	29068
86	27256	28583
90	31045	34415
94	32410	36120
98	33595	37376
102	35290	38946
106	38099	43700
110	41255	44545
114	43944	47420
118	44693	46577
122	49129	50278

126	49907	49573
130	51409	45788
134	48708	46708
138	49796	53938
142	50024	56522
146	51259	57449
150	53196	58669
154	52858	60151
158	53256	60659
162	54832	61772
166	59611	65983
170	60590	66233
178	59500	68756
186	65000	71311
190	63451	72359
194	63876	70698
198	63910	71821
202	63948	72072
206	64779	72071
210	61716	69694

通过对比实施例 4 与实施例 5 可知，黑曲霉平台的木聚糖酶 Xyn-307、Xyn-309 相比于酵母平台的 Xyn-307、Xyn-309，酶活均有显著提升，其中 Xyn-307 酶活由 6.5 万 u/g 提升至 16.8 万 u/g，提升了 158.5%；Xyn-309 酶活由 7.2 万 u/g 提升至 25.6 万 u/g，提升了 255.6%。其次，在黑曲霉平台中，Xyn-309 相较 Xyn-307 酶活表达水平得到显著提高，最高达到 25.6 万 u/g，对比 Xyn-307，酶活提高 50%以上。

实施例 6

为了测试黑曲霉平台表达木聚糖酶在饲料应用中的实际效果，我们将黑曲霉平台的 Xyn-307、Xyn-309 与酵母平台的 Xyn-307 进行了水浴耐热性能测试、并进行造粒产品制备后，对饲料制粒中稳定性检测以及体外酶解效果进行了测试，结果分别如表 5、6、7 所示。

表 5 水浴耐热性能测试

样品名称	酶活存留率，%		
	80℃	85℃	90℃
Xyn-307（酵母）	69.96%	70.95%	64.46%
Xyn-307（黑曲霉）	77.97%	73.71%	70.95%
Xyn-309（黑曲霉）	75.4%	72.53%	74.14%

表 6 饲料制粒中稳定性测试

样品名称	酶活存留率，%（调质温度 85℃）
Xyn-307（酵母）	91%
Xyn-307（黑曲霉）	95%
Xyn-309（黑曲霉）	93%

表 7 体外酶解效果

样品名称	麸皮		配合日粮	
	平均还原糖释放量，mg/g	还原糖增量，mg/g	平均还原糖释放量，mg/g	还原糖增量，mg/g
空白	70.5074	0	81.9583	0
Xyn-307（酵母）	87.8294	17.32	83.6052	1.65
Xyn-307（黑曲霉）	93.3958	24.89	86.3422	4.38
Xyn-309（黑曲霉）	96.6056	26.10	83.6799	1.72

5

本发明涉及的序列如下：

融合肽段氨基酸序列 1，SEQ ID NO： 1： SRTKTHLRRGSE

融合肽段氨基酸序列 2，SEQ ID NO： 2：

GYESSGSSSITVSTQTTTLTTSTKPTSTSTTTRTSTSTTSTQGGSSSTS

10

木聚糖酶 Xyn-CDBFV 的氨基酸序列 SEQ ID NO： 3：

QSFCSASHSGQSVKVTGNKVGITGGVGYELWADSGNNSATFYSDGSFSCFQNA
GDYLCRSGLSFDSTKTPSQIGRMKADFKLVKQNSSNVGYSYVG VYGWTRSPLVEYYIV
DNWLSPPFPDVGWGNKKHGSFTIDGAQYTVYENTRTGPSIDGDTTFNQYFSIRQQARD
CGTIDISAHFDQWEKLGMTMGKLHEAKVLGEAGNVNGGASGTADFPYAKVYIGD

15

木聚糖酶 Xyn-307 的氨基酸序列 SEQ ID NO： 4：

QSFCSASHSGQSVKVTGNKVGITGGVGYELWADSGNNSATFYSDGSFSCFQNA
GDYLCRSGLSFDSTKTPSQIGRMKADFKLVKQNSSNVGYSYVG VYGWTRSPLVEYYIV
DNWLSPPFPDVGWGNKKHGSFTIDGAQYTVYENTRTGPSIDGDTTFNQYFSIRQQARD
CGTIDISAHFDQWEKLGMTMGKLHEAKVLGEAGNVNGGASGTADFPYAKVYIGDSRT
KTHLRRGSE

20

木聚糖酶 Xyn-309 的氨基酸序列 SEQ ID NO： 5：

QSFCSASHSGQSVKVTGNKVGITGGVGYELWADSGNNSATFYSDGSFSCFQNA
GDYLCRSGLSFDSTKTPSQIGRMKADFKLVKQNSSNVGYSYVG VYGWTRSPLVEYYIV
DNWLSPPFPDVGWGNKKHGSFTIDGAQYTVYENTRTGPSIDGDTTFNQYFSIRQQARD
CGTIDISAHFDQWEKLGMTMGKLHEAKVLGEAGNVNGGASGTADFPYAKVYIGDSRT
KTHLRRGSEGYESSGSSSITVSTQTTTLTTSTKPTSTSTTTRTSTSTTSTQGGSSSTS

25

木聚糖酶 Xyn-307 的核苷酸序列 SEQ ID NO： 6：

CAGTCCTTCTGCTCCTCCGCTCCCACTCCGGTCAGTCCGTCAAGGTCACCGGT
AACAAGGTCGGTACCATCGGTGGTGTGCGTTACGAGCTGTGGGCCGACTCCGGTAA
CAACTCCGCCACCTTCTACTCCGACGGTTCCTTCTCCTGCACCTTCCAGAACGCCGG
TGACTACCTGTGCCGCTCCGGTCTGTCTTCGACTCCACCAAGACCCCCCTCCAGAT
5 CGGTGCGCATGAAGGCCGACTTCAAGCTGGTCAAGCAGAACTCCTCCAACGTCGGTT
ACTCCTACGTCGGTGTCTACGGTTGGACCCGCTCCCCCCTGGTCGAGTACTACATCG
TCGACAACTGGCTGTCCCCCTTCCCCCCCCGGTGACTGGGTTCGGTAACAAGAAGCAC
GGTTCCTTCACCATCGACGGTGCCAGTACACCGTCTACGAGAACACCCGCACCGG
TCCCTCCATCGACGGTGACACCACCTTCAACCAGTACTTCTCCATCCGCCAGCAGGC
10 CCGCGACTGCGGTACCATCGACATCTCCGCCCACTTCGACCAGTGGGAGAAGCTGG
GTATGACCATGGGTAAGCTGCACGAGGCCAAGGTCCTGGGTGAGGCCGGTAACGTC
AACGGTGGTGCCTCCGGTACCGCCGACTTCCCCTACGCCAAGGTCTACATCGGTGA
CTCCCGCACCAAGACCCACCTGCGCCGCGGTTCCGAGTAA

木聚糖酶 Xyn-309 的核苷酸序列 SEQ ID NO : 7:

15 CAGTCCTTCTGCTCCTCCGCTCCCACTCCGGTCAGTCCGTCAAGGTCACCGGT
AACAAGGTCGGTACCATCGGTGGTGTGCGTTACGAGCTGTGGGCCGACTCCGGTAA
CAACTCCGCCACCTTCTACTCCGACGGTTCCTTCTCCTGCACCTTCCAGAACGCCGG
TGACTACCTGTGCCGCTCCGGTCTGTCTTCGACTCCACCAAGACCCCCCTCCAGAT
CGGTGCGCATGAAGGCCGACTTCAAGCTGGTCAAGCAGAACTCCTCCAACGTCGGTT
20 ACTCCTACGTCGGTGTCTACGGTTGGACCCGCTCCCCCCTGGTCGAGTACTACATCG
TCGACAACTGGCTGTCCCCCTTCCCCCCCCGGTGACTGGGTTCGGTAACAAGAAGCAC
GGTTCCTTCACCATCGACGGTGCCAGTACACCGTCTACGAGAACACCCGCACCGG
TCCCTCCATCGACGGTGACACCACCTTCAACCAGTACTTCTCCATCCGCCAGCAGGC
CCGCGACTGCGGTACCATCGACATCTCCGCCCACTTCGACCAGTGGGAGAAGCTGG
25 GTATGACCATGGGTAAGCTGCACGAGGCCAAGGTCCTGGGTGAGGCCGGTAACGTC
AACGGTGGTGCCTCCGGTACCGCCGACTTCCCCTACGCCAAGGTCTACATCGGTGA
CTCCCGCACCAAGACCCACCTGCGCCGCGGTTCCGAGGGTTACGAGTCTCCGGTT
CCTCCTCCATCACCGTCTCCACCCAGACCACCACCCTGACCACCTCCACCAAGCCC
ACCTCCACCTCCACCACCACCCGCACCTCCACCTCCACCACCTCCACCCAGGGTGG
30 TTCTCCTCCACCTCCTAA

黑曲霉糖化酶基因 gla 启动子核苷酸序列 SEQ ID NO : 8:

TGCCATTGGCGGAGGGGTCCGGACGGTCAGGAACCTTAGCCTTATGAGATGAAT
GATGGACGTGTCTGGCCTCGGAAAAGGATATATGGGGATCATGATAGTACTAGCCAT
ATTAATGAAGGGCATATACCACGCGTTGGACCTGCGTTATAGCTTCCCGTTAGTTATA
35 GTACCATCGTTATACCAGCCAATCAAGTCACCACGCACGACCGGGGACGGCGAATC
CCCGGGAATTGAAAGAAATTGCATCCCAGGCCAGTGAGGCCAGCGATTGGCCACCT
CTCCAAGGCACAGGGCCATTCTGCAGCGCTGGTGGATTCATCGCAATTTCCCCCGG
CCCGGCCCGACACCGCTATAGGCTGGTTCTCCACACCATCGGAGATTTCGTCGCCTA
ATGTCTCGTCCGTTTACAAGCTGAAGAGCTTGAAGTGGCGAGATGTCTCTGCAGGA
40 ATTCAAGCTAGATGCTAAGCGATATTGCATGGCAATATGTGTTGATGCATGTGCTTCT
TCCTTCAGCTTCCCCTCGTGCAGATGAGGTTTGGCTATAAATTGAAGTGGTTGGTCG

GGGTTCCGTGAGGGGCTGAAGTGCTTCCTCCCTTTTAGACGCAACTGAGAGCCTGA
GCTTCATCCCCAGCATCATTACACCTCAGCA

黑曲霉糖化酶基因 gla 终止子核苷酸序列 SEQ ID NO : 9:

ACAATCAATCCATTTTCGCTATAGTTAAAGGATGGGGATGAGGGCAATTGGTTATA
5 TGATCATGTATGTAGTGGGTGTGCATAATAGTAGTGAAATGGAAGCCAAGTCATGTG
ATTGTAATCGACCGACGGAATTGAGGATATCCGGAATACAGACACCGTGAAAGCC
ATGGTCTTTTCCTTCGTGTAGAAGACCAGACAGACAGTCCCTGATTTACCCTTGCACA
AAGCACTAGAAAATTAGCATTCCATCCTTCTCTGCTTGCTCTGCTGATATCACTGTCA
TTCAATGCATAGCCATGAGCTCATCTTAGATCCAAGCACGTAATTCCATAGCCGAGG
10 TCCACAGTGGAGCAGCAACATTCCCCATCATTGCTTTCCCCAGGGGCTCCCAACG
ACTAAATCAAGAGTATATCTCTACCGTCCAATAGATCGTCTTCGCTTCAAAATCTTTG
ACAATTCCAAGAGGGTCCCCATCCATCAAACCCAGTTCAATAATAGCCGAGATGCAT
GGTGGAGTCAATTAGGCAGTATTGCTGGAATGTCGGGGCCAGTTGGC

黑曲霉淀粉酶信号肽核苷酸序列 SEQ ID NO : 10:

15 ATGGTCGCCTGGTGGTCCCTCTTCCTCTACGGTCTCCAGGTGCGCCGCCCCCGCC
CTCGCCGCCACCCCCGCCGACTGGCGCTCC

选择标记 amdS 的核苷酸序列 SEQ ID NO: 11:

CTGGAAACGCAACCCTGAAGGGATTCTTCCTTTGAGAGATGGAAGCGTGTCAT
ATCTCTTCGGTTCTACGGCAGGTTTTTTTCTGCTCTTTCGTAGCATGGCATGGTCACT
20 TCAGCGCTTATTTACAGTTGCTGGTATTGATTTCTTGTGCAAATTGCTATCTGACACTT
ATTAGCTATGGAGTCACCACATTTCCAGCAACTTCCCCACTTCCTCTGCAATCGCC
AACGTCTCTCTTCACTGAGTCTCCGTCCGATAACCTGCACTGCAACCGGTGCCCA
TGGTACGCCTCCGGATCATACTCTTCCTGCACGAGGGCATCAAGCTCACTAACCGCC
TTGAAACTCTCATTTCTTCTATCGATGTTCTTATCCGCAAAGGTAACCGGAACAACC
25 ACGCTCGTGAAATCCAGCAGGTTGATCACAGAGGCATACCCATAGTACCGGAAGTGT
GTCATGCCGTACCGCAGCGGTAGGCGTAATCGGCGCGATGATGGCGTCCAGTTCCCTT
CCCGGCCTTTTCTTCAGCCTCCCGCCATTTCTCAAGGTACTCCATCTGGTAATTCCAC
TTCTGGAGATGCGTGTCCCAGAGCTCGTTCATGTTAACAGCTTTGATGTTCCGGTTT
AGTAGGTCTTTGATATTTGGAATCGCCGGCTCGCCGGATGCACTGATATCGCGCATT
30 CGTCGGCGCTGCCGTCAGCCGCGTAGATATGGGAGATGAGATCGTGGCCGAAATCG
TGCTTGTATGGCGTCCACGGGGTCACGGTGTGACCGGCTTTGGCGAGTGCGGCGAC
GGTGGTTTCCACGCCGCGCAGGATAGGAGGGTGTGGAAGGACATTGCCGTCAAG
TTGTAGTAGCCGATATTGAGCCCGCCGTTCTTGATCTTGAGGGCAATAATGTCCGAC
TCGGACTGGCGCCAGGGCATGGGGATGACCTTGGAGTCGTATTTCCATGGCTCCTG
35 ACCGAGGACGGATTTGGTGAAGAGGCGGAGGTCTAACATACTTCATCAGTGAAGTGC
CGGTCTCGTATATAGTATAAAAAGCAAGAAAGGAGGACAGTGGAGGCCTGGTATAG
AGCAGGAAAAGAAGGAAGAGGCGAAGGACTCACCTCAACAGAGTGCCTAATCG
GCCCCACAACGCTGTGCACCGTCTCCTGACCTCCATGCTGTTCCGATCTTTGCAT
ACGGCAGCCGCCCATGACTCGGCCTTAGACCGTACAGGAAGTTGAACGCGGCCGG
40 CACTCGAATCGAGCCACCGATATCCGTTTCTACACCGATGACGCCACCACGAATCCC

AACGATCGCACCCCTCACCACCAGAACTGCCGCCGCACGACCAGTTCTTGTTGCGTG
GGTTGACGGTGCGCCCGATGATGTTGTTGACTGTCTCGCAGACCATCAGGGTCTGC
GGGACAGAGGTCTTGACGTAGAAGACGGCACCGGCTTTGCGGAGCATGGTTGTCA
GAACCGAGTCCCCTTCGTCGTA CTTGTTTAGCCATGAGATGTAGCCCATTGATGTTTC
5 GTAGCCCTGGTGGCATATGTTAGCTGACAAAAAGGGACATCTAACGACTTAGGGGC
AACGGTGTACCTTGACTCGAAGCTGGTCTTTGAGAGAGATGGGGAGGCCATGGAGT
GGACCAACGGGTCTCTTGCTTTGCGTAGTATTCATCGAGTTCCCTTGCCCTGCGCG
AGAGCGGCGTCAGGGAAGAACTCGTGGGCGCAGTTTGTCTGCACAGAAGCCAGCG
TCAGCTTGATAGTCCCATAAGGTGGCGTTGTTACATCTCCCTGAGAGGTAGAGGGGA
10 CCCTACTAACTGCTGGGCGATTGCTGCCCGTTTACAGAATGCTAGCGTAACTTCCAC
CGAGGTCAACTCTCCGGCCGCCAGCTTGACACAAGATCTGCAGCGGAGGCCTCT
GTGATCTTCAGTTCGGCCTCTGAAAGGATCCCCGATTTCTTTGGGAAATCAATAACG
CTGTCTTCCGCAGGCAGCGTCTGGACTTTCATTTCATCAGGGATGGTTTTTTCGAGG
CGGGCGCGCTTATCAGCGGCCAGTTCTTCCCAGGATTGAGGCATTCTGTGTTAGCTT
15 ATAGTCAGGATGTTGGCTCGACGAGTGTAAGCTGGGAGTTGGCATGAGGGTTATGT
AGGCTTCTTTAGCCCCGCATCCCCCTCATTCTCCTCATTGATCCCGGGGGAGCGGAT
GGTGTGATAAGAGACTAATTATAGGGTTTAGCTGGTGCCTAGCTGGTGATTGGCTG
GCTTCGCCGAATTTTACGGGCCAAGGAAAGCTGCAGAACC GCGGCACTGGTAAAC
GGTAATTAAGCTATCAGCCCCATGCTAACGAGTTTAAATTACGTGTATTGCTGATAAA
20 CACCAACAGAGCTTTACTGAAAGATGGGAGTCACGGTGTGGCTTCCCCACTGCGAT
TATTGCACAAGCAGCGAGGGCGAACTTGACTGTCTGTCGCTGAGCAGCCTGCAGTCA
AACATACATATATATCAACCGCGAAGACGTCTGGCCTTG TAGAACACGACGCTCCCT
AGCAACACCTGCCGTGTCAGCCTCTACGGTTGTTACTTGCATT CAGGATGCTCTCCA
GCGGGCGAGCTATTCAAATATTCAAAGCAGGTATCTCGTATTGCCAGGATT CAGCT
25 GAAGCAACAGGTGCCAAGGAAATCTGCGTCGGTTCTCATCTGGGCTTGCTCGGTCC
TGCGTAGATCTAG

* * *

30 尽管上述内容是指特别的优选的实施方案，但应理解本发明并不受此限制。本领域普通技术人员会想到可以对公开的实施方案进行各种修改，并且这些修改也旨在落入本发明的范围内。

本说明书中记载的所有发表物、专利申请和专利均通过引用以其全文并入本文。

权 利 要 求 书

- 1.木聚糖酶，其包含木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列，以及连接在其 C 端的融合肽段，其中所述融合肽段包含 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。
- 5
2. 根据权利要求 1 所述的木聚糖酶，其中所述融合肽段还包含 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的木聚糖酶，其中所述融合肽段由 SEQ ID NO：1 和
- 10 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列组成。
4. 根据权利要求 1 所述的木聚糖酶，其中所述木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列如 SEQ ID NO：3 所示。
- 15
5. 根据权利要求 1 所述的木聚糖酶，其包含如 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的木聚糖酶，其包含如 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列。
- 20
7. 根据权利要求 1 所述的木聚糖酶，其由 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列组成。
8. 根据权利要求 1 或 2 所述的木聚糖酶，其由 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列组成。
- 25
9. 多核苷酸，其编码权利要求 1 所述的木聚糖酶。
10. 根据权利要求 9 所述的多核苷酸，其包含如 SEQ ID NO：6 所示的核苷酸序列。
- 30
11. 根据权利要求 9 所述的多核苷酸，其包含如 SEQ ID NO：7 所示的核苷酸序列。
12. 根据权利要求 9 所述的多核苷酸，其由 SEQ ID NO：6 所示的核苷酸序列组成。
- 35
13. 根据权利要求 9 所述的多核苷酸，其由 SEQ ID NO：7 所示的核苷酸序列组成。

14. 重组载体，其包含权利要求 9-13 中任一项所述的多核苷酸。
15. 宿主细胞，其包含权利要求 9-13 中任一项所述的多核苷酸或权利要求 14 所述的
5 重组载体。
16. 根据权利要求 15 所述的宿主细胞，所述宿主细胞为黑曲霉或毕赤酵母。
17. 根据权利要求 16 所述的宿主细胞，所述宿主细胞为黑曲霉。
10
18. 制备木聚糖酶的方法，其包括在木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列的 C 端连接融合肽
段，所述融合肽段包含如 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。
19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述融合肽段还包含如 SEQ ID NO：2 所示
15 的氨基酸序列。
20. 根据权利要求 18 或 19 所述的方法，其中所述融合肽段由 SEQ ID NO：1 和
SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列组成。
- 20 21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述木聚糖酶 Xyn-CDBFV 序列如 SEQ ID
NO：3 所示。
22. 制备产生木聚糖酶的黑曲霉菌株的方法，其包括将权利要求 14 所述的重组载体
导入黑曲霉菌株中。
25
23. 根据权利要求 22 所述的方法，所述重组载体包含黑曲霉表达框序列，所述黑曲
霉表达框序列包含黑曲霉糖化酶基因 gla 启动子序列、黑曲霉淀粉酶信号肽核苷酸序
列、如 SEQ ID NO：6 或 7 所示的木聚糖酶核苷酸序列、黑曲霉糖化酶基因 gla 终止子
序列。
30
24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法，所述方法包括在导入所述重组载体后，用
选择标记 amdS 平板对黑曲霉菌株进行筛选。
25. 权利要求 1-8 任一项所述的木聚糖酶在饲料中的应用。