

综述

饲料用酶制剂的研究进展与趋势

杨培龙, 姚斌

中国农业科学院饲料研究所 农业部饲料生物技术重点开放实验室, 北京 100081

摘要: 饲料用酶目前已成为世界工业酶产业中增长速度最快、势头最强劲的一部分。畜牧业开发应用饲料用酶制剂有着重大意义: 可缓解饲料资源短缺、人畜争粮的局面, 有利于保障粮食安全; 提供更为安全、优质的动物产品, 有利于保障食品安全; 减轻环境污染, 保障养殖业的可持续发展。饲料用酶的应用效果已在世界范围内得到公认, 但酶的使用量还较低, 其主要原因在于饲料用酶的性质难以满足饲料工业的要求, 以及饲料用酶表达量低, 生产成本较高。因此, 目前的研发趋势主要体现在: 1) 饲料用酶基因资源的高通量筛选技术, 尤其是特殊环境微生物和未培养微生物中的基因资源; 2) 酶蛋白的分子改良技术, 利用蛋白质工程技术定向改良, 创造具有优良特性的酶蛋白质分子, 进一步提高饲料用酶的应用性能; 3) 饲料用酶高效表达和生产技术; 4) 饲料用酶的应用效果快速评估技术和配套应用技术体系。

关键词: 饲料酶制剂, 基因克隆, 高通量筛选, 蛋白质工程, 高效表达, 应用技术

Research and development of enzymes used in feed

Peilong Yang, and Bin Yao

Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Enzymes can degrade the anti-nutrient factors in feedstuff, increase nutrient digestibility, and reduce pollution to environment, and have been widely supplemented in animal feedstuff. However, the use of enzymes is limited because of their undesirable properties, such as thermolability and susceptibility against protease digestions. And its commercialization is also limited by low production efficiency and high cost. Therefore, the focuses for future enzyme development will be: 1) to obtain novel enzymes with better properties by high-throughput screening of enzyme encoding genes, especially those from extreme and special environments; 2) to improve enzyme properties using directed mutagenesis and protein engineering methods; 3) to achieve high-level fermentation of enzymes by heterogenous expression and optimization of codons, vectors and fermentation conditions; 4) to determine the effect of enzymes to animals and utilize enzymes efficiently.

Keywords: feed enzymes, gene cloning, high-throughput screening, protein engineering, high-level expression, utilization

1 饲料酶制剂的发展及意义

饲料中添加酶制剂的研究最早始于上世纪中叶。50年代, Jensen 等将酶添加到家禽日粮中, 发现

其可以改善鸡的生产性能^[1]。70年代, 美国把微生物酶制剂添加到大麦饲料中, 取得了显著效果, 并引起了普遍重视, 出现了世界上首个商品饲用酶制剂。但由于对其认识不足, 饲用酶制剂相对于其他

Received: October 10, 2009; Accepted: October 28, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100601).

Corresponding author: Bin Yao. Tel: +86-10-82106053; Fax: +86-10-82106054; E-mail: yaobin@caas-bio.net.cn

国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2007AA100601)资助。

工业用酶发展缓慢, 在饲料中大量应用添加酶制剂是在 90 年代才开始的, 且发展极为迅速, 欧洲 90% 以上的饲料中添加了 β -葡聚糖酶, 而世界范围内以大麦和小麦为基质的禽饲料中添加率为 60%, 猪饲料中添加率达到了 80%。随着人们对动物营养学、饲料学研究的深入和集约化养殖的形成, 饲料用酶的良好前景得以体现, 同时分子生物学和基因工程技术的发展, 使饲料用酶的规模化廉价生产成为可能。目前饲料用酶已成为世界工业酶产业中增长速度最快、势头最强劲的一部分。

目前世界上生产用酶多达 300 多种, 饲料用酶近 20 种^[2], 其中木聚糖酶^[3]、 β -葡聚糖酶^[4]、植酸酶以及 α -半乳糖苷酶、 β -甘露聚糖酶^[5]、蛋白酶^[6]和淀粉酶等是最重要的几种饲料用酶, 它们多为消化性的水解系列酶。在饲料中使用酶制剂可以达到以下几个目的: 消除饲料中的抗营养因子, 如植酸酶和半纤维素酶可降解饲料中的植酸、木聚糖和葡聚糖等; 补充动物内源酶, 如蛋白酶、脂肪酶等。我国是一个养殖大国, 在我国养殖业中推广应用这些新产品有着更为重大的意义。其一, 可以缓解饲料资源短缺。我国养殖业产品的产需处于刚性增长的态势, 到 2020 年, 饲料需求量预计将达 4 亿吨, 饲料粮缺口将逐渐增加, 通过饲料用酶的应用可消除饲料粮中的抗营养因子, 提高饲料利用率, 节约饲料资源。第二, 减轻环境污染。应用酶制剂可大大减少畜禽排泄物中的有机物、氮、磷等的排出量, 从而大幅度减少它们对土壤和水体环境的污染。第三, 提供更为安全的动物产品。酶本身是一种蛋白质, 是由生物产生的天然产物, 无任何毒副作用、无残留, 已被公认为“绿色”添加剂, 另一方面, 它还具有控制、预防动物疾病, 改善动物健康的作用。通过在饲料中应用酶制剂而减少抗生素等对人体有害的饲料添加剂的使用, 对获得优质、安全的动物产品有重要意义。

2 饲料酶制剂发展面临的主要问题

饲料用酶的应用效果已在世界范围内得到了公认, 但到目前为止, 除了专一性用于以大麦为主要饲料粮的饲料中的 β -葡聚糖酶和近几年实现重大突

破的植酸酶外, 别的各种饲料用酶在饲料中的使用量总和不足 10%。饲料用酶与其他成熟的饲料添加剂相比, 其应用水平还很低, 饲料用酶的实际应用与饲料用酶对动物营养健康方面的大量研究相比不成比例, 其根本的原因在于以下几点:

第一, 目前酶制剂的性质不能满足饲料工业的实际应用需求。由于动物摄食、营养和饲料加工过程的特殊需求, 饲用酶制剂具有一定的特殊性。真正适合于饲料中使用的酶必须具有好的热稳定性而同时在常温下具有高活性; 最适 pH 在酸性同时在整个酸性和中性的 pH 范围内又能维持较高活性; 对动物胃、胰蛋白酶和别的蛋白酶具有较好的抗性等综合性质。目前大多饲料用酶的性质不够优良, 在酶的 pH 性质、热稳定性^[7]、抗胃蛋白酶能力等方面严重不足, 其有效性不能充分发挥, 难以满足饲料工业的要求, 从而难以有效推广应用, 尤其是目前市场上的许多饲料用酶制剂原本是轻工业用酶, 其性质上与饲料专用酶制剂的要求相差较大, 使其饲喂效果大打折扣。

第二, 饲料酶制剂添加成本较高。饲料用酶仅是饲料添加剂中的一类, 其添加成本空间有限。从我国饲料业现状来看, 如不考虑减轻环境污染等社会效益, 饲料用酶的添加成本每吨配合饲料不能超过 100 元, 否则会增加养殖成本。这就要求饲料用酶必须能规模化廉价生产, 这也正是饲料用酶的应用效果已得到公认的前提下, 绝大多数的饲料用酶未能广泛应用的最根本原因之一。饲料用酶大多来源于微生物, 但在天然菌株中含量太低, 难以大量生产, 生产成本高昂。因此, 获得具有高比活性的酶制剂及其编码基因, 并利用基因工程技术构建高效表达饲料用酶的生物反应器是解决这一问题的最有效的途径。事实上, 目前仅有的得以较大规模应用的两种饲料用酶—— β -葡聚糖酶和植酸酶均是近年来利用基因工程技术才实现的^[8]。

第三, 饲料酶制剂的应用。作为一种生物催化剂, 与其他生物活性物质一样, 饲料酶制剂需要在特定的条件下才能发挥作用, 其单一或复合型应用都需要在探讨其分子营养机制的基础上构建特异的应用技术体系^[9]。

3 研究进展与发展趋势

针对上述饲料用酶存在的问题,结合分子生物学、生物技术、蛋白组学和分子营养学等学科的发展,目前的研究及开发主要包括如下一些方面:其一是新型酶制剂高通量筛选平台和蛋白质改良技术平台的建立,以期获得符合饲料应用的优质新酶种;其二是高效表达生物反应器技术平台的建立,通过高效表达菌株的获得、高细胞密度发酵工艺及其优化,提高酶制剂产品的产量,降低其生产成本;第三,建立饲料用酶制剂的应用效果快速评估系统和配套应用技术。

3.1 新型优质饲料用酶的获得

3.1.1 新型饲料用酶或其编码基因的筛选

自然界中微生物所产的酶具有丰富性和多样性,为了满足饲用酶制剂生产及应用的特殊要求,需要采用各种方法进行资源挖掘,尤其是特殊环境及极端环境的微生物酶资源。

传统的酶或基因分离方法是基于分离培养微生物筛选的单个基因或蛋白的分离及序列分析。但是,自然界存在 95%以上的未培养微生物,采用传统途径寻找新的饲用酶制剂及其基因往往受到局限。随着生物技术、基因和蛋白质序列数据库以及生物信息学的发展,新型饲用酶及其编码基因的分离获得效率得到了很大提升。根据大量的序列和酶蛋白质的结构分析,可以得到酶蛋白或其编码基因的保守序列,由此设计简并引物,可以从单一菌株或环境总 DNA 中扩增获得目标酶的保守基因片段,再利用各种克隆手段如 TAIL-PCR、染色体步移(Genome walking)等,可以得到大量全长新基因。例如, Huang 等通过数据库序列分析发现了中性 β -折叠桶植酸酶的保守位点序列,由此设计简并引物,在草鱼肠道环境 DNA 中批量扩增中性植酸酶基因片段,并进一步获得多个全长编码基因,经异源表达验证,这些基因编码产物具有植酸酶活性,且大多较为新颖^[10]。

近年来,高通量筛选已经成为基因或酶蛋白分离的主要研究内容。其中宏基因组技术的发展极大地扩展了微生物资源的利用空间,提高了获得新酶或新基因的效率^[11-12]。一些特殊或极端环境宏基因组文库已经构建,例如瘤胃、深海、冰山及高温泉

水等环境。文库的构建结合特定的筛选方法可以高效地批量获得新编码基因。中国农业科学院饲料研究所经过十几年尤其是近几年的研究,构建了饲料用酶高效筛选平台,从各种特殊或极端环境中(包括动物瘤胃、海水鱼和淡水鱼的胃消化道、天牛消化道、冰川土壤、火焰山土样、高温泉及土壤等)分离了 200 多个饲料用酶编码新基因,并筛选获得了多种符合饲料应用要求的优质酶制剂。例如,来源于中间耶尔森氏菌的高比活植酸酶 Y4,其比活性高达 3960 U/mg,是目前报道中最高的,它的最适 pH 为 4.5,具有较好的热稳定性,有较强的胰蛋白酶和胃蛋白酶抗性,综合性质符合饲料工业的要求,远远优于目前工业上普遍应用的大肠杆菌和曲霉植酸酶^[13];另有一种植酸酶在人工模拟动物消化道环境下具有较高的水解植酸的能力^[14]。依据不同动物和不同消化阶段的特异需要,还筛选得到了其他具有某些特殊性质的酶。例如,适合单胃动物消化道环境,在 pH 2~3 时具有高活性的嗜酸木聚糖酶^[15]、 β -葡聚糖酶^[16]和 β -甘露聚糖酶^[17];抗各种蛋白酶降解的木聚糖酶^[18]、脂肪酶^[19]和 α -半乳糖苷酶^[20];适合水产动物应用的中性植酸酶^[21]、 β -甘露聚糖酶^[22]等。这些酶的获得,一方面可以满足饲料工业的各种不同需求,另一方面可加深对酶关键性质与其结构和功能的了解,指导进一步的分子改良。

3.1.2 蛋白质工程技术在饲料用酶中的应用

另外一种获得新型酶制剂的方法是利用蛋白质工程技术定向改良天然酶,甚至于创造新的具有优良特性的酶蛋白质分子,以解决天然酶难以完全符合饲料工业应用的要求,并进一步提高其应用性能。

随着蛋白质结构和功能研究的增多,很多酶蛋白的作用机理及一些影响酶蛋白质功能的关键位点也逐渐清晰,基于蛋白质结构及其生化特性基础上的合理设计蛋白质工程技术在上世纪 80 年代逐渐发展起来,其可以对蛋白质进行某些位点的改变或者构建新颖的杂合酶^[23-24]。应用这些技术,在饲料用酶的热稳定性、比活性及 pH 适性等改良方面,已进行了许多有益的尝试。Olsen 等将来源于淀粉液化芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的 β -葡聚糖酶(AMY)基因与来源于浸麻芽孢杆菌 *B. macerans* 的

β -葡聚糖酶(MAC)基因相对应互补的片段进行杂合, 得到一系列的杂合 β -葡聚糖酶的编码基因, 其中一些杂合酶的比活有较大程度的提高, 3个杂合酶的热稳定性有较大幅度的提高, 在65°C处理60 min后, 酶的剩余活性还在85%以上^[25]。本实验室 Yang 等将来源于一株链霉菌的木聚糖酶进行N端替换, 同时在蛋白中引入二硫键结构, 结果两种突变可以产生协同作用, 其在70°C处理20 min后保留的酶活提高12.4倍, 酶蛋白半衰期从3 min变为150 min^[26]。另外, 将一种酸性植酸酶序列中的51位Ser替换为Ile或Thr后, 其最适pH值可由2.5变为5.0左右, 认为该酶的最适pH值不仅是关键氨基酸电荷的作用, 还受氨基酸侧链长度的影响^[27]。

通过随机突变和高通量定向筛选进行的定向进化技术能够更有效地获得目的酶蛋白。它是通过将酶蛋白的氨基酸序列和结构的信息与功能鉴定相结合, 构建酶基因突变库, 再通过特定酶或特定酶性能的高通量筛选平台, 最终获得综合性能优良的改良酶, 建立快速酶分子改良技术平台^[28]。上世纪90年代逐渐发展起来的DNA改组(DNA shuffling)技术可提高基因进化的效率, 大大促进了定向进化技术的发展。如Garrett等对一种植酸酶突变后进行耐热性筛选, 获得的新酶具有较高的耐热性, 在肠胃环境中更加稳定^[29]。魏威等通过随机突变, 将来源于黑曲霉 *Aspergillus niger* 的植酸酶基因进行改造, 结果其在重组大肠杆菌中的表达量有较大提高, 重组蛋白具有较好的热稳定性^[30]。孙军等利用DNA改组的方法获得耐高温植酸酶, 其在60°C和70°C处理10 min后酶活分别保持100%和80%, 较原始酶有了明显改善^[31]。本实验室也通过基因改组, 将瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 木聚糖酶的比活性从7800 IU/mg 提高到19 000 IU/mg, 但其热稳定性并未得到改良(未发表)。

随着自然界中酶或其基因的序列、结构和功能的多样性发展, 蛋白质工程技术也日趋多样, 而蛋白质工程的研究又可以促进人们对于这些多样性的理解。而酶多样性与合理设计、定向进化等各种技术方法结合应用, 会取得比某种单独技术更为优异的效果。例如Lehmann等根据6种真菌来源的13个植酸酶蛋白质序列比较, 设计并构造出热稳定性显著

提高的植酸酶, 其变性温度可提高15°C~27°C^[32]。他们进一步设计获得了变性温度达85°C~94°C的耐高温植酸酶, 而通过定点突变技术对其38个突变氨基酸进行分析, 发现单独位点的影响小于3°C^[33]。

3.2 饲料用酶制剂的高效表达与生产

限制饲料酶制剂大量应用的瓶颈之一是酶制剂表达和生产的效率。由于传统的生产方式多是利用产酶菌株发酵获得, 其往往表达量偏低, 酶活不足以满足生产的需要。因此, 利用基因工程、代谢工程技术, 构建高效生物反应器技术平台, 使饲料用酶的单位产量大量提高, 可以解决饲料酶制剂添加成本的问题。

考虑到饲料行业的特殊要求, 高效和安全是重组表达系统必须考虑的问题。这要求表达系统受体菌为蛋白酶缺陷型, 又有良好的生长特性; 具有强诱导型启动子, 且高效分泌表达, 这样可提高表达量, 且易于产品后加工; 菌丝体易去除, 工艺简便且回收率高; 整合型表达, 稳定性好; 营养缺陷型筛选, 不含抗生素标记, 具备较好的安全性。

目前, 大肠杆菌、芽孢杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母和曲霉等表达体系都在饲料用酶的异源表达和生产中得到应用。大肠杆菌表达系统是发展最早且应用最广泛的表达系统, 很多饲料用酶基因在大肠杆菌中能重组表达并表现活性^[18-19,22]。芽孢杆菌表达系统主要有枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌两种, 由于不同蛋白质的表达效率存在很大的差异, 其大多还处在研究改进阶段。例如, Gerlach等在大肠杆菌植酸酶 *appa* 基因的前端添加特异信号肽, 使其能够在枯草芽孢杆菌中分泌表达^[34]。Lee等将大肠杆菌植酸酶在酿酒酵母中表达^[35], 来自烟曲霉的植酸酶基因也在黑曲霉中得到了表达^[36]。但总体来讲, 目前表达效果最好的是毕赤酵母表达系统, 同种植酸酶在毕赤酵母中诱导表达量远高于酿酒酵母^[35]。姚斌等利用毕赤酵母表达黑曲霉来源的植酸酶, 重组酵母表达量比原菌株提高3000倍, 达到了生产的要求^[37]。目前, 饲料用木聚糖酶、 β -葡聚糖酶和 β -甘露聚糖酶等都在毕赤酵母中得到了高效表达^[13,15-17]。

3.2.1 重组微生物表达饲料用酶的优化

重组表达菌株的酶活提升可以从两方面来解决,

其一是筛选获得具有高比活性的饲料用酶编码基因,同等表达量的情况下,高比活酶可以表现显著的生物活性,具有较大的应用价值。目前已有多种重要的高比活性饲料用酶编码基因进行了克隆和异源表达(表 1)。第二个提高酶制剂活性的有效手段是提高外源基因在宿主中的表达量。表达量的提高通常可通过几种方法实现,包括目标基因的优化(优化密码子及其 mRNA 结构预测及调整);启动子改良或多启动子组合;信号肽改良;增加辅助蛋白或分子伴侣(如解决溶氧的血红蛋白、加快蛋白转运速度的元件等);能稳定遗传和表达的多拷贝技术;整合位点的控制等。如用于生产还需要进行发酵水平上发酵参数的调整,重组菌株需保持遗传稳定性和表达稳定性。

密码子的优化常常被应用到提高目标基因在异源表达宿主中的表达量。Zou 等将一个中性植酸酶基因 *phyCs* 进行改造后,其在毕赤酵母中的表达量大幅提高^[44]。近年来对外源基因阅读框(包括密码子)的改造逐步采用了更合理的方法:第一,综合考虑宿主中密码子组分和密码子的使用频率,再根据宿主中高表达基因的密码子使用情况调整目标基因,使其在密码子的使用频率上和这些高表达的基因一致,这样可以排除目标基因中存在低频密码子并提高宿主转运 RNA 的利用效率。第二,表达载体的信号肽及前导序列同样进行密码子优化,以及信号肽结构的改造。熊爱生等证明利用偏爱密码子,一个植酸酶基因在毕赤酵母中表达量提高 2 倍,而和改造信号肽共同作用,可以提高 14.5 倍^[45-46]。第三,调整整个编码阅读框的 GC 含量使其符合宿主的要求,如 Huang 等经过分析发现外源基因 GC 含量在

40%~50%时在毕赤酵母中的表达量较高^[47]。第四,根据生物信息学软件对编码区 mRNA 结构和稳定性进行预测和分析,根据其折叠自由能及二级结构复杂度对局部编码区进行优化。减少局部特别强的回文结构以及特别松散的结构区域,使 mRNA 结构在整体上趋于均匀,并降低 mRNA 翻译起始区域的复杂度。Huang 等将毕赤酵母信号肽和 β -葡聚糖酶基因作为整体进行密码子优化,并对转译起始位点处碱基进行修饰,最终 β -葡聚糖酶表达量提高 2.3 倍^[47]。综合采用各种优化方法,本实验室多种饲料用酶基因在毕赤酵母中都得到了高效表达,木聚糖酶、 β -葡聚糖酶和 β -甘露聚糖酶的酶活性最高分别达 100 000、30 000、8000 U/mL,植酸酶活性达 50 000 U/mL,表达量均已达到生产水平。

3.2.2 转基因植物表达饲料用酶

利用转基因植物表达生产饲料用酶制剂越来越引起人们的注意,外源基因即可以在植物中组成型表达,也可在种子、根部或块茎中特异表达。已有多种微生物来源的植酸酶、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶在烟草、马铃薯、油菜、玉米和水稻中进行表达,并且对植物的生长发育没有不利的影响。例如, Jensen 等将一种耐热的 β -葡聚糖酶在大麦中实现了稳定表达,其酶蛋白的表达量最高为 40 μ g/mg 可溶性蛋白,定位于种子的贮存液泡中^[48-49]。Kimura 等将热纤梭菌 *Clostridium thermocellum* 的热稳定性木聚糖酶 *XYNA* 基因转化水稻,证明基因可以在水稻秸秆和种子里稳定表达^[50]。本单位利用烟草和马铃薯表达一种高比活性的木聚糖酶,结果转基因植株具有较高的酶活性,并保持稳定遗传^[51-52]。中国农业科学院生物技术研究所利用转基因玉米种子特异高效表达植酸

表 1 比活较高的主要饲料用酶

Table 1 Main feed enzymes with high specific activity

Enzyme	Specific activity (U/mg)	Sources	Expressed strains	Reference
Phytase	3960	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Pichia pastoris</i>	[13]
	1122	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Escherichia coli</i>	[38]
	10800/7980	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>P. pastoris</i> / <i>E. coli</i>	[39]
β -Glucanase	6001	<i>Peanibacillus</i> sp.	<i>P. pastoris</i>	[40]
	2479	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	[41]
β -Mannanase	8302	<i>B. subtilis</i>	\	[42]
	4839	<i>B. circulans</i>	<i>E. coli</i>	[43]

酶, 且稳定遗传^[53]。利用转基因植物表达饲料用酶具有生产经济安全、运输储藏及应用简便的优点。随着国家转基因生物新品种培育重大专项的开始实施, 我国在这方面的研究也将加快发展。

3.3 饲料用酶的应用技术体系研究

作为一种新型饲料添加剂, 酶制剂的应用从其发展之初就一直是人们的关注点之一。与工业酶制剂不同, 饲料酶制剂的应用要受到饲料加工工艺、日粮原料组成以及消化道环境条件等多种因素的影响, 导致其作用效果与其在最适条件下的活性有较大差异。因此, 在筛选获得适合于饲料工业的优质酶制剂的同时, 也需要进行饲料用酶制剂作用机理和应用技术的研究, 即饲料酶制剂分子营养学的基础研究和应用体系的建立两个方面。

从上世纪 90 年代饲用酶制剂大规模应用开始, 就有很多关于添加酶制剂改善饲料日粮代谢能和消化率, 提高动物生产性能的报道。例如小麦日粮中添加以木聚糖酶为主的复合酶可以提高鸡的表观代谢能(AME)和养分消化率, 降低食糜粘度, 提高肉鸡生产性能^[54-55]。饲料酶制剂的添加可看作动物消化过程的延伸, 即可以提高有效营养的供应。冯定远提出加酶饲料的“有效营养改进值”(Effective nutrients improvement value, ENIV)体系, 既是对酶制剂作用机理的初步探索, 也可作为改进饲料配方的参考^[9]。

饲用酶制剂的应用大多以复合酶的形式, 一般认为, 不同类型的饲料需要添加不同种类的酶制剂。例如玉米型饲料需要由淀粉酶、木聚糖酶、蛋白酶和纤维素酶组成的复合酶; 豆粕型饲料需要以 α -半乳糖苷酶为主, 同时含有木聚糖酶及其他酶的复合酶; 而小麦型饲料以木聚糖酶为主, 大麦型饲料以 β -葡聚糖酶为主; 菜籽粕型和棉籽粕型饲料以木聚糖酶和纤维素酶为主等等。但是, 目前饲用酶制剂针对不同动物、不同生长阶段以及不同日粮配方的精细应用技术仍然缺乏。

4 展望

在过去十几年间, 饲料酶制剂的研究和开发在世界范围都取得了飞速的发展, 我国从“八五”开

始进行饲料用酶制剂的专项研究, 也已取得了较大的成绩, 部分研究领域在国际上有一席之地。但目前的研究和生产中仍有一些问题需要解决。其一, 继续获得适合于饲料行业应用的新型酶制剂, 或改善现有酶制剂, 使其具有较好的热稳定性、适宜的 pH 以及较强的蛋白酶抗性, 适宜于饲料行业的应用。第二, 提高不同酶制剂的生产水平, 降低其生产成本, 以利于其工业化应用。第三, 增加酶制剂的种类, 扩增其应用范围。第四, 进行酶制剂分子水平营养作用机理的研究, 并确定其最合适的应用技术方案。

REFERENCES

- [1] Jensen LS, Fry RE, Allred JB, *et al.* Improvement in the nutritional value of barley for chicks by enzyme supplementation. *Poult Sci*, 1957, **36**: 919-921.
- [2] Zhang XL. Application of feed enzyme preparations in animal husbandry. *Tianjin Agri Sci*, 1998, **4**(S1): 32-37.
张贤亮. 饲用酶制剂在畜牧业中的应用. *天津农业科学*, 1998, **4**(S1): 32-37.
- [3] Kimura T, Ito J, Kawano A, *et al.* Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**: 1230-1237.
- [4] Olsen O, Borris R, Simon O, *et al.* Hybrid *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Mol Gen Genet*, 1991, **225**: 177-185.
- [5] Araujo A, Ward OP. Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. *J Appl Bacteriol*, 1990, **68**: 253-261.
- [6] Li J, Shi P, Han X, *et al.* Functional expression of the keratinolytic serine protease gene *sfp2* from *Streptomyces fradiae* var. k11 in *Pichia pastoris*. *Protein Exp Pur*, 2007, **54**: 79-86.
- [7] Cowan WD, Rasmussen PB. Thermostability of microbial enzymes in expander and pelleting process and application systems for post pelleting addition// Wenk C, Boessinger M, eds. *Enzymes in Animal Nutrition*. Kartaue Ittingen, Thurgau, Swizerland, 1993: 263-268.
- [8] Bedford MR. Matching enzymes to application. *Feed Manag*, 1993, **44**: 14-18.
- [9] Feng DY, Huang YH, Yu XH. Principle and application of combined enzymes. *China Feed*, 2008, **13**: 24-28.
冯定远, 黄燕华, 于旭华. 饲料酶制剂理论与实践的新思路-新型高效饲料组合酶的原理和应用. *中国饲料*, 2008, **13**: 24-28.
- [10] Huang H, Shi P, Wang Y, *et al.* Gene diversity of

- beta-propeller phytase in the intestinal contents of grass carp insight into the major phosphorous release from phytate in nature. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**: 1508–1516.
- [11] Yan B, Hong K, Xu Y, *et al.* Metagenome cloning—a new approach for novel microbial bioactive compounds discovery. *Microbiology*, 2005, **32**(1): 17–20.
阎冰, 洪葵, 许云, 等. 宏基因组克隆—微生物活性物质筛选的新途径. *微生物学通报*, 2005, **32**(1): 17–20.
- [12] Li H, He JJ, Zhang Y, *et al.* Application of metagenomic technique in the exploring of uncultured environmental microbial gene resource. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28**(4): 1762–1773.
李慧, 何晶晶, 张颖, 等. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用. *生态学报*, 2008, **28**(4): 1762–1773.
- [13] Huang H, Luo H, Yang P, *et al.* A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **350**: 884–889.
- [14] Huang H, Luo H, Wang Y, *et al.* A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under the low pH and strong pepsin conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80**(3): 417–426.
- [15] Luo H, Li J, Yang J, *et al.* A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Extremophiles*, 2009, **13**(5): 849–857.
- [16] Luo H, Yang J, Yang P, *et al.* Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, DOI 10.1007/s00253-009-2119-0.
- [17] Luo H, Wang Y, Wang H, *et al.* A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**(3): 453–461.
- [18] Li N, Yang P, Wang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a protease-resistant xylanase from *Streptomyces fradiae* var. k11. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(3): 410–416.
- [19] Zhang Y, Meng K, Wang Y, *et al.* A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11. *Enzyme Microb Tech*, 2008, **42**(4): 346–352.
- [20] Cao Y, Wang Y, Meng K, *et al.* A novel protease-resistant α -galactosidase with high hydrolytic activity from *Gibberella* sp. F75: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**(5): 875–884.
- [21] Shi P, Huang H, Wang Y, *et al.* A novel phytase gene appA from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. *Aquaculture*, 2008, **275**(1-4): 70–75.
- [22] Li YN, Yang PL, Meng K, *et al.* Gene cloning, expression and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(1): 160–166.
- [23] Tobin MB, Gustafsson C, Huisman GW. Evolution: the ‘rational’ basis for ‘irrational’ design. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, **19**: 23–25.
- [24] Voigt CA, Kauffman S, Wang ZG. Rational evolutionary design: the theory of *in vitro* protein evolution. *Adv Protein Chem*, 2000, **55**: 79–160.
- [25] Olsen O, Borris R, Simon O, *et al.* Hybrid *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Mol Gen Genet*, 1991, **225**: 177–185.
- [26] Yang HM, Yao B, Meng K, *et al.* Introduction of a disulfide bridge enhances the thermostability of a *Streptomyces olivaceoviridis* xylanase mutant. *J Ind Microbiol Biotech*, 2007, **34**(3): 213–218.
- [27] Fu D, Huang H, Meng K, *et al.* Improvement of *Yersinia frederiksenii* phytase performance by a single amino acid substitution. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **103**(5): 857–864.
- [28] Altamirano MM, Blackburn JM, Aguayo C, *et al.* Directed evolution of a new catalytic activity using the α/β -barrel scaffold. *Nature*, 2000, **403**: 617–622.
- [29] Garrett JB, Kretz K, Donoghue EO, *et al.* Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use a phosphate mobilizing monogastric feed supplement. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **5**: 3041–3046.
- [30] Wei W, Li HJ, Li YQ, *et al.* Studies on the expression of *Aspergillus niger* phytase in *E. coli* BL21-PET21a(+)-phyA. *China Biotechnol*, 2004, **24**(1): 66–69.
魏威, 李弘剑, 李月琴, 等. 工程菌 BL21 PET21a (+)-phy 表达植酸酶的研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(1): 66–69.
- [31] Sun J, Guo MJ, Chu J, *et al.* Purification and characterization of recombinant phytase evolved by DNA shuffling *in vitro*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10**: 766–770.
孙军, 郭美锦, 储炬, 等. 经 DNA 改组的植酸酶纯化和酶学性质. *应用与环境生物学报*, 2004, **10**: 766–770.
- [32] Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, *et al.* From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng*, 2000, **13**: 49–57.
- [33] Lehmann M, Loch C, Middendorf A, *et al.* The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng*, 2002, **15**: 403–411.
- [34] Gerlach R, Pop O, Muller JP. Tat dependent export of *E. coli* phytase appA by using the PhoD-specific transport system of *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol*, 2004, **44**(5): 351–359.
- [35] Lee S, Kim T, Stahl CH. Expression of *Escherichia coli* appA2 phytase in four yeast systems. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(5): 327–334.
- [36] Luis P, Monika H, Markus W, *et al.* Gene cloning purification and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(5): 1696–1700.
- [37] Yao B, Zhang C, Wang J, *et al.* Recombinant *Pichia pastoris* overexpressing bioactive phytase. *Sci China Ser*

- C: Life Sci*, 1998, **41**(3): 330–336.
- [38] Kim YO, Kim HW, Lee JH, *et al.* Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 33–38.
- [39] Wen T, Chen J, Lee S, *et al.* A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- β -D-glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry*, 2005, **44**: 9197–9205.
- [40] Yang P, Shi P, Wang Y, *et al.* Cloning and overexpression of a *Paenibacillus* β -glucanase in *Pichia pastoris*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**(1): 58–66.
- [41] Teng D, Wang J, Fan Y, *et al.* Cloning of β -1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 705–712.
- [42] Jiang Z, Wei Y, Li D, *et al.* High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr Polym*, 2006, **66**: 88–96.
- [43] Yang P, Li Y, Wang Y, *et al.* A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **159**(1): 85–94.
- [44] Zou LK, Wang HN, Pan X, *et al.* Design and expression of a synthetic *phyC* gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris*. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2006, **38**: 803–811.
- [45] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, *et al.* High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*, 2005, **98**: 418–428.
- [46] Xiong AS, Peng RH, Li X, *et al.* Influence of signal peptide sequences on the expression of heterogeneous proteins in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35**: 154–160.
- 熊爱生, 彭日荷, 李贤, 等. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**: 154–160.
- [47] Huang H, Yang P, Luo H, *et al.* High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **78**: 95–103.
- [48] Jensen L, Olsen O, Kops O, *et al.* Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable β (1,3-1,4)-glucanase during germination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 3487–3491.
- [49] Jensen L, Politz O, Olsen O, *et al.* Inheritance of a codon-optimized transgene expressing heat stable (1,3-1,4)- β -glucanase in scutellum and aleurone of germinating barley. *Hereditas*, 1998, **129**: 215–225.
- [50] Kimura T, Mizutani T, Tanaka T, *et al.* Molecular breeding of transgenic rice expressing a xylanase domain of the *xynA* gene from *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**(4): 374–379.
- [51] Yang PL, Yao B, Wang YR, *et al.* Streptomyces olivaceoviridis A1 xylanase with high specific activity expressed in tobacco. *Acta Agronom Sin*, 2006, **32**(2): 176–181.
- 杨培龙, 姚斌, 王亚茹, 等. 在烟草中表达的高比活性木聚糖酶 XYNB. *作物学报*, 2006, **32**(2): 176–181.
- [52] Yang P, Wang Y, Bai Y, *et al.* Expression of xylanase with high specific activity from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(4): 659–667.
- [53] Chen R, Xue G, Chen P, *et al.* Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. *Transgene Res*, 2008, **17**(4): 633–643.
- [54] Klis JD, Kwakernaak C, Wit W. Effects of endoxylanase addition to wheat-based diets on physico-chemical chyme conditions and mineral absorption in broilers. *Animal Feed Sci Technol*, 1995, **51**: 15–27.
- [55] Steinfeldt S, Knudsen KEB, Borsting CF, *et al.* The nutritive value of decorticated mill fraction of wheat. Evaluation with raw and enzyme treated fraction using adult cockerels. *Animal Feed Sci Technol*, 1995, **54**: 1–4.