



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102827821 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210317272. 5

(22) 申请日 2012. 08. 31

(71) 申请人 武汉三合益生物科技有限公司

地址 430074 湖北省武汉市东湖开发区民院路 555 号三栋楼 2401

(72) 发明人 熊海容 王亚伟

(74) 专利代理机构 武汉华旭知识产权事务所  
42214

代理人 周宗贵 刘荣

(51) Int. Cl.

C12N 9/42 (2006. 01)

C12N 15/56 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

A23K 1/165 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

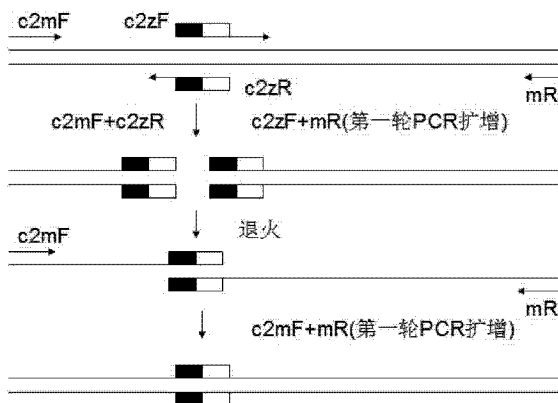
序列表 2 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种木聚糖酶 1YNA 的突变酶及其应用

(57) 摘要

本发明涉及基因工程领域,具体地涉及一种通过对嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* DSM10635 的耐热木聚糖酶 1YNA 基因进行体外定点突变而得到的一种突变酶。本发明具体提供了该突变酶的氨基酸序列以及编码该突变酶的基因序列,本发明同时还提供了突变酶的制备方法以及该突变酶的用途。本发明所获的突变酶具有以下性质:以燕麦木聚糖作为底物时,最适 pH6. 5,最适温度 75℃,比活为 7183. 54U/mg;对蛋白酶具有优良的抗性;易于工业化发酵生产。该突变酶热稳定性较原始酶 1YNA 显著提高,可广泛用于食品,饲料,酒精发酵,纸浆造纸等领域。



1. 一种木聚糖酶 1YNA 的突变酶,其特征在于:所述的突变酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO 2 所示。
2. 编码如权利要求 1 所述的突变酶的基因,其特征在于:所述的基因序列如 SEQ ID NO 1 所示。
3. 一种包含有权利要求 2 所述基因的重组载体,其特征在于:原核表达载体为 pET-22b(+).
4. 一种包含有权利要求 2 所述基因的重组菌株,其特征在于:宿主细胞为大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)。
5. 制备权利要求 1 所述木聚糖酶 1YNA 的突变酶的方法,其特征在于采用以下步骤:  
(1)、用包含有权利要求 2 所述的基因的重组载体转化宿主细胞,制得重组菌株,其中重组载体中原核表达载体为 pET-22b(+),宿主细胞为大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3);  
(2)、培养重组菌株,诱导突变酶表达;(3)、将表达后的突变酶回收并采用亲和层析纯化制得突变酶。
6. 如权利要求 1 所述的突变酶的用途,其特征在于:作为添加剂在动物饲料中的应用。

## 一种木聚糖酶 1YNA 的突变酶及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体地,本发明涉及一种耐热木聚糖酶 1YNA 基因的定点突变、组氨酸标记,同时还包含重组载体及其应用。

### 背景技术

[0002] 木聚糖是一种多聚五碳糖,主链是由多个吡喃木糖基通过 1,4- 木糖苷键相连,侧链上连着多种大小不同的短的取代基。阿拉伯木聚糖的取代降低了主链化学键的作用力,从而使其具有水溶性和粘稠性,侧链数量越多,阿拉伯糖基的取代程度越高,水分子越容易渗入,溶解度就越大。根据溶解性可将木聚糖分为水溶性木聚糖(25% ~ 30%)和不溶性木聚糖两大类(约占 70% ~ 75%)。

[0003] 木聚糖主要存在于植物细胞的次生壁上,处于木质素和其它多聚糖之间,起着连接作用。木聚糖在各种饲料原料中普遍存在,是饲料中最主要的抗营养因子之一。它能够增加肠道食糜黏度,影响动物消化吸收;影响消化道内源酶活性,刺激消化器官代偿性增大;影响脂肪的消化吸收;促使肠道有害微生物的增殖,影响动物健康;作为植物细胞的物理屏障作用,影响养分的消化。

[0004] 木聚糖酶是一组可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的复合酶系。木聚糖酶类专一降解木聚糖,具有很大的商业开发价值。饲料工业中添加木聚糖酶可以为畜禽生产带来良好的生产效果和经济效益。木聚糖酶广泛经济高效的应用于饲料工业应具备一定的条件。例如,猪胃中的 pH 一般为 2~3.5,十二指肠、空肠和回肠的 pH 范围分别为 4~6、5.5~6.7 和 7.0~7.5,因此要求饲用木聚糖酶在 pH 较广的范围内能保持较高的活性。另一方面,现在颗粒料制粒过程中有一个短暂的高温过程,温度在 75~93° C,多数木聚糖酶在此高温下会大幅度地丧失活性;同时,饲料中的木聚糖酶最终的作用场所是猪正常体温的胃肠中(37° C),因此能耐制粒高温,且在动物正常体温下具有较高活性成为木聚糖酶在生产中应用的关键。

[0005] 越来越多的木聚糖酶已经广泛应用于工业生产。在使用酶制剂的工业生产中,高温过程常常不可避免或对工艺有帮助,所以耐高温高碱木聚糖酶的应用前景极其广阔。基于 PCR 技术的不断发展和完善,运用基因工程和蛋白质工程的方法对木聚糖酶进行定向改造,可以得到预期功能的应用酶。许多关于木聚糖酶分子突变的研究表明,定点突变改变氨基酸残基能导致酶的某些特异性的改变。

[0006] 来源于嗜热真菌 *T. lanuginosus* DSM10635 的木聚糖酶,经研究显示,其为一种较耐高温的第 11 家族木聚糖酶,等电点为 3.7,最适 pH 为 6.5,最适温度为 70° C,在 pH 5.5~9 范围内都具有很高的酶活性。另外质谱结果表明嗜热真菌 *T. lanuginosus* DSM 10635 所产木聚糖酶的分子量为 21295.17 Da,与嗜热真菌 *T. lanuginosus* DSM 5826 所产木聚糖酶(1YNA)分子量极为相近,酶学性质相似,故推测这两株菌所产木聚糖酶基因序列应具有较高一致性。如何在此基础上进一步提高木聚糖酶的最适温度,使其更好的满足食品工业中的高温要求,是本领域内目前研究的热点。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种高耐热性的木聚糖酶 1YNA 的突变酶,并将该突变酶命名为 DSB1,该突变酶 DSB1 的氨基酸序列如下:

[0008] MDcGtpnsegwhdgyyyswwsdggacatytnleggtyeiswgdggnlvggkgwnpnlaraihfevyqpngnsylavygwtrnplveyyivenfgtydpssgatdlgtvecdgsiyrlgktrrvnapsidgtqtfdqysvrqdkrtsgtvqtgchfdawaraglnvngdhyyqivategyfssgyaritvadvgELEHHHHHHH

[0009] 该突变酶 DSB1 共由 205 个氨基酸组成,其理论分子量为 22.6 kDa,等电点为 5.07。

[0010] 本发明同时还提供了编码上述突变酶 DSB1 的基因,其核苷酸序列如下:

[0011] atggattgcgcaacccccaaactcggagggctggcacgatggttattactattcctggaggagtgcggtggagcgtgcgccacgtacaccaacctggaaggcggcacctacgagatcagctggggagatggcggtaacctcgtcgggtgaaaggctggaaccccggcctgaacgcaagagccatccactttgagggtgtttaccagccaaacggcaacagctaccttgcggtctacggttgaccgcaacccgctggtcgagattacatcgtcgagaactttggcacctatgaccttctccggtgctaccgatctaggaactgtcgagtgcgacggtagcatctatcgactcggcaagaccactcgcgctcaacgcacctagcatcgacggcacccaaaccttcgaccaatactggtcggtcgccaggacaagcgcaccagcggtagcgtccagacgggctgccacttcgacgctgggctcgcgctggtttgaatgtcaacggtagcactactaccagatcgttgcaacggagggtacttcagcagcggctatgctcgcatcaccggtgctgacgtgggccaactcaggaccaccaccaccactga,共由 618 个碱基组成。

[0012] 本发明中所涉及的定点突变方法如下:

[0013] 采用重叠延伸 PCR 进行突变,突变反应总共分两步,首先是扩增突变位点两端序列,得到相互之间有重叠片段的两组 PCR 产物,然后将两组 PCR 产物作为模板进行下一轮 PCR 扩增,得到需要的目的片段,并完成测序。

[0014] 本发明同时提供了一种包含有上述突变酶 DSB1 基因序列的重组载体,其中原核表达载体为 pET-22b(+),将上述重组载体命名为 pET-22b(+)-dsb1。

[0015] 本发明还提供了一种包含有上述突变酶基因序列的重组菌株,宿主细胞为大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3),并将获得的重组菌株命名为 BL21/dsb1。

[0016] 本发明还提供了制备上述木聚糖酶 1YNA 的突变酶 DSB1 的方法,采用以下步骤:(1)、用包含有上述基因的重组载体转化宿主细胞,制得重组菌株,其中重组载体中原核表达载体为 pET-22b(+),宿主细胞为大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3);(2)、培养重组菌株,诱导突变酶表达;(3)将表达后的突变酶回收并采用亲和层析纯化制得突变酶。。

[0017] 本发明在基因水平上,采用重叠延伸 PCR 技术对木聚糖酶 1YNA 完成定点突变和组氨酸标记的添加,获得了成熟的突变酶 DSB1,该突变酶 DSB1 在原核表达体系条件下,较原始木聚糖酶 1YNA 的热稳定性显著提高,其最适温度为 75°C,较原始酶提高了约 10°C,最适 pH 6.5,比活力为 7183.54 U/mg;

[0018] 本发明提供的木聚糖酶突变酶 DSB1,由于其热稳定性大幅提高,性质优良,适合于在动物饲料、食品工业中应用。该突变酶 DSB1 可应用到饲料添加剂当中,对畜牧业的发展有着重要的意义。该突变酶 DSB1 在工业中也能够发挥出极大的作用。

## 附图说明

- [0019] 图 1 为重叠延伸 PCR 工艺的流程圖；  
 [0020] 图 2 木聚糖酶 1YNA 与突变酶 DSB1 的最适反应温度对比圖；  
 [0021] 图 3 木聚糖酶 1YNA 与突变酶 DSB1 的热稳定性圖；  
 [0022] 图 4 木聚糖酶 1YNA 与突变酶 DSB1 的热变性曲线圖；  
 [0023] 图 5 金属离子及化学试剂对木聚糖酶 1YNA 与突变酶 DSB1 的酶活力的影响圖。

### 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明做详细具体的说明,但是本发明的保护范围并不局限于以下实施例。

[0025] 本实施例中嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635 来自于德国微生物菌种保藏中心(DSMZ),原核表达载体 pET-22b(+) 和大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 来自于中国农业科学院饲料研究所。限制性内切酶来自于 TaKaRa 公司,连接酶来自于 Invitrogen 公司。木聚糖来自于 Sigma 公司,其它均为国产分析纯试剂。

[0026] 本实施例中培养基为 LB 培养基,具体配比如下:10 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母浸粉,10 g/L NaCl,pH 7.0。配制固体 LB 培养基时在灭菌前加入 2% 的琼脂粉。

[0027] 本实施例中未作详细具体说明的分子生物学实验方法,均参照《分子克隆实验指南》(第三版)J. 萨姆布鲁克一书中所列的具体方法进行,或者按照试剂盒和产品说明书进行。

[0028] 实施例 1

[0029] 本发明中所涉及的具体定点突变方法如下:

[0030] 对木聚糖酶 1YNA 进行同源建模,并将突变位点设计为 N- 端的 T4G 和 Q2C,以及 N- 端临近的  $\beta$ - 折叠片段的 Q24C,另外将 C- 端的终止密码子替换为谷氨酸(E)。并预先将该突变酶命名为 DSB1。设计所用引物下所示:

[0031]

mF2 5'-GCTCCCATGGATTGCGGAACCCCAACTCGGAGGGCT-3'  
 c2mF 5'- GCTCCCATGGATTGCGGAACCCCAACTCGGAGGGCT -3'  
 c2zF 5'-GAGTGACGGTGGAGCGTGCGCCACGTACACCAACC-3'  
 c2zR 5'-GGTTGGTGTACGTGGCGCACGCTCCACCGTCACTC-3'  
 mR 5'-GGACCTCGAG TTCGCCACGTCAGCAACGGTGATGCG-3'

[0032] 以含有木聚糖酶 1YNA 基因的载体作为模板,采用引物 mF2 和 mR,完成 PCR 反应。PCR 反应的具体条件如下:94° C,10 min;94° C,30 sec;67° C,30 sec;72° C,1 min (总共循环 30 次);72° C,10 min。所获得突变序列命名为 tdsb1,将该序列片段回收后与 pGEMT-Easy 载体相连,并对其序列进行测序。

[0033] 以突变序列 tdsb1 作为模板,采用重叠延伸 PCR 技术完成第 24 位氨基酸的突变,从而获得目的产物 dsb1 的基因。所述的重叠延伸 PCR 工艺的流程如图 1 所示。

[0034] 将木聚糖酶 1YNA 和突变酶 DSB1 的氨基酸序列比对结果显示成功获得预期的突变位点:N- 端的 Q2C、N- 端的 T4G、N- 端临近的  $\beta$ - 折叠片段的 Q24C 和 C- 端的终止密码子替换为谷氨酸(E)。

[0035] 突变酶 DSB1 的制备

[0036] 将原核表达载体 pET-22b(+) 和编码突变酶 dsb1 的基因分别完成双酶切(Nco I + Xho I), 切出的原核表达载体 pET-22b(+) 与编码成熟突变酶 DSB1 的基因片段连接, 获得含有突变酶 dsb1 基因的重组载体 pET-22b(+)-dsb1, 并将重组载体转化至宿主细胞大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中, 获得重组菌株 BL21/dsb1。

[0037] 将重组菌株 BL21/dsb1 接种于 20 mL LB 液体培养基(Amp<sup>+</sup>)中, 于 37° C、220 rpm 摇床培养 6-8 h。将该种子液接种于含有 3 L LB 液体培养基(Amp<sup>+</sup>)的 5 L 发酵罐内, 于 37° C、180 rpm 和 0.03 vvm 条件下培养约 12h。再加入 3 mL IPTG (1M) 诱导培养 48 h。

[0038] 对上述菌液进行离心, 获得上清液。采用 Ni Sepharose 亲和层析纯化该上清液, 洗脱过程中当咪唑浓度为 10 mM 时, 获得的洗脱液具有木聚糖酶活力, 并且突变酶 DSB1 达到电泳纯级别。

[0039] 作为本发明的最优选的实施方案, 优选为将本发明的突变酶 dsb1 基因插入到表达载体 pET-22b(+) 上的 Nco I 和 Xho I 限制性酶切位点之间, 使该核苷酸序列与下游的六个组氨酸标签序列连接, 得到原核重组表达载体 pET-22b(+)-dsb1。

[0040] 木聚糖酶 1YNA 与突变酶 DSB1 的性能分析及测定

[0041] 采用 DNS 法分析其活性, 具体方法如下: 取 0.5% 木聚糖溶液 1.8 mL 置于试管中, 在 65° C 的水浴锅中预热 3 min, 然后加入 0.2 mL 粗酶液, 混匀后准确反应 10 min, 再加入 3 mL DNS 试剂, 终止反应后混匀, 置沸水中煮 5 min, 再移入冰水中冷却至室温。混匀后测定试管中溶液的 OD<sub>540</sub> 值。每个实验分为 3 组平行试验。一个木聚糖酶活力单位(U)定义为在给定的条件下, 每分钟分解木聚糖生成 1 μmol 还原糖所需的酶量。

[0042] 突变酶 DSB1 在 pH6.5 缓冲液体系下, 完成不同温度条件下的酶促反应。热稳定性的测定为突变酶 DSB1 在不同温度下处理 30 min, 再于 65° C 下, pH6.5 下进行酶活性测定。酶反应最适温度测定结果如图 2 所示, 表明 DSB1 的最适温度为 75° C, 而在同样 pH 条件下 1YNA 的最适温度为 65° C。酶的热稳定性测定结果如图 3 所示, 从图 3 中可以看出, 突变酶 DSB1 有良好的热稳定性, DSB1 在 75° C 中处理 30 min 后, 检测酶活力仍保留 90% 以上, 而 1YNA 的残余酶活力约为 30% 左右。

[0043] 采用 MOS-450 CD spectrometer(Bio-Logic), 于 222 nm 波长条件下, 检测木聚糖酶 1YNA 和突变酶 DSB1 在温度 20° C ~ 86° C 范围内的热变性曲线。如图 4 所示, 从图 4 中可以看出, 1YNA 和 DSB1 的溶解温度(T<sub>m</sub>) 分别为 66° C 和 74° C, DSB1 的溶解温度明显比 1YNA 的提高 8° C。

[0044] 下面进行突变酶 DSB1 与原始酶 1YNA 的动力学性质和比活力的测定。

[0045] 以燕麦木聚糖作为底物, 在 pH 6.5 缓冲液体系中, 突变酶 DSB1 与原始酶 1YNA 依次在 65° C 和 75° C 下测定酶活性, 计算出各自动力学参数。另外采用考马斯亮蓝法检测电泳纯酶溶液的蛋白质浓度, 从而计算获得两者的比活力, 结果显示突变酶 DSB1 的 K<sub>m</sub>、V<sub>max</sub> 和比活力依次为 6.67 mg/mL、16666.67 μmol/(mg•min) 和 7183.54 U/mg, 另外测得原始酶 1YNA 的比活力为 5912 U/mg, 较突变酶 DSB1 的比活力偏低。

[0046] 测试不同金属离子及化学试剂对突变酶 DSB1 活性的影响

[0047] 在酶促反应体系中加入不同浓度的不同的金属离子及化学试剂, 研究其对酶活性的影响, 各种物质终浓度为 1 和 5 mM。在 75° C、pH6.5 条件下测定突变酶 DSB1 活性。测

试结果如图 5 所示,图 5 中结果表明,本研究中所使用的 NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 和 EDTA 对突变酶 DSB1 的酶活力不具有明显影响,高浓度的 CuSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 能显著抑制突变酶 DSB1 的酶活力,尤其是高浓度的 ZnCl<sub>2</sub> 对突变酶 DSB1 酶活力的抑制作用最强,相对残余酶活力低于 40%。然而突变酶 DSB1 对 SDS 具有一定的抗性,高浓度的 SDS 仅能抑制约 20% 的酶活力。

#### [0048] 突变酶 DSB1 在动物饲料工业中的应用

[0049] 本实施例中首先测试突变酶 DSB1 单一使用时的效果,按美国食品药品监督管理局(FDA)的建议,木聚糖酶在面粉中的用量为 2-16 克/100 公斤面粉,其中木聚糖酶的活力为 50-400 国际酶活力单位/公斤面粉。这样要求木聚糖酶的比活力在 500-20000 国际酶活力单位/克。按国内的用量,每公斤饲料添加 960 国际酶活力单位的木聚糖酶时,能显著提高肉鸡的饲料转化比;按每公斤饲料添加 3200 国际酶活力单位的木聚糖酶时效果更加显著,并对肉鸡发育无不良影响。

[0050] 对于小麦为主的基础日粮,单纯在饲料中添加突变酶 DSB1 后饲喂肉鸡,其动物代谢能提高 6% 左右,蛋白质的消化率提高 10%,能达到玉米基础日粮的饲喂效果。

#### [0051] 测试含有突变酶的复合酶制剂在饲料中的应用效果

[0052] 本实施例中,将突变酶 DSB1 添加入美国的“八宝威”复合酶制剂(每千克含  $\alpha$ -淀粉酶 20000 单位,  $\beta$ -淀粉酶 20000 单位,  $\beta$ -葡萄糖酶 300 BGU, 支链淀粉酶 69 PUU, 果胶酶 27500 PCU, 蛋白酶 20000 PU, 纤维素酶 3750 CU),并将该复合酶制剂在同等饲养条件下,对仔猪饲养。经检测,仔猪的平均日增重相对不添加突变酶的对照组增加了 16.2%。在成猪饲料中按照 750 g/t 加入添加有突变酶的“八宝威”,同等饲养条件下,成猪的平均日增重提高了 8.9%。在育猪饲料中按照 750 g/t 加入添加有突变酶的“八宝威”,平均日增重提高了 0.96%。

[0001]

## 氨基酸序列表

&lt;110&gt;: 武汉三合益生物科技有限公司

&lt;120&gt;: 一种木聚糖酶 1YNA 的突变体及其应用

&lt;160&gt;: 2

&lt;210&gt;: 1

&lt;211&gt;: 618

&lt;212&gt;: DNA

&lt;213&gt;: 人工序列

&lt;400&gt;: 1

atggattgcg caacccccaa ctcgaggggc tggcacgatg gttattacta ttctggtgg 60  
 agtgacggtg gagcgtgcgc cacgtacacc aacctggaag gcggcaccta cgagatcage 120  
 tggggagatg gcggtaacct cgtcgttggg aagggttggg accccggcct gaacgcaaga 180  
 gccatccact ttgagggtgt ttaccagcca aacggcaaca gctaccttgc ggtctacggt 240  
 tggaccgcga acccgctggt cgagtattac atcgtcgaga actttggcac ctatgatcct 300  
 tcctccggtg ctaccgatct aggaactgtc gatlccgacg gtagcatcta tegactcggc 360  
 aagaccactc gcgtcaacgc acctagcacc gacggcacc aaaccttcca ccaatactgg 420  
 tcggtccgcc aggacaagcg caccagcggg accgtccaga cgggctgcca cttegacgcc 480  
 tgggctcgcg ctggtttgaa tgcaacggt gaccactact accagatcgt tgcaacggag 540  
 ggctacttca gcagcggcta tgctcgcacc accgttgctg acgtgggcga actcgagcac 600  
 caccaccacc accaactga 618

&lt;210&gt;: 2

&lt;211&gt;: 205

&lt;212&gt;: PRT

&lt;213&gt;: 人工序列

&lt;400&gt;: 2

[0002]



Met Asp Cys Gly Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr  
 5 10 15  
 Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Cys Ala Thr Tyr Thr Asn Leu  
 20 25 30  
 Glu Gly Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val  
 35 40 45  
 Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe  
 50 55 60  
 Glu Gly Val Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly  
 85 90 95  
 Thr Tyr Asp Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys  
 100 105 110  
 Asp Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro  
 115 120 125  
 Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln  
 130 135 140  
 Asp Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala  
 145 150 155 160  
 Trp Ala Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile  
 165 170 175  
 Val Ala Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val  
 180 185 190  
 Ala Asp Val Gly Glu Leu Glu His His His His His His  
 195 200 205

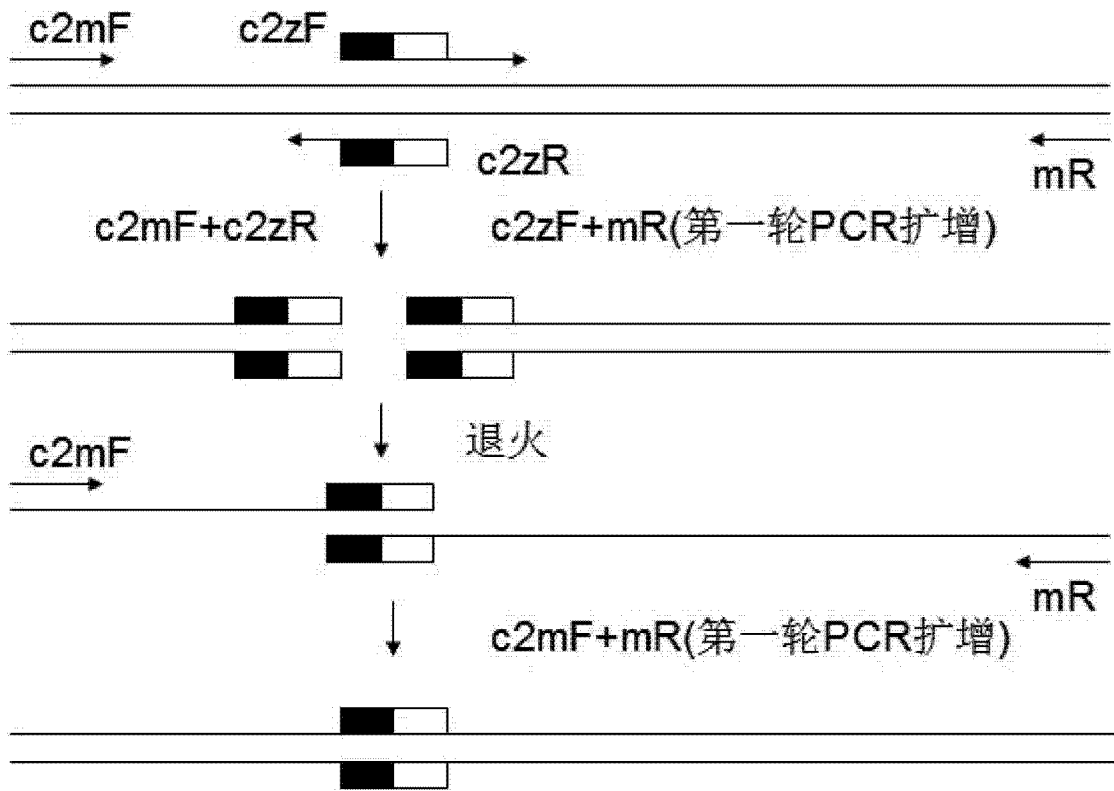


图 1

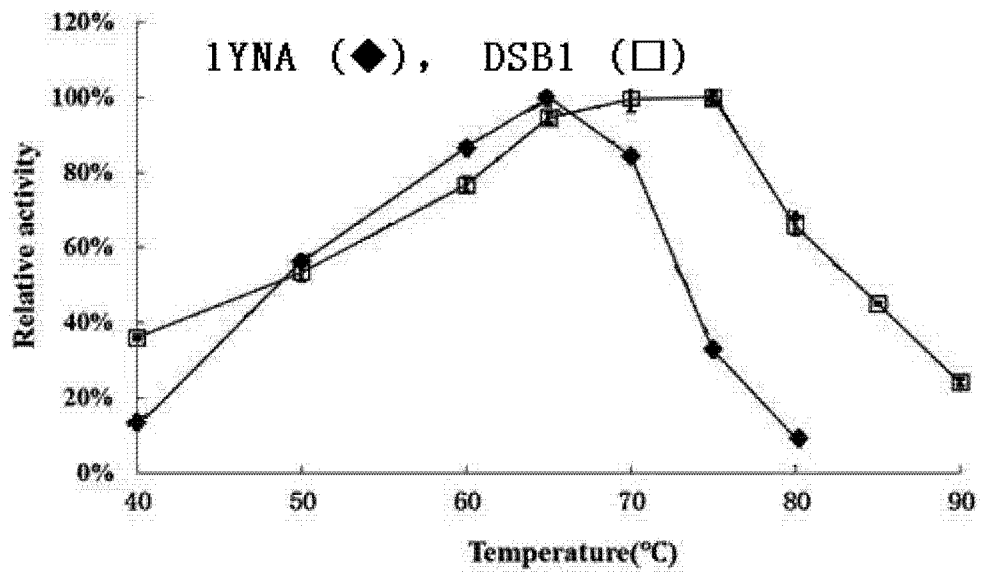


图 2

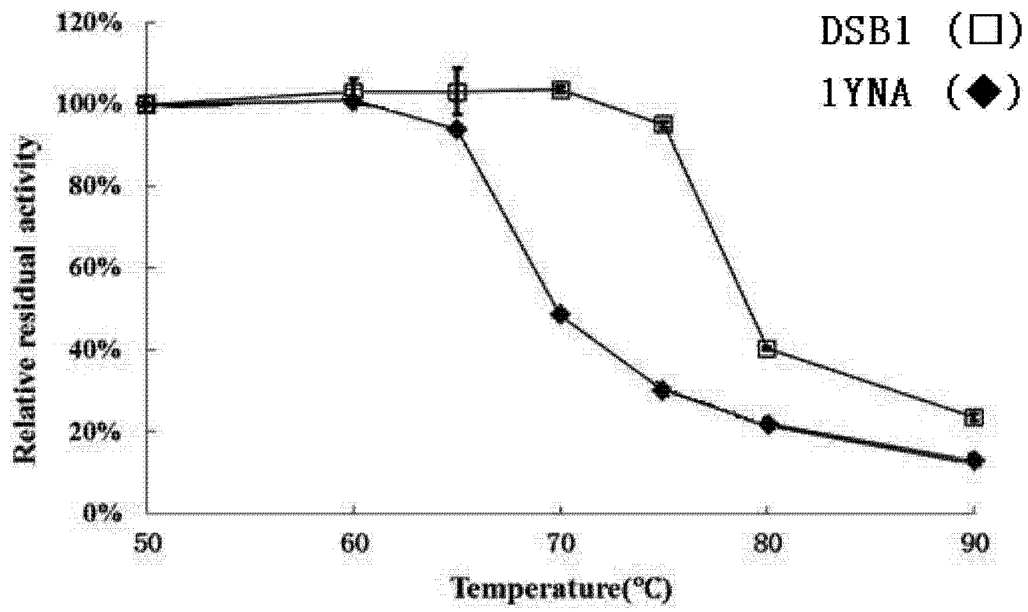


图 3

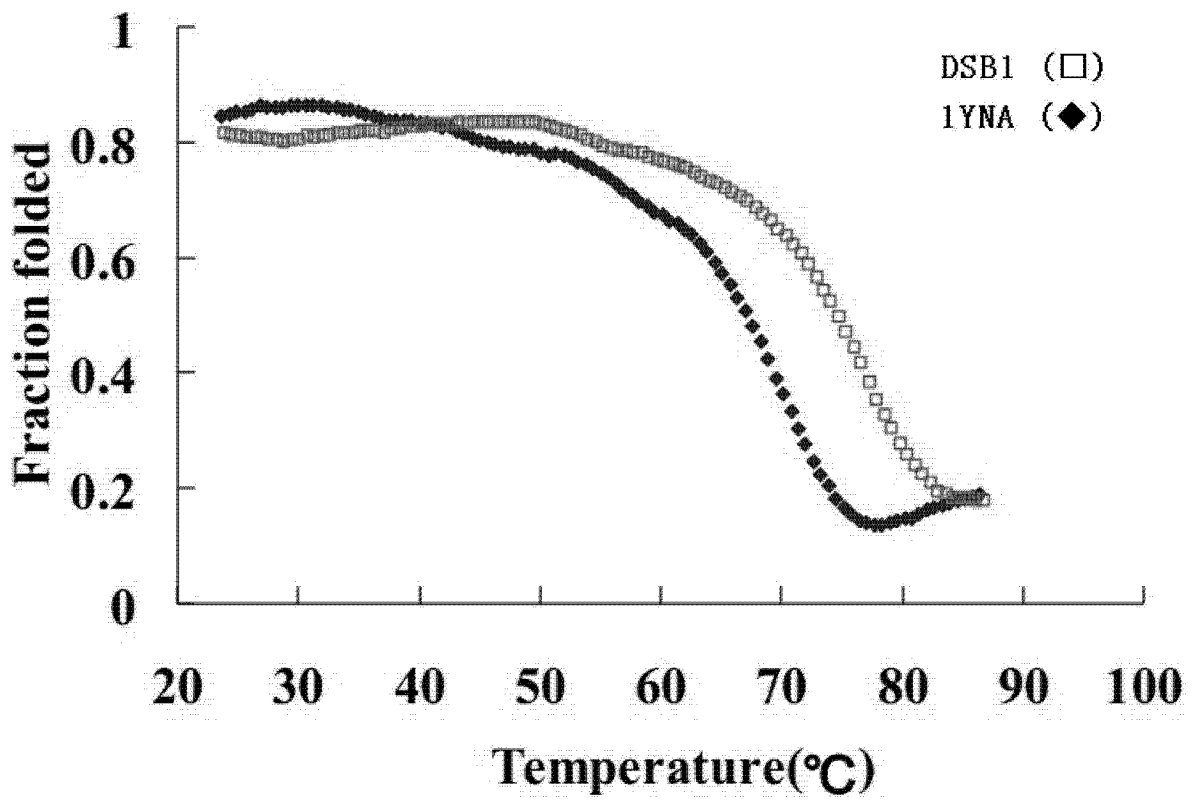


图 4

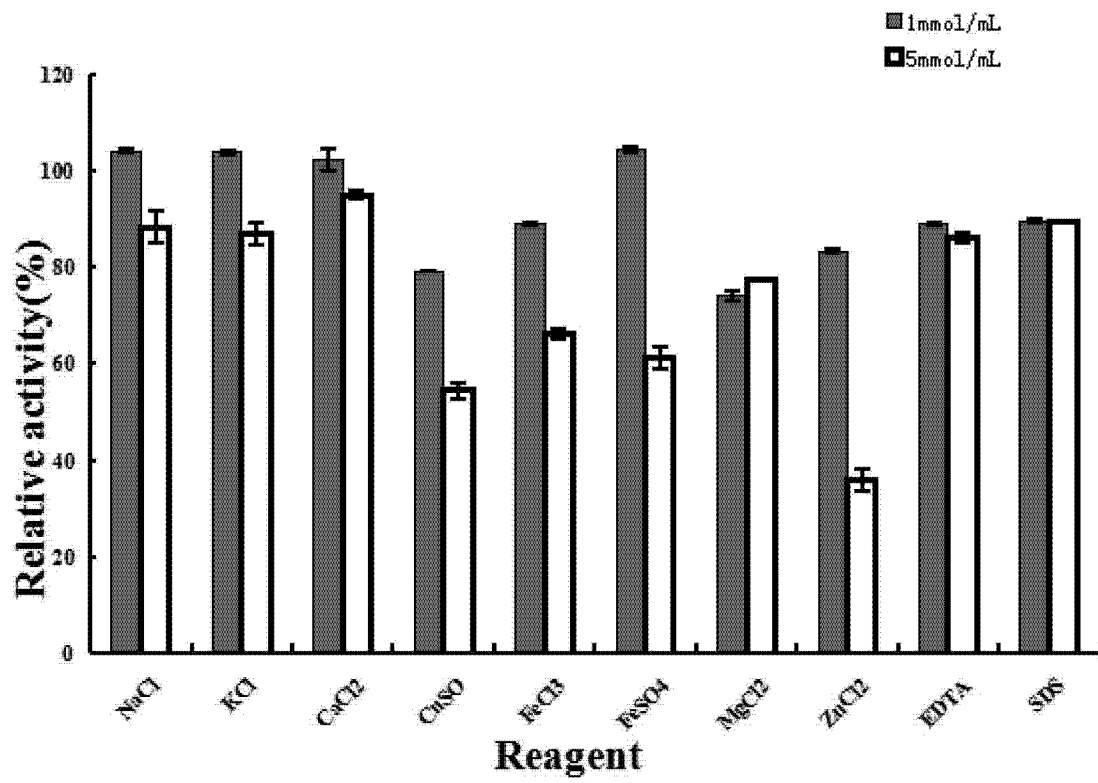


图 5