

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 24 日 (24.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/201595 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/42 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/001509

(22) 国际申请日: 2013 年 12 月 6 日 (06.12.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201310251300.2 2013 年 6 月 21 日 (21.06.2013) CN

(71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号杜伟, Liaoning 116023 (CN)。

(72) 发明人: 杨凌 (YANG, Ling); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 窦同意 (DOU, Tongyi); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 栾宏伟

(LUAN, Hongwei); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 刘兴宝 (LIU, Xingbao); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 李世阳 (LI, Shiyang); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

(74) 代理人: 沈阳晨创科技专利代理有限责任公司 (SHENYANG CHENCHUANG TECHNICAL PATENT AGENT LTD); 中国辽宁省沈阳市浑南新区沈营路 3 号瑞宝国际花苑 2 号楼 1 单元 5-1 室, Liaoning 110013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: XYLOSIDASE XYL_S, ENCODING GENE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种木糖苷酶 Xyl_S 及其编码基因与应用

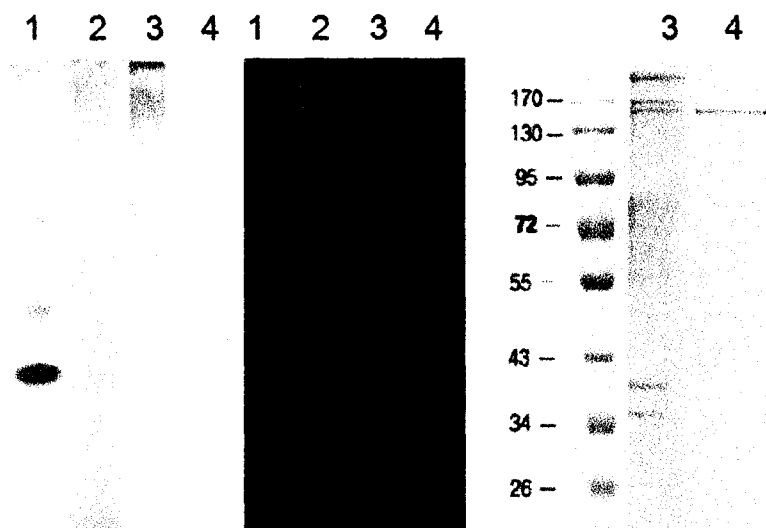


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: Provided are a xylosidase Xyl_S, encoding gene and application thereof. The amino acid sequence of the xylosidase is represented by SEQ ID NO.2, and nucleotide encoding sequence thereof is represented by SEQ ID NO.1. The xylosidase has double activity of β -xylose glycoside hydrolase and β -glucosidase, and can hydrolyze corresponding xylose glycoside bonds and glucosidic bonds specifically.

(57) 摘要: 提供了一种木糖苷酶 Xyl_S 及其编码基因与应用, 该木糖苷酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 其核苷酸编码序列如 SEQ ID NO.1 所示。该木糖苷酶具有 β -木糖苷水解酶和 β -葡萄糖苷酶双重活性, 可特异性地水解相应的木糖苷键和葡萄糖苷键。



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种木糖苷酶 Xyl_S 及其编码基因与应用

技术领域

本发明属于生物工程领域，具体涉及一种木糖苷酶 Xyl_S 及其编码基因与应用。

背景技术

β -木糖苷酶是一种外切酶，以外切方式从非还原性末端水解木二糖及木二糖以上的低聚木糖，水解产物为木糖。它是木聚糖降解的关键酶之一，有着重要的工业应用价值。在能源工业中，工农业废弃物中的木聚糖可被木聚糖酶系转化为木糖，而木糖又可被细菌及真菌转化成酒精等有价值的燃料；在医药行业中，木聚糖酶系水解特定底物可产生在医药行业具有重要应用价值的中间转化产物。例如，Patel 等人利用 *Moraxella.sp* β -木糖苷酶水解 10-去乙酰紫杉醇木糖苷的 7 位木糖残基，得到重要的中间产物 10-去乙酰紫杉醇，为紫杉醇的合成开辟了一条崭新的途径 (US005700669A; EP0668360B1)。

纤维化纤维微细菌是一种能够高效利用纤维素、半纤维素的放线菌，其可以产生多种水解酶，如 Shi-Hsiang Shen 等人 (*The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(2): 1058-1063) 从此菌株发酵液上清中分离得到了 β -1,3-葡萄糖苷酶，并对其进行了克隆和外源表达；Petra Tiels 等人 (*Nature Biotechnology* 2012, 30: 1225-1231) 对此菌株所产生的 5 个甘露糖苷酶进行了克隆和外源表达。但目前为止，并没有获得其中木糖苷酶的报道。我们在前期工作中分离到一株纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)

菌株 F16 (CCTCC M 2013201), 通过深入研究发现其培养液上清能够分泌一种木糖苷酶, 该酶具有 β -木糖苷水解酶和 β -葡萄糖苷酶水解酶双重活性, 可以特异性水解相应的木糖苷键和葡萄糖苷键, 同时具有广泛的底物特异性, 可水解多种木糖苷底物和葡萄糖苷底物, 例如木寡糖、4-硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷 (*p*NP- β -Xyl)、4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*NP- β -Glu)、7-木糖苷紫杉烷、黄芪甲苷, 以及人参皂苷 Rb1、Rb2、Re 等。这些优良的水解性质使其有可能具有非常高的工业利用价值。因此, 如何大量获得该酶或含有该酶的菌已经成为制约其工业利用的关键问题。

发明内容

本发明的目的是提供一种木糖苷酶 Xyl_S 及其编码基因与应用, 本发明通过基因表达后大量产生具有广泛底物特异性的木糖苷酶 Xyl_S, 用以水解木糖苷化合物生成木糖及相应的苷元, 亦可用于水解葡萄糖苷化合物生成葡萄糖及相应的苷元。

本发明提供了一种木糖苷酶 Xyl_S, 其氨基酸序列包含如序列表中 SEQ ID NO.2 所示序列的至少 1642 个氨基酸序列; 优选 SEQ ID NO.2 所示序列的第 24 个氨基酸残基到第 1151 个氨基酸残基在内的至少 1128 个氨基酸序列, 进一步优选包括 SEQ ID NO.2 所示序列的第 87 个氨基酸残基到第 1119 个氨基酸残基在内的至少 1033 个氨基酸序列。

本发明提供了一种木糖苷酶 Xyl_S 的编码基因, 该基因的核苷酸序列具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的至少 4929 个核苷酸; 优选具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的第 72 个核苷酸到第 3453 个核苷酸在内的至少 3372 个核苷酸; 进一步优选具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的第

261 个核苷酸到第 3357 个核苷酸在内的至少 3099 个核苷酸。

本发明提供了一种含有所述编码基因的重组载体，该重组载体是大肠杆菌表达载体、酿酒酵母表达载体、毕赤酵母表达载体、枯草芽孢杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、丝状真菌表达载体中的任意一种。

本发明提供了一种含有所述重组载体的重组细胞株，该重组细胞株的宿主细胞是大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌、乳酸菌、丝状真菌中的任意一种。该重组细胞株可以表达木糖苷酶 Xyl_S，既可以胞内表达，也可以分泌到细胞外。

本发明所涉及的基因是通过 DNA 重组技术从纤维化纤维微细菌（*Cellulosimicrobium cellulans*）菌株 F16（CCTCC M 2013201）的染色体中克隆，并经连接在 pCold IV 表达载体后在大肠杆菌中过量表达。经过量表达的木糖苷酶 Xyl_S 既可以分泌到细胞外，也可以在细胞内表达。其在 SDS-PAGE 上呈现的分子量约为 140KDa，其最佳反应 pH 为 7.5，有效作用的 pH 范围为 5.5~9.5，并且在 20~50℃均具备良好的催化活性。

由于密码子的简并性，所有与 SEQ ID NO.1 同源性低至约 60%的简并序列也能编码出 SEQ ID NO.2 所述的序列。另外，任何基因通过 DNA 重组技术可以改变其序列，从而产生各种不同的突变体。这些突变体所表达的蛋白质通常具有类似的性质。当基因或蛋白质序列达到一定的同源性时，它们所表达的蛋白质的性质随同源性增加而更为相似。本发明涉及的基因及其产物也具有相同的特点。当同源性达到 80%以上时，类似基因所表达的蛋白质将会具有催化木糖苷化合物水解为木糖和苷元的性质。

由于上述技术方案的使用，本发明的有益效果是：利用本发明的基因

进行表达, 获得木糖苷酶 Xyl_S 或含该酶的宿主细胞, 能有效地催化木糖苷化合物以及葡萄糖苷化合物的水解, 可应用于各种工业, 例如用于生物质转化, 如用于由包含生物质的纤维素生产燃料乙醇的过程中, 用于饲料组合物中, 提高动物对粗纤维的利用率, 或用于面包制造面团中, 还可以用于医药中间体的获得, 如水解 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇获得 10-去乙酰紫杉醇, 同时水解黄芪甲苷 IV 上的 β -木糖苷键和 β -葡萄糖苷键从而获得相应苷元, 水解掉人参皂苷 Rb1、Rb2 或 Re 上的木糖苷和葡萄糖苷得到相应人参皂苷 CK、Compound Y、PPD 等等。

本发明提供的木糖苷酶 Xyl_S 或重组细胞株应用于医药, 生物, 农业, 能源等领域, 将木糖苷化合物 (或葡萄糖苷化合物) 中的糖苷键水解, 获得相应的苷元。

附图说明

图 1: 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析分离出纯的木糖苷酶 Xyl_S, 其中, MUX 为 4-甲基伞形酮酰- β -D-吡喃木糖苷, 其糖苷键经水解后经 365nm 激发光激发后出现荧光, 从而实现对各个组分中 β -木糖苷酶的监测和酶谱分析; 左图: 2%-15%梯度 Native PAGE, 考染; 中图: 2%-15%梯度 Native PAGE, MUX 染色; 右图: 10% SDS-PAGE, 考染; 样品 1—BSA ferritin; 2—发酵液上清; 3—多酶复合物; 4—木糖苷酶 Xyl_S;

图2: 纯酶催化pNP- β -D-Xyl水解, 底物浓度对应相应初始反应速率的米氏曲线;

图3: 纯酶催化pNP- β -D-Glu水解, 底物浓度对应相应初始反应速率的米氏曲线;

图4: 琼脂糖电泳检测PCR产物, 其中, M为标准品, λ 噬菌体Hind III降解物; 1为克隆出的Xyl_S基因;

图5: 纯化后的重组酶Xyl_S;

图6: Xyl_S纯酶转化纯度为99%的10 DAXT结果, 其中, 10 DAXT为7-木糖-10-去乙酰基紫杉醇, 10 DAT为10-去乙酰基紫杉醇;

图7: Xyl_S纯酶转化7-木糖紫杉烷混合物的结果, 其中, 10 DAXT为7-木糖-10-去乙酰基紫杉醇, 10 DAT为10-去乙酰基紫杉醇, 10 DAXC为7-木糖基-10-去乙酰三尖杉宁碱, 10 DAC为10-去乙酰三尖杉宁碱, 10 DAXTC为7-木糖-10-去乙酰基紫杉醇C, 10 DATC为10-去乙酰基紫杉醇C;

图8: 水解产物的质谱图, 其中, A为10-去乙酰三尖杉宁碱, B为10-去乙酰基紫杉醇;

图 9: 纯酶转化黄芪甲苷 IV 生成环黄芪醇 TLC 图。

具体实施方式

下面的实施例将对本发明予以进一步的说明, 但并不因此而限制本发明。

下述实施例中, 如无特殊说明, 均为常规方法。

本发明所依赖的遗传资源是纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*) 菌株 F16, 保藏号为 CCTCC M 2013201, 保存于中国典型培养物保藏中心。

实施例 1: 糖苷酶的纯化及其活性亚基的分离

1、纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*) 菌株 F16 的培养
从培养好的菌种斜面 (木聚糖培养基, 含 1.5% 琼脂) 挑取约 1cm² 见

方的菌苔，接种到 100ml 无菌的麦麸液体培养基中（木聚糖培养基成分：木聚糖 2%，酵母膏 0.2%，蛋白胨 0.2%， K_2HPO_4 0.1%），30℃、160rpm 摇瓶培养 2d。

2、木糖苷酶 Xyl_S 的分离纯化

10000g/min，离心 2min 后收集上清即为粗酶液。以对硝基苯基- β -D-木糖苷(pNP-Xyl)作为特异性生色底物对有 β -木糖苷酶活性的蛋白进行跟踪。一个酶单位定义为在 30℃，pH 7.5，以 pNP-Xyl 为底物，1h 内催化产生 1 μ mol 对硝基酚所需要的酶量。依次经过硫酸铵沉淀，收集 20%-40%阶段的沉淀组分；Toyopearl DEAE 650M 离子交换柱，收集 0.5~0.7 mol/L NaCl 阶段洗脱组分；Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析柱，收集分子量在 30kDa~200kDa 之间的活性组分；将上述活性组分过 Source 15Q 柱分离，收集比活性最高的酶活组分，即得纯的木糖苷酶 Xyl_S（图 1）。

实施例 2：木糖苷酶 Xyl_S 编码基因的克隆

以纤维化纤维微细菌（*Cellulosimicrobium cellulans*）菌株 F16 基因组 DNA 为模板，PCR 扩增木糖苷酶 Xyl_S 的编码基因 4929bp（见图 4），克隆至 pMD-T 载体上，测序验证结果显示，与 SEQ ID NO.1 所示序列一致。PCR 反应体系以及反应条件见下表：

反应体系:		反应条件:	
Cellulomonas Cellulans DNA	1 μ l	98°C	10 sec
INF (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l	55°C	15 sec
INR (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l	72°C	3 min
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l	4°C	∞
5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer (Mg ²⁺ Plus)	10 μ l		
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ l)	0.5 μ l		
dH ₂ O	Up to 50 μ l		

30 cycles

实施例 3: 木糖苷酶 Xyl_S 在大肠杆菌中的重组表达

以实施例 2 所得载体为模板, PCR 扩增目的基因 CDS 区 4929bp, 片段两侧添加 *Nde* I/*Bam*HI 酶切位点, 终止密码子 TGA 前添加 6*His 标签, 克隆至 pCold IV 表达载体中, 挑选 2 个阳性克隆质粒进行测序验证, 结果显示序列无误。即得相应重组载体。PCR 反应体系, 反应条件及所用引物见下表:

反应体系:		反应条件:	
质粒 (50 倍稀释液)	1 μ l	98°C	10 sec
5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μ l	55°C	10 sec
dNTP Mixture (各 2.5mM)	4 μ l	72°C	5 min
F01 (20pmol/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min
R01 (20pmol/ μ l)	0.5 μ l		
PrimeSTAR HS DNA Polymerase(2.5 U / μ l)	0.5 μ l		
dH ₂ O	Up to 50 μ l		

30cycles
1 cycle

引物名称	5'-序列-3'	长度 mers
INF	CTGCAGGTCGACGATTATGGCGGGCGGCGACGTCGGCGA	38
INR	AATCTCTAGAGGATCCTCAGGAGCAGGCCCGGGCGGCGTA	40
F01	AGAGGTAAATACCAATATGATGGCGGGCGGCGACGTCGGC	37
R01	GCTTGAATTCGGATCCTCAGTGATGATGATGATGATGGGA GCAGGCCCGGGCGGCGT	57
F02	ACCGTCCTGTGCGGTGCACACGTACACGGAGAACG	35
R02	CAGCTCGATCCGGGCGTTCTACTCGTTGACCTCGTTTCGGGA GCAGGCCCGGGCGGCGT	58

将上述重组载体取 1 μ l 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 使用 LB/ 抗生素 Amp(100 μ g/ml) 平板, 50 μ l 转化液涂布, 37 $^{\circ}$ C O/N 培养。Control pCold IV 进行同样操作。

分别挑取单菌落至 50 ml LB/Amp(100 μ g/ml) 培养基中, 37 $^{\circ}$ C O/N 培养, 至 OD₆₀₀ 值约为 0.6, 15 $^{\circ}$ C 15 min, 添加 100 mM IPTG 50 μ l (final 1 mM IPTG) 进行诱导, 15 $^{\circ}$ C 培养 22 hr。收集菌体细胞, 加入 10 ml 的 PBS 重悬后进行超声波破碎, 对菌体破碎液进行离心分离 (12000rpm, 5min)。

His-Trap Ni 亲和层析柱纯化目标蛋白: 以磷酸缓冲液 (pH7.5, 50mM, 含 20mM 咪唑), 1 ml/min 平衡层析柱, 随后以 0.5 ml/min 将菌体破碎液上清上样, 同样的平衡液继续洗柱, 至 OD₂₈₀ 降到基线, 以磷酸缓冲液 (pH7.5, 50mM, 含 150mM 咪唑), 1 ml/min 回收目标蛋白, 结果见图 5。

实施例 4: 木糖苷酶 Xyl_S 的关键序列在大肠杆菌中的重组表达

以实施例 2 所得载体为模板, PCR 扩增目的基因 CDS 区的第 261 个核苷酸到第 3357 个核苷酸共 3099bp, 片段两侧添加 Nde I/BamH I 酶切位点, 终止密码子 TGA 前添加 6*His 标签, 克隆至 pCold IV 表达载体中, 挑选 2 个阳性克隆质粒进行测序验证, 结果显示序列无误。即得相应重组载体。

将上述重组载体取 1 μ l 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 使用 LB/ 抗生素 Amp(100 μ g/ml) 平板, 50 μ l 转化液涂布, 37 $^{\circ}$ C O/N 培养。Control pCold IV 进行同样操作。

分别挑取单菌落至 50 ml LB/Amp(100 μ g/ml) 培养基中, 37 $^{\circ}$ C O/N 培养, 至 OD₆₀₀ 值约为 0.6, 15 $^{\circ}$ C 15 min, 添加 100 mM IPTG 50 μ l (final 1 mM IPTG) 进行诱导, 15 $^{\circ}$ C 培养 22 hr。收集菌体细胞, 加入 10 ml 的 PBS 重悬后进行超声波破碎, 对菌体破碎液进行离心分离 (12000rpm, 5min)。

His-Trap Ni 亲和层析柱纯化目标蛋白: 以磷酸缓冲液 (pH7.5, 50mM, 含 20mM 咪唑), 1 ml/min 平衡层析柱, 随后以 0.5 ml/min 将菌体破碎液上清上样, 同样的平衡液继续洗柱, 至 OD280 降到基线, 以磷酸缓冲液 (pH7.5, 50mM, 含 150mM 咪唑), 1 ml/min 回收目标蛋白, 结果见图 5。

实施例 5: 纯酶水解不同糖苷类底物的特异性实验

1、底物特异性检测

选取木糖苷、葡萄糖苷、果糖苷、甘露糖苷、岩藻糖苷、半乳糖苷和纤维二糖苷等多种生色底物, 均用 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液配制成 5mM、pH7.5 的溶液, 以 30 μ l 实施例 1 所得纯酶+150 μ l buffer+10 μ l 20 mM CaCl₂+10 μ l 底物的反应体系, 30 $^{\circ}$ C 条件下在 96 孔板中反应, BioTek hybrid Reader 酶标仪监测 405nm 下的吸光值。

结果显示, 纯的木糖苷酶 Xyl_S 仍具有高的 β -木糖苷和 β -葡萄糖苷的水解活力, 同时也有一定的 β -纤维二糖苷的水解能力 (表 1)。

表 1 底物与酶活力

底物	酶活/U/mg	
	发酵液 上清	木糖苷酶 Xyl_S
<i>p</i> NP- α -D-Xylopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- β -D-Xylopyranoside	0.810	0.191
<i>p</i> NP- α -D-Glucopyranoside	0.150	—
<i>p</i> NP- β -D-Glucopyranoside	0.810	0.294
<i>p</i> NP- α -D-Mannopyranoside	0.118	—
<i>p</i> NP- β -D-Mannopyranoside	0.038	—
<i>p</i> NP- α -D-Galactopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- β -D-Galactopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- β -D-Cellobioside	0.286	0.018
<i>p</i> NP- β -D-Fucopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- β -D-Maltoside	0.066	—
<i>p</i> NP- β -D-Glucoside	—	—
<i>p</i> NP- α -L-Arabino	—	—
<i>p</i> NP- β -L-Fucopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- α -L-Fucopyranoside	—	—
<i>p</i> NP- α -L-Rhamnopyranos	—	—

注：—代表未检测到。

2、木糖苷酶 Xyl_S 催化 *p*NP- β -D-Xyl 与 *p*NP- β -D-Glu 水解的反应动力学分析

在一个 96 孔板内，配制以下反应体系：每孔总体积 200 μ l，其中实施例 3 的完整序列重组酶和实施例 4 的关键序列重组酶均为 30 μ l，底物与缓冲液的加入量为达到以下 9 个底物浓度：5 μ M，10 μ M，20 μ M，50 μ M，100 μ M，200 μ M，500 μ M，1000 μ M，2000 μ M。以上每个浓度下做一个平行样，两底物 *p*NP- β -D-Xyl 与 *p*NP- β -D-Glu 均是如此，共占用 72 个孔，并以 *p*NP 标准品制作标准曲线。

使用 BioTek hybrid Reader 酶标仪的实时监测功能，设定每 1 min 测定一次每个孔内反应体系在 405nm 下的吸光值，共测定 61 次，以此数据计算出每个底物浓度下的初始反应速率，做出底物浓度-反应速率的米氏曲

线，求出对应的 K_m 和 V_{max} 值（图 2，图 3）。

实验结果表明，木糖苷酶 Xyl_S 对 $pNP-\beta-D-Xyl$ 的结合能力大于 $pNP-\beta-D-Glu$ （前者 K_m 值小于后者），但对二者却有着相同的转化常数 K_{cat} （即最大反应速率与酶浓度的比值， $V_{max}/[E]$ ）。也即，木糖苷酶 Xyl_S 对 β -木糖苷化合物和 β -葡萄糖苷化合物有着相同的转化能力。同时，只表达关键区域后，酶对底物的亲和力略有下降，但仍具有相同活力，能够很好地水解底物（表 2）。

表 2 酶促反应动力学参数

底物	K_m μM		V_{max} $\mu mol/h\ mg$	
	完整表达	关键表达	完整表达	关键表达
$pNP-\beta-D-xylopyranoside$	20.2 ± 2.8	33.8 ± 3.7	4.97 ± 0.14	4.92 ± 0.05
$pNP-\beta-D-glucopyranoside$	64.5 ± 7.7	92.3 ± 4.3	5.02 ± 0.06	4.96 ± 0.11

实施例 6：木糖苷酶 Xyl_S 在毕赤酵母中的重组表达

将实施例 2 所得 Xyl_S 基因的 CDS 区域通过 PCR 方法在其 5'端、3'端分别加上 *Xho* I、*Xba* I 酶切位点，连接到重组表达质粒 pPICZ α 中（加入分泌表达信号肽和组氨酸标签），测序验证序列的正确性。将验证无误的重组载体电转化法转入巴斯德毕赤酵母中，甲醇诱导表达。离心去菌体，上清作为粗酶液，采用与实施例 4 同样的亲和层析柱分离纯化重组蛋白。

实施例 7：木糖苷酶 Xyl_S 在枯草芽孢杆菌中的重组表达

将实施例 2 所得 Xyl_S 基因的 CDS 区域通过 PCR 方法在其 5'端、3'端分别加上 *Bam*HI、*Hind*III 酶切位点，连接到 pP43NMK 穿梭表达载体中（添加了组氨酸标签），测序验证序列的正确性，将验证无误的重组载体

转入枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 1A752S 中。离心去菌体，上清作为粗酶液，采用与实施例 4 同样的亲和层析柱分离纯化重组蛋白。

实施例 8：木糖苷酶 Xyl_S 的应用

1、纯酶水解 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇（10 DAXT）

将纯度为 99% 的 10 DAXT 以 10 mg/ml 的终浓度溶解于甲醇之中，以 200 μ l 的反应体系进行水解反应：其中来自实施例 3 的纯酶 30 μ l+150 μ l Tris 盐酸缓冲液（50mM, pH7.5）+10 μ l CaCl_2 +10 μ l 底物。在 35℃ 下反应 15min 后，加入 200 μ l 甲醇终止反应，HPLC-UV 方法检测转化率，检测结果见图 6。

具体检测方法：色谱柱：Kromasil C₁₈ 色谱柱（200mm×4.6mm i.d., 5 μ m）；流动相：乙腈：水（V/V），具体梯度：0-15min, 30→70；15-22min, 10%→10%；22-30min, 70%→70%；柱温 40℃；检测波长：227 nm；流速：1.0ml/min；进样量：20 μ l。

若想将体系中全部的 10 DAXT 均转化为 10 DAT，可继续反应~105min 即可。

2、纯酶水解 7-木糖紫杉烷混合物

以 7mg/ml 的终浓度溶解 7-木糖紫杉烷混合物于甲醇之中，反应体系，反应条件及检测方法均与上例中水解 99% 纯度的 10 DAXT 基本相同，不同的是反应时间改为 30min，检测结果见图 7。

此外，通过 UPLC-PDA-MS 法对其水解前后的分子量进行了质谱分析，具体方法如下：Kromasil C₁₈ 色谱柱（200mm×4.6mm i.d., 5 μ m）。Tedia 公司色谱纯乙腈，Millipore 公司超纯水。质谱用 ESI 接口离子源，氮气为夹

套气和吹扫气，夹套气压力 40psi，辅助气 20 a.u.，源电压 4.0kV，毛细管温度 200℃，雾化器温度 325℃。检测结果见图 8。

3、纯酶水解黄芪甲苷 IV

以 5mg/ml 的终浓度溶解黄芪甲苷 IV 纯品于甲醇之中，以 200 μ l 的反应体系进行水解反应：其中来自实施例 3 的纯酶 30 μ l+150 μ l Tris 盐酸缓冲液（50mM，pH7.5）+10 μ l CaCl_2 +10 μ l 底物。在 35℃下反应 15min 后，检测方法采用 TLC 法进行（图 9）。

权 利 要 求 书

1、一种木糖苷酶 Xyl_S，其特征在于：其氨基酸序列包含如序列表中 SEQ ID NO.2 所示序列的至少 1642 个氨基酸序列。

2、按照权利要求 1 所述木糖苷酶 Xyl_S，其特征在于：其氨基酸序列包含 SEQ ID NO.2 所示序列的第 24 个氨基酸残基到第 1151 个氨基酸残基在内的至少 1128 个氨基酸序列。

3、按照权利要求 2 所述木糖苷酶 Xyl_S，其特征在于：其氨基酸序列包含 SEQ ID NO.2 所示序列的第 87 个氨基酸残基到第 1119 个氨基酸残基在内的至少 1033 个氨基酸序列。

4、一种木糖苷酶 Xyl_S 的编码基因，其特征在于：该基因的核苷酸序列具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的至少 4929 个核苷酸。

5、按照权利要求 4 所述木糖苷酶 Xyl_S 的编码基因，其特征在于：所述基因的核苷酸序列具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的第 72 个核苷酸到第 3453 个核苷酸在内的至少 3372 个核苷酸。

6、按照权利要求 5 所述木糖苷酶 Xyl_S 的编码基因，其特征在于：所述基因的核苷酸序列具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的第 261 个核苷酸到第 3357 个核苷酸在内的至少 3099 个核苷酸。

7、一种含有权利要求 4 所述编码基因的重组载体。

8、按照权利要求 7 所述的重组载体，其特征在于：该重组载体是大肠杆菌表达载体、酿酒酵母表达载体、毕赤酵母表达载体、枯草芽孢杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、丝状真菌表达载体中的任意一种。

9、一种含有权利要求 7 所述重组载体的重组细胞株。

10、按照权利要求 9 所述的重组细胞株，其特征在于：该重组细胞株的宿主细胞是大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌、乳酸菌、丝状真菌的任意一种。

11、按照权利要求 9 所述的重组细胞株，其特征在于：该重组细胞株表达木糖苷酶 Xyl_S，既能够胞内表达，也能够分泌到细胞外。

12、一种应用，其特征在于：权利要求 1 所述木糖苷酶 Xyl_S 或权利要求 9 所述重组细胞株应用于医药，生物，农业，能源领域，将木糖苷化合物中的糖苷键水解，获得相应的苷元。

13、一种应用，其特征在于：权利要求 1 所述木糖苷酶 Xyl_S 或权利要求 9 所述重组细胞株应用于医药，生物，农业，能源领域，将葡萄糖苷化合物中的糖苷键水解，获得相应的苷元。

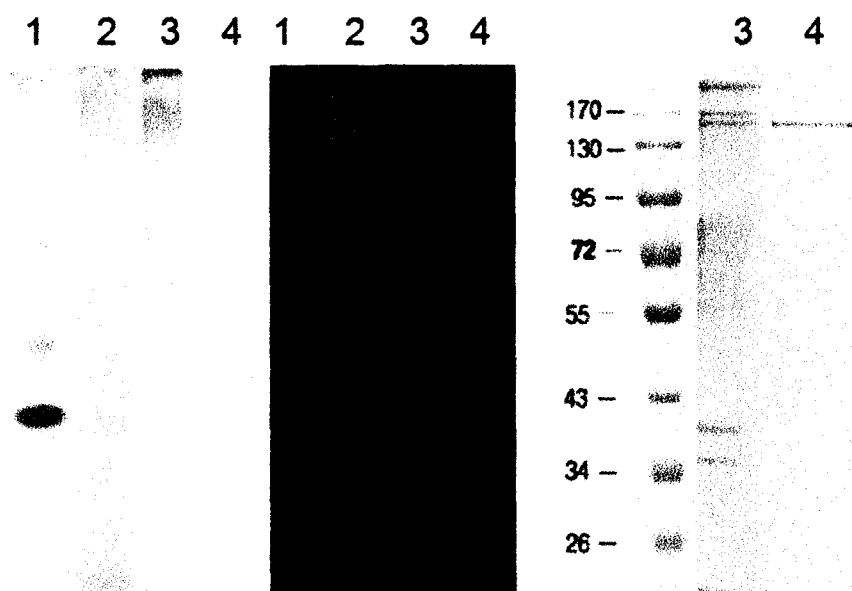


图 1

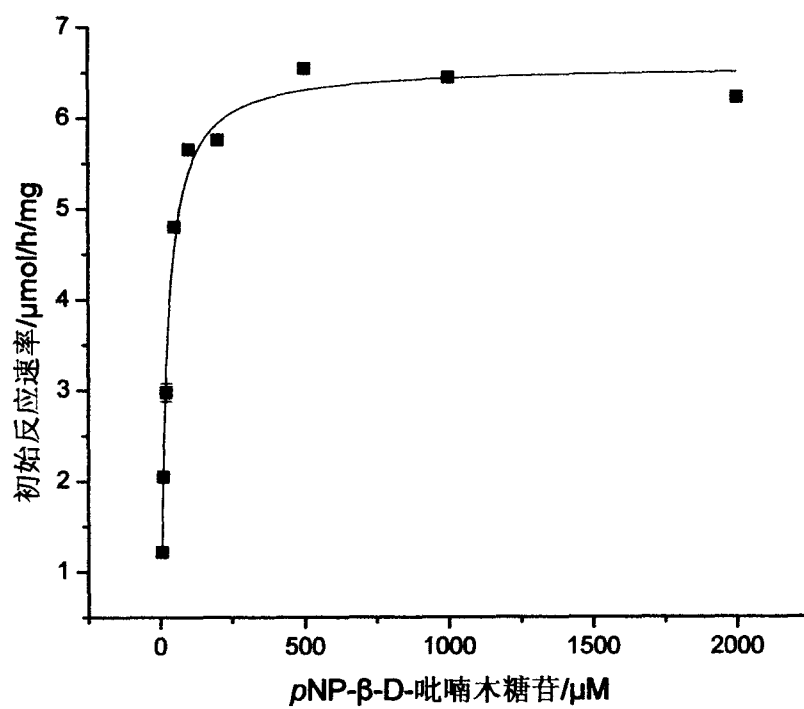


图 2

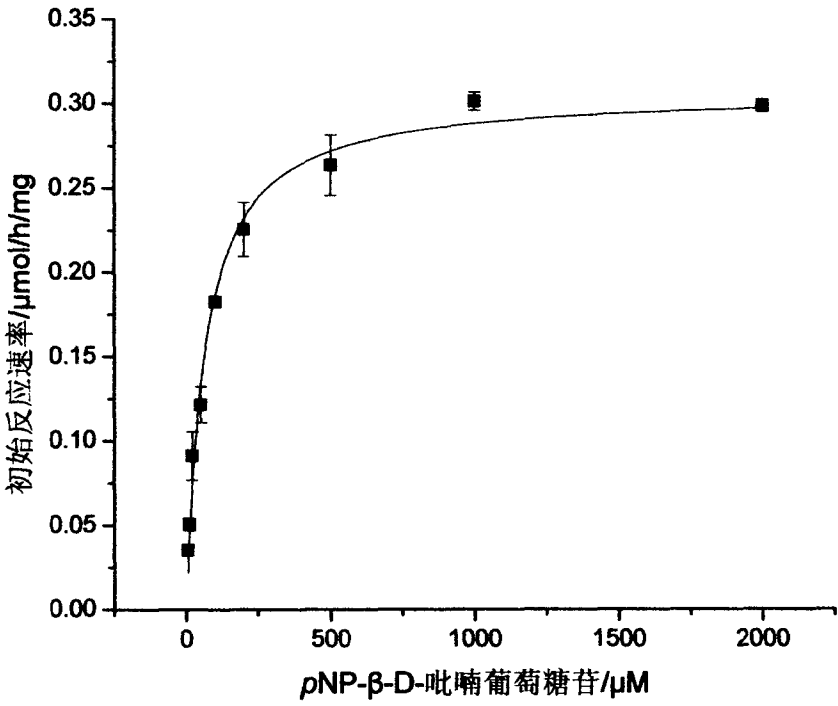


图 3



图 4



图 5

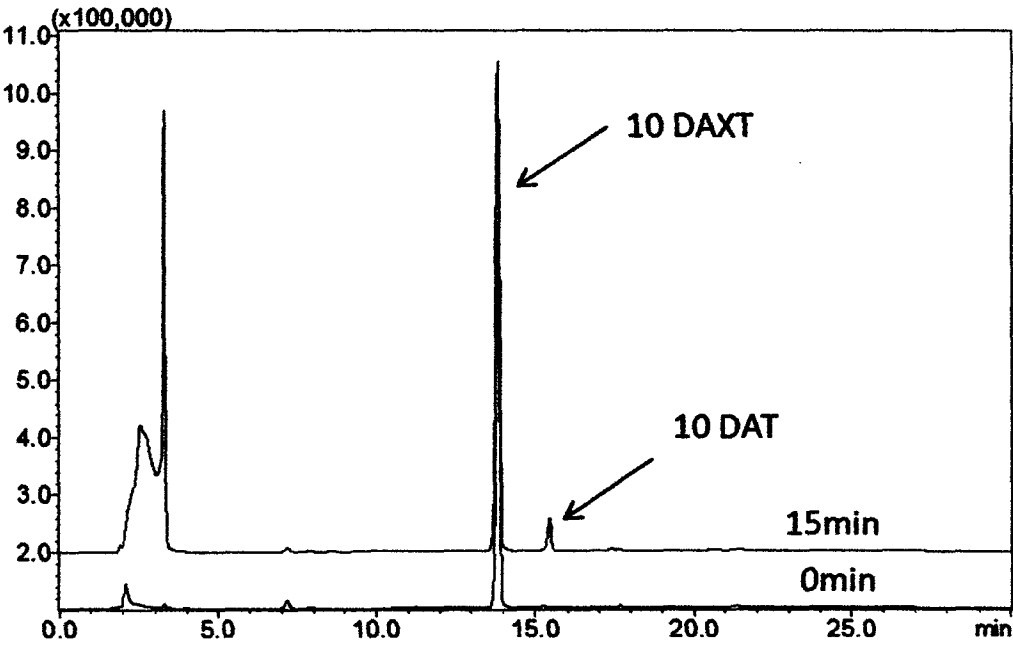


图 6

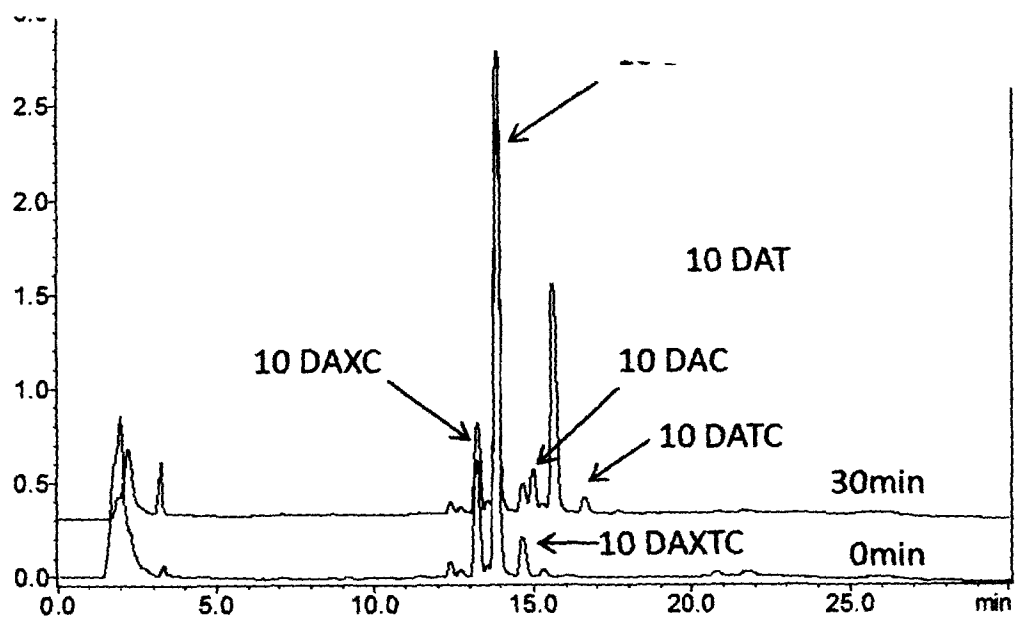


图 7

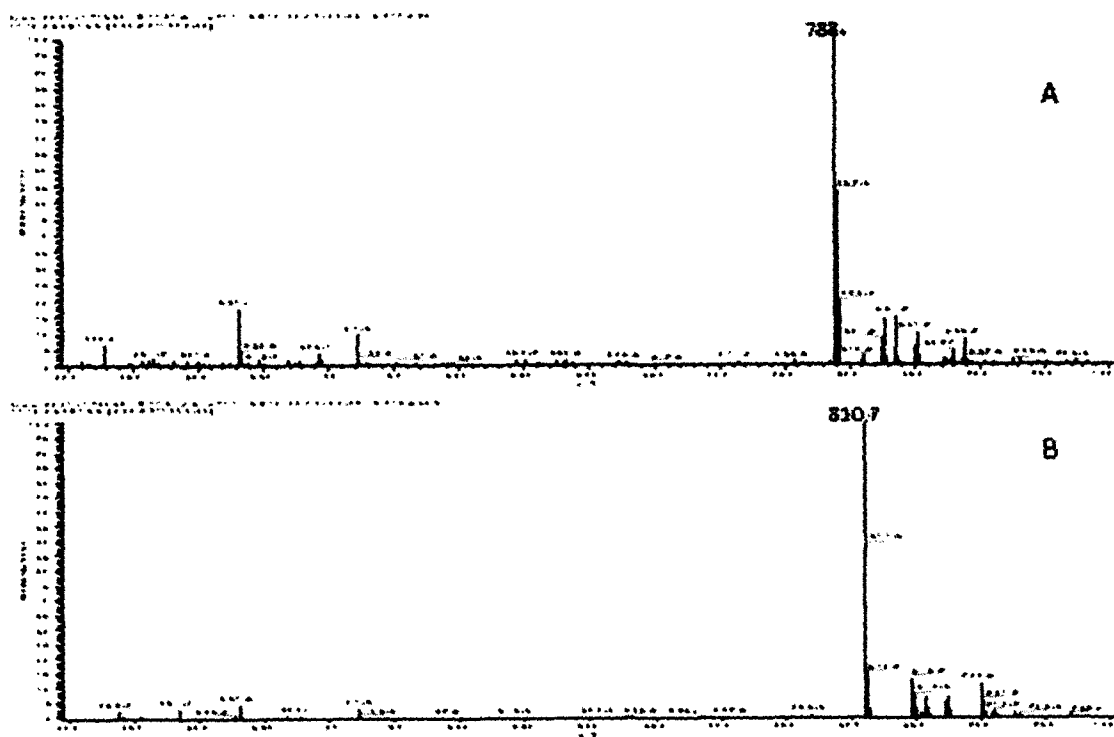


图 8

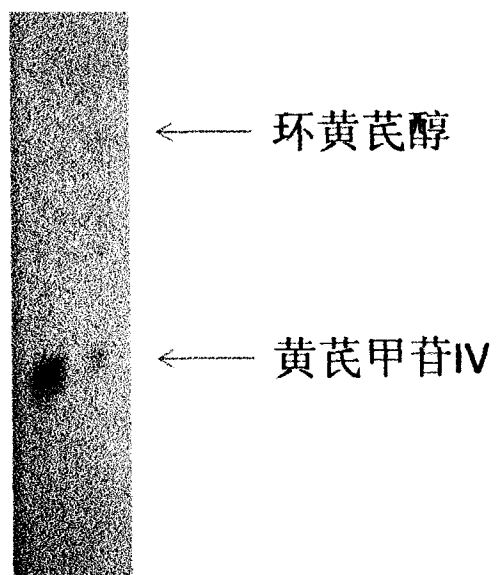


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, C12P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, GenBank, EMBL, DDBJ

Search terms: xylosidase, glucoside, glucosidase, cellulosemicrobium, sequence search of SEQ ID NOs: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011160484 A1 (INSTITUTE OF MATERIAL MEDICA, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES), 29 December 2011 (29.12.2011), see the whole document	1-13
A	CN 101870966 A (FUDAN UNIVERSITY), 27 October 2010 (27.10.2010), see the whole document	1-13
A	CHEN, Tianjiao et al., Catalytic Property of Glycoside Hydrolases for 7-Xylosyltaxanes Lxyl-p1-1 and Lxyl-p1-2, JOURNAL OF FUNGAL RESEARCH, May 2013, vol. 11, no. 2, page 151, ISSN: 1672-3538, see abstract	1-13
A	ZHOU, J. et al., Beta-Xylosidase Activity of A GH3 Glucosidase/Xylosidase from Yak Rumen Metagenome Promotes the Enzymatic Degradation of Hemicellulosic Xylans, LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, February 2012, vol. 54, no. 2, pages 79-87, see the whole document	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 March 2014 (06.03.2014)	Date of mailing of the international search report 20 March 2014 (20.03.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XU, Yijun Telephone No.: (86-10) 62411083

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/001509

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2011160484 A1	29.12.2011	CN 102296053 A	28.12.2011
		US 2013130330 A1	23.05.2013
		CN 103097528 A	08.05.2013
		JP 2013538043 A	10.10.2013
		CA 2804879 A1	29.12.2011
		EP 2586860 A1	01.05.2013
CN 101870966 A	27.10.2010	CN 101870966 B	01.08.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001509

CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/42 (2006.01) i

C12N 15/56 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

C12N 1/19 (2006.01) i

C12N 1/21 (2006.01) i

C12P 19/14 (2006.01) i

C12R 1/19 (2006.01) n

C12R 1/645 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/001509

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12N,C12P,C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNABS,CPRSABS,DWPI,SIPOABS,CPEA ,CNKI,ISI WEB OF KNOWLEDGE,GenBank,EMBL,DDBJ

检索词: 木糖苷酶, 葡萄糖苷, 葡萄糖苷酶, xylosidase, glucoside, glucosidase, cellulosemicrobium, 关于 SEQ ID NO:1-2 的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2011160484 A1 (中国医学科学院药物研究所) 29.12 月 2011 (29.12.2011), 参见全文	1-13
A	CN 101870966 A (复旦大学) 27.10 月 2010 (27.10.2010), 参见全文	1-13
A	陈天娇等, 7-木糖紫杉烷糖基水解酶 Lxyl-p1-1 及 Lxyl-p1-2 的催化特性, 菌物研究, 5 月 2013, 第 11 卷, 第 2 期, 第 151 页, ISSN: 1672-3538, 参见摘要	1-13
A	Zhou J 等, Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from yak rumen metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans, LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 2 月 2012, 第 54 卷, 第 2 期, 第 79-87 页, 参见全文	1-13

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

06.3 月 2014 (06.03.2014)

国际检索报告邮寄日期

20.3 月 2014 (20.03.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

徐益君

电话号码: (86-10) **62411083**

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☐ 包含在申请提交时的国际申请中

☒ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/001509

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 2011160484 A1	29.12.2011	CN 102296053 A	28.12.2011
		US 2013130330 A1	23.05.2013
		CN 103097528 A	08.05.2013
		JP 2013538043 A	10.10.2013
		CA 2804879 A1	29.12.2011
		EP 2586860 A1	01.05.2013
CN 101870966 A	27.10.2010	CN 101870966 B	01.08.2012

续: A. 主题的分类

C12N 9/42 (2006.01) i

C12N 15/56(2006.01) i

C12N 15/63(2006.01) i

C12N 1/19(2006.01) i

C12N 1/21(2006.01) i

C12P 19/14(2006.01) i

C12R 1/19(2006.01) n

C12R 1/645(2006.01) n