

文章编号:1673-1689(2009)06-0727-06

F/10 木聚糖酶研究进展

刘亮伟¹, 杨海玉¹, 胡瑜¹, 李相前²

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 淮阴工学院 生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223001)

摘要: 木聚糖酶广泛应用于食品加工、纸浆漂白、饲料添加剂、工业乙醇的生产, 生物转化等领域。相对于 G/11 木聚糖酶, F/10 家族在稳定性、耐酸性和耐碱性方面更有优越性, 本文综述了该家族木聚糖酶的相关基因, 酶分子空间结构及催化机理等基本特性, 特别对热稳定性属性及基因工程改造其稳定方面进行了详细说明, 为进一步进行酶分子改造和应用提供借鉴。

关键词: 木聚糖酶; 热稳定性; 空间结构; 基因工程

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

A Review of F/10 Xylanase

LIU Liang-wei¹, YANG Hai-yu¹, HU Yu¹, LI Xiang-qian²

(College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Huaiyin Institute of Technology, Huaian 450003, China)

Abstract: Xylanase is widely used in biotechnology related areas, such as food processing, pulp bio-bleaching, animal feed additive, ethanol production, bio-conversion, and so on. Compared with G/11 xylanase, F/10 xylanase is more advantageous in thermostability, acidic resistance and alkaliphilic ability. This manuscript reviewed the related genes, enzyme 3D structure, catalysis mechanism of this family, especially about its thermostability and genetic engineering, which is useful for further investigation of property and deeper usage in industries.

Key words: F/10 xylanase, thermostability, structure, genetic engineering, catalysis mechanism

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)水解木聚糖的 β -1,4-糖苷键,与自然界中第二大能源物质-半纤维素的降解和五碳糖的循环利用相联系。现在木聚糖酶广泛应用于工业生产中:啤酒酿造、面包烘焙、动物饲料、生物漂白、乙醇生产、生物转化等。由于环境多样性,造成不同生物来源的木聚糖酶在理化特性、结构、催化模式和底物特异性等方面具有多样性。已经发现木聚糖酶分布在5,7,8,10,11,43等家族

的糖苷水解酶中。根据催化结构域的氨基酸组成,大部分木聚糖酶属于F/10和G/11木聚糖酶两大家族。G/11木聚糖酶多为单结构域,相对分子质量一般小于30 000,产物中寡聚糖含量较多,而单糖成分较少,酶最适温度50~60℃,在空间结构上呈“右手半握状”。F/10木聚糖酶则含有较多结构域,不仅有催化结构域,还存在纤维素结合结构域(Cel-lulose Binding Domain; CBD),相对分子质量一般

收稿日期:2008-02-17

基金项目:河南省科技攻关资助项目(072102220001),江苏省自然科学基金资助项目(BK2007067)。

作者简介:刘亮伟(1967-),男,河南长葛人,工学博士,副教授,主要从事微生物酶学理性改造方面的研究。

Email:llw321@yahoo.com.cn

大于30 000,而催化产物中单糖较多,最适温度60~80℃,在结构上呈现“碗状”结构^[1]。与G/11家族相比,F/10家族木聚糖酶在耐高温、耐酸和耐碱性方面更有优越性。现在已经开发了一些商品酶,但是在应用中还存在许多问题,诸如酶的热稳定性、底物结合结构域的作用、耐极端状况的特性、酶的催化机理等需要进一步研究,以便开发更加适合工业生产,满足人民生活需要的新酶。作者就F/10木聚糖酶的分子生物学属性做一回顾,期望对木聚糖酶的深入研究和开发有所裨益。

由于木聚糖酶在工业应用中的广泛性,人们从芽孢杆菌属菌株,木霉属,曲霉属,青霉属,乳杆菌,假丝酵母菌等中得到嗜碱性木聚糖酶。从里氏木霉,白曲霉,酵母类真菌,青霉属分离到嗜酸性木聚糖酶^[2],其中黑曲霉和里氏木霉木聚糖酶研究较为深入^[3]。为了使用和研究酶的稳定性,从嗜热和超

嗜热微生物中分离热稳定性的木聚糖酶,热解纤维素果汁杆菌属,海洋红嗜热盐菌,脂肪嗜热芽孢杆菌,嗜热子囊菌,热纤梭菌等。来源于海栖热袍菌的XynA是已报道的嗜热性最高的酶,最适温度105℃^[2]。已经发现许多F/10木聚糖酶(见Tab1),并且许多木聚糖酶基因在真核、原核生物中得到了成功表达^[4],为研究木聚糖酶催化机理及酶分子进化^[5]、热稳定性^[6-7]、结构模拟提供了方便^[8]。在研究木聚糖酶的基因转录、表达调控时,Blum观察到Clostridium thermocellum中编码阿魏酸酯酶的基因与F/10木聚糖酶相邻^[9],可能与阿魏酸基团在植物细胞壁中作为结构骨架和提供保护有关,可以避免被微生物降解。在密码子偏好性方面,F/10木聚糖酶基因的密码子的家族特征以“a”碱基为主;而G/11家族以“g/c”碱基为主^[10]。

表1 F/10木聚糖酶基因及结构

Tab. 1 Genes and structure of F/10 xylanase

蛋白质序列号	来源物种	结构域	三维结构	长度	位置
P26514	<i>Streptomyces lividans</i>	Ricin B-type lectin(1)	X-ray(12)	477	extra
Q60037	<i>Thermotoga maritima</i>	CBM-cenC(2)	X-ray(3)	1059	
P07986	<i>Cellulomonas fimi</i>	CBM2(1)	X-ray(5); NMR(2)	484	
P14768	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CBM2(1)	X-ray(7); NMR(2)	611	
P51584	<i>Clostridium thermocellum</i>	CBM-cenC(2)	X-ray(10)	1 077	
P10478	<i>Clostridium thermocellum</i>	CBM6(1)	X-ray(3)	837	
P40944	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp.	CBM-cenC(2)		684	
P29126	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	GH10/GH11 *		954	
Q60042	<i>Thermotoga neapolitana</i>	CBM-cenC(2)		1055	
P36917	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	CBM-cenC(2); SLH(2)		1157	
P23030	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CBM2(1); CBM6(1)		592	
P40942	<i>Clostridium stercorarium</i>		X-ray(1)	387	
P07528	<i>Bacillus halodurans</i>		X-ray(1)	396	extra
P40943	<i>Bacillus stearothermophilus</i>		X-ray(4)	407	extra
P56588	<i>Penicillium simplicissimum</i>		X-ray(8)	302	extra
Q00177	<i>Emericella nidulans</i>		X-ray(1)	327	extra
P23360	<i>Thermoascus aurantiacus</i>		X-ray(10)	329	
O60206	<i>Agaricus bisporus</i>			333	extra
P45703	<i>Bacillus stearothermophilus</i>			330	extra
O59859	<i>Aspergillus aculeatus</i>			327	extra
P33559	<i>Aspergillus kawachi</i>			327	extra
P07529	<i>Cryptococcus albidus</i>			332	extra
P29417	<i>Penicillium chrysogenum</i>			353	extra
P23557	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>			312	
P26223	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>			635	

续表 2

蛋白质 序列号	来源 物种	结构域	三维结构	长度	位置
P49942	<i>Bacteroides ovatus</i>			376	
P23551	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>			411	
P23556	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>			342	
Q12603	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>			352	
P48789	<i>Prevotella ruminicola</i>			369	
Q60041	<i>Thermotoga neapolitana</i>			346	

注: * 双功能活性的木聚糖酶,具有 GH10 和 GH11 的活性;Location:指木聚糖酶分泌所处位置,extra:胞外酶;()酶结构中所含 CBM 的数量或 X-ray 数据的个数;数据来源于 Uniprot Release 14.6 (去掉片段性序列,包含双功能活性的酶);Accession Number:木聚糖酶在 Swiss-prot 中的登陆号;Length:指木聚糖酶氨基酸序列中所含氨基酸数目;3D:测定出晶体结构的木聚糖酶。

1 F/10 木聚糖酶的多结构域

一般来说,F/10 木聚糖酶由真菌、细菌和植物产生。它有较大相对分子质量(>30 000),结构复杂,通常由多个结构域组成,包含一个催化结构域(参见 Tab1)。酶的催化结构域(Catalysis Domain: CD)是木聚糖酶主要组成部分,承担着木聚糖酶的水解特性,也是进行酶家族分类的基础。虽然它们在氨基酸数量和组成方面差异很大,但其催化结构在大小上都很接近。主要以 α -螺旋和 β -折叠片重复出现的结构,因为与 TIM 结构相近,属于一个家族,称为(β/α)₈ 折叠结构(Fig 1),“在结构上呈现“碗状”结构。催化结构域特定位置的谷氨酸和天冬氨酸对催化特性影响很大。而 G/11 木聚糖酶主要以 β -折叠片组成,形成“右手半握状”结构(见图 1)。

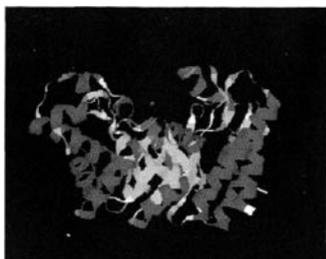


图 1 海栖热袍菌木聚糖 B 空间结构(从侧面观)

Fig. 1 Structure of xylanase B (side shown)



图 2 G/11 木聚糖酶结构图,PDB 登录号:1YNA

Fig. 2 Structure of G/11 xylanase (1YNA)

很多 F/10 木聚糖酶不仅含有催化结构域,还含有非催化活性的结构域如:多糖结合结构域和热稳定结构域。底物结合结构域可以和结晶纤维素结合,称为纤维素结合结构域(CBD);如果与木聚糖特异性结合,则称为木聚糖结合结构域(Xylan Binding Domain: XBD)。一般情况下,底物结合结构域不影响酶的催化活性,但对不溶性底物有着特殊作用。如 *Streptomyces Oliceovividis* E-86 的木聚糖酶,它含有 CD 和 XBD,既能分解可溶性木聚糖,又能分解不溶性木聚糖;如果人工除去 XBD,它就不能降解不溶性木聚糖,但不会影响对可溶性木聚糖的降解效率。它们可以起到细胞壁黏附、纤维素装配、蛋白质锚定等作用。

木聚糖酶有时还含有多个催化结构域,如生黄瘤胃球菌(*Ruminococcus flavi faciens*)产生的 XY-NA 木聚糖酶的 C 末端含有 F/10 木聚糖酶催化结构域,而 N 末端含有 G/11 木聚糖酶催化结构域。来源于 *R. Xavefaciens* 的 XYLA, N-端序列具有 G/11 木聚糖酶的活性, C-端具有 F/10 木聚糖酶活性,中间由一段富含 Asp 和 Glu 的重复序列连接^[11]。*Cytophaga hutchinsonii* 的 CHU-1239 基因也编码双功能活性酶的催化结构域,具有 F/10 木聚糖酶/GH6 脱乙酰基酶活性^[12]。

非催化活性的结构域(CBD/XBD)和多个催化结构域之间通过连接区域将各个结构域连接在一起,这个区域称为连接肽(Linker),因为它可以形成柔韧的绞链区,使不同结构域形成具有活性的空间构象。一般情况下 Linker 连接肽的同源性一般不高,它的长度为 6~9 个氨基酸,有时不同来源的木聚糖酶 linker 长度变化很大,其中含有较多的 Ser 或 Pro。Cellvibrio japonicus Xyn10C 是由 F/10 木聚糖酶的 CD 和 CBM15 构成,晶体显示它们之间的 linker 区域是无规则卷曲线段,表明它有很高的柔韧性^[13]。David 等用 NMR 研究了 Cex 木聚糖酶的连接区结构,它将 N 端催化域和 C 端 CBD 连接

起来,这个连接肽富含 Pro 和 Thr(Pro/Thr Linker),在纳秒-皮秒时间尺度上显示出高度弹性变化的柔性结构,通过这个结构将不同结构域在空间上隔离开来,说明 CBD 将 CD 锚定于细胞壁上,便于催化结构域完成催化作用^[14]。

2 F/10 木聚糖酶的晶体结构和催化特性

不同细菌种类和真核生物来源的 F/10 木聚糖酶可以分为不同的亚类,很多 F/10 木聚糖酶的晶体结构已经测定出来,为进行酶分子结构的同源结构模拟提供了模板^[8](见表 1),它们在总体结构上没有太大差异。形成 $(\beta/\alpha)_8$ -折叠桶状的 TIM 结构,它们在晶体结构方面呈现出很高的等同性和氨基酸残基相似性,结构之间偏差很小($0.95 \pm 0.11 \text{ \AA}$)^[15]。通过结构分析和定定点突变说明,木聚糖酶的催化机理是由两个 Glu 参与的双取代反应机制,其中一个 Glu 起酸碱催化作用,另一个 Glu 提供亲核受体,这两个活性中心的氨基酸位点位于一个开放式裂缝中。TIM 折叠桶催化域的酸碱催化氨基酸和亲核受体氨基酸残基分别位于第 4 和第 7 β -折叠片上,与这个模式相对应,酶底物结合沟的长度相应延长,能容纳 4~7 个木糖分子^[13]。

研究 F/10 木聚糖酶与底物或抑制蛋白的晶体复合物,发现底物结合结构域是高度保守的区域,特别是在-1 和-2 位点在识别底物过程中起关键作用^[13]。在催化特性上,F/10 与底物结合需位点较少,特异性较低;对短的 β -1,4-寡聚糖亲合性更高,所以在产物形成方面会产生很多小分子低聚糖。定点突变证实 XlnA 中的两个催化残基,E128(酸碱催化作用的氨基酸)/E236(亲核受体氨基酸),研究晶体结构也证实了这两个氨基酸的作用^[16]。定点突变发现 XlnA 中有 3 个保守性 His,对 H81 和 H207 的突变,酶活性降低了 95%以上,H86 在 F/10 在稳定结构和维持酸碱催化的 pKa 中有重要作用^[17]。

3 F/10 木聚糖酶的热稳定性(Thermostability)

3.1 木聚糖酶热稳定性研究

木聚糖酶的热稳定性是影响其应用的重要因素。真菌来源的木聚糖酶,最适反应温度在 35~60℃,其热稳定性往往低于细菌来源木聚糖酶的热稳定性,现在发现的耐热木聚糖酶大多数属于 F/10 家族。而工业上纸浆漂白一般在 60℃左右,所以要

求稳定性较高的酶^[18]。研究木聚糖酶 3D 发现,嗜温性酶和嗜热性酶结构很相近。目前没有普遍性机理可以解释酶的热稳定性,因为不同酶有不同的热稳定性机理。人们发现酶的热稳定性往往通过进化过程中一系列小的变化累积造成的:盐键和氢键的增多,内部堆积力的改变;表面电荷的多少;在 N 端/C 端 α -螺旋处引入二硫键增加稳定性因素。Amit Bharadwaj 发现 N 端 Val1-Ala 的突变会降低 BSX 的稳定性,这个突变可能引起了蛋白质局部或者全局构象的变化,从而使得酶稳定性降低^[19]。酶分子表面芳香族氨基酸堆积可以提高蛋白质的稳定性, Ca^{2+} 也可以提高酶的热稳定性^[2]。Manikandan 等从 *alkalophilic Bacillus* sp. strain NG-27 中分离 XynA,它不含半胱氨酸和二硫键,却有较好的嗜热和嗜碱稳定性,但是其机理还不清楚^[20]。

某些微生物(如解糖高温厌氧杆菌和热纤梭菌)木聚糖酶中某些区段可增加酶的最适作用温度。嗜热性细菌的 F/10 木聚糖酶普遍含有增加热稳定性的结构域(CBD),它们与酶催化结构域紧密结合在一起^[21]。这种作用常认为是嗜热酶中含有热稳定结构域(Thermostable Domain: TSD),这些区域常是串联重复,但这方面的研究还有待深入。2000 年在 16 条嗜热性 F/10 酶中发现 TSD 结构,全部分布在催化结构域的 N 端。Sunna 等采用片段删除方法研究 XynA,认为 TSD 结构域主要功能与 XBD 相近,也与热稳定有关联。TSD 与 XBD 的性质相似,可以选择性地亲和可溶性木聚糖,与羟甲基纤维素也有微弱的结合作用^[22]。Shin 等用重叠延伸 PCR 研究 xynX 的 TSD 与 CD 的关系,发现酶的最适温度 $\text{xynX-TSD-CD} > \text{xynX-CD} > \text{xynX-CD-TSD}$,但是结合木糖的活性未受影响,表明该木聚糖酶 TSD 具有热稳定和结合底物的双重功能^[23]。Abou-Hachem 等发现携带 CBM(Cellulose Binding Model)的全长 Xyn10A,其变性温度的提高与 Ca^{2+} 浓度有明显相关性;而截去 CBM 的 Xyn10A 催化结构域的变性温度则会下降^[24]。

近来人们运用结构域融合技术构建了几个双功能活性酶(Bifunction),如将 CBD 与葡聚糖酶基因的融合^[25],将疏色曲霉木聚糖酶基因 xynA 和 xynB 的融合^[26]。Kamondi 将 *Thermotogamaritima* 的 F/10 木聚糖酶 TmxA($T_{\text{opt}} = 68 \text{ }^\circ\text{C}$)催化结构域与同个家族的 TmxB($T_{\text{opt}} = 102 \text{ }^\circ\text{C}$)融合后得到一系列嵌合酶,它们的最适温度与亲本 TmxB 的序列长短没有对应关系,在 16 个嵌合酶体中只有 4 个酶的最适温度有了提高^[27]。

3.2 基因工程在改造木聚糖酶热稳定性的作用

根据木聚糖酶结构功能的相互关系,人们基因工程方法研究了很多木聚糖酶热稳定性的问题:如定向进化,定点突变,基因 shuffling,计算机辅助研究等。定向进化采用随机突变产生大量的突变体库,而后用定向筛选方法得到所需要突变子的过程,这种方法不需要知道酶的结构信息。应用易错 PCR 得到 Xys1(*Streptomyces halstedii* JM8)的突变体,M1(G133D)和 M8(N148D)活性比野生型提高了 22~25%,M5a(D175A)和 M7(T160A)的酶活性则降低到 40~50%,研究发现这些突变位点多位于酶分子结构的 β/α -环处。易错 PCR 可以突变非活性中心的氨基酸,它们可以引起酶结构重排,并影响酶分子活性^[28]。这种定向进化方法很容易产生突变,但是后续过程中从突变库中筛选阳性转化子的工作量太大,过程较复杂且费用较昂贵。

定点突变可以确定单个氨基酸残基的功能,但是不能确定多个氨基酸残基形成的片断所产生的功能和性质^[29];采用基因 shuffling 可以弥补单点突变氨基酸的不足,它可以分析长片段氨基酸序列所产生的性质和功能。定点突变和长片段氨基酸序列重排都用到蛋白质分子空间结构的信息,属于

酶分子理性设计的改造内容,虽然取得不少成果,在很大程度上依赖于实验经验方面的结果。理性设计是根据酶分子空间结构信息,在计算机辅助设计帮助下快速筛选期望突变体,但算法还有待深入研究。Liu 分析了 F/10 家族的二肽片段与最适温度的关系,TD、GH、WY 利于最适温度的提高,GA、IA、FH、LH、SR、NH 则相反。从理论计算上得到整个家族可以适应的最低温度和最高温度区间为: -29.06~150.46 °C^[6]。基于这种思路,Zhang 运用神经网络(NNs)方法,构建 F/10 家族木聚糖酶氨基酸组成和最适温度的数学模型,模型误差分别为 6.61 和 1.78%^[30]。

4 结 语

通过综述了 F/10 木聚糖酶的相关基因、多结构域间的相互关系、酶分子的晶体结构和催化活性等相关属性,特别是木聚糖酶的稳定性和基因工程改造方面,对该家族木聚糖酶的分子生物学属性有了进一步认识,根据这些特性的研究,可以利用木聚糖酶更加深入地在环境污染、生物转化、粮食精深加工等方面为人类服务。

参考文献(References):

- [1] 刘亮伟,贺铁明,张革新,等, F/10 和 G/11 木聚糖酶家族的不同热稳定性机制[J], 食品与生物技术学报, 2005, 24:52-58.
LIU Liang-wei, He Tie-ming, Zhang Ge-xin, et al. Different thermostable mechanisms of F/10 and G/11 xylanase family [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24:52-58. (in Chinese)
- [2] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29:3-23.
- [3] Chen H, Yan X, Liu X, et al. Purification and characterization of a novel bifunctional Xylanase, XynIII, isolated from *Aspergillus niger* A-25 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16:1132-1138.
- [4] 许婧, 欧阳嘉, 何冰芳, 组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27:85-90.
Xu Jing, OUYANG Jia, HE Bing-fang. Screening of an efficient constitutive-producing strain and fermentation optimization for cellulase production[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27:85-90. (in Chinese)
- [5] 刘亮伟, 秦天苍, 王宝, 等, 木聚糖酶的分子进化 [J], 食品与生物技术学报, 2007; 26:110-118.
LIU Liang-wei, QIN Tian-cang, WANG Bao, et al. The evolution of xylanase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26:110-118. (in Chinese)
- [6] Liu L, Wang M, Shao W, et al. A novel model to calculate dipeptides responsible for optimum temperature in F/10 xylanase[J]. *Process Biochem*, 2005, 40:1389-1394.
- [7] Liu L, Dong H, Wang S, et al. Computational analysis of di-peptides correlated with the optimal temperature in G/11 xylanase[J]. *Process Biochem*, 2006, 41:305-311.
- [8] 刘亮伟, 秦天苍, 刘新育, 等, 热稳定性木聚糖酶结构模拟及分析 [J], 河南农业大学学报, 2007, 41:304-308.
LIU Liang-wei, QIN Tian-cang, LIU Xin-yu, et al. Modelling and analysis of the structure of thermostable xylanase[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2007, 41:304-308. (in Chinese)
- [9] Blum D, Kataeva I, Li X, et al. Feruloyl esterase activity of the clostridium thermocellum cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182:1346-1351.
- [10] 刘亮伟, 秦天苍, 刘新育, 等, F/10 及 G/11 木聚糖酶家族密码子偏好性分析 [J], 河南农业大学学报, 2008, 42:223-227.
LIU Liang-wei, QIN Tian-cang, LIU Xin-yu, et al. Analysis on codon bias in F/10 and G/11 xylanase [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2008, 42:223-227. (in Chinese)

- [11] Zhang J, Flint H. A bifunctional xylanase encoded by the *xynA* gene of the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 comprises two dissimilar domains linked by an asparagine/glutamine-rich sequence[J]. *Mol Microbiol*, 1992, 6:1013–1023.
- [12] Xie G, Bruce D, Challacombe J, et al. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *cytophaga hutchinsonii*[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2007, 73:3536–3546.
- [13] Pell G, Szabo L, Charnock S, et al. Structural and biochemical analysis of *Cellvibrio japonicus* Xylanase 10C: How variation in substrate-binding cleft influences the catalytic profile of family Gh-10 Xylanases[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:11777–11788.
- [14] Poon D, Withers S, McIntosh L. Direct demonstration of the flexibility of the glycosylated proline-threonine linker in the cellulomonas fimi Xylanase cex through NMR spectroscopic analysis[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:2091–2100.
- [15] Larson S, Day J, de la Rosa, APB. et al. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis[J]. *Biochemistry*, 2003, 42:8411–8422.
- [16] Moreau A, Roberge M, Manin C, et al. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*[J]. *Biochem J*, 1994, 302:291–295.
- [17] Roberge M, Shareck F, Morosoli R, et al. Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase[J]. *Biochemistry*, 1997, 36:7769–7775.
- [18] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56:326–338.
- [19] Bharadwaj A, Leelavathi S, Mazumdar-Leighton S, et al. The critical role of partially exposed N-terminal valine residue in stabilizing GH10 xylanase from *Bacillus* sp. NG-27 under poly-extreme conditions[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3:1–9.
- [20] Manikandan K, Bhardwaj A, Gupta N, et al. Crystal structures of native and xylosaccharide-bound alkali thermostable xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27: Structural insights into alkalophilicity and implications for adaptation to polyextreme conditions[J]. *Protein Sci*, 2006, 15:1951–1960.
- [21] Mangala SL, Kittur FS, Nishimoto M, et al. Fusion of family VI cellulose binding domains to *Bacillus halodurans* xylanase increases its catalytic activity and substrate-binding capacity to insoluble xylan[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2003, 21:221–230.
- [22] Sunna A, Gibbs M, Bergquist P. The thermostabilizing domain, XynA, of *Caldibacillus cellulovorans* xylanase is a xylan binding domain[J]. *Biochem J*, 2000, 346:583–586.
- [23] Shin E, Yang M, Jung K, et al. Influence of the transposition of the thermostabilizing domain of *Clostridium thermocellum* Xylanase XynX, on Xylan binding and thermostabilization[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2002, 68:3496–3501.
- [24] Abou-Hachem M, Olsson F, Karlsson E. Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*[J]. *Extremophiles*, 2003, 7:483–491.
- [25] 李相前, 邵蔚蓝, 海栖热袍菌内切葡聚糖酶 Cel12B 与木聚糖酶 XynA CBD 结构域融合基因的构建、表达及融合酶性质分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46:726–729.
- LI Xiang-qian, Shao Wei-lan. The construction of thermotoga maritima endoglucanase Cel12B fused with CBD and the characterization of chimeric enzyme[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46:726–729. (in Chinese)
- [26] 李一航, 乔家运, 曹云鹤, 疏色曲霉木聚糖酶基因 *xynA* 与 *xynB* 在大肠杆菌中的融合表达及酶学性质分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34:1086–1091.
- LI Yi-hang, Qiao Jia-yun, Cao Yun-he. In-fusion expression of α -xylanase genes XynA and XynB from *Aspergillus sulphureus* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34:1086–1091. (in Chinese)
- [27] Kamondi S, Szilgyi A, Barna L, et al. Engineering the thermostability of a TIM-barrel enzyme by rational family shuffling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 374:725–730.
- [28] Diaz M, Rodriguez S, Fernandez-Abalos J, et al. Single mutations of residues outside the active center of the xylanase Xys1 Delta from *Streptomyces halstedii* JMS affect its activity[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 240:237–243.
- [29] Kaneko S, Kuno A, Fujimoto Z, et al. An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the cex of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis[J]. *FEBS Lett*, 1999, 460:61–66.
- [30] 张光亚, 方柏山. 基于二肽组识别嗜热和常温蛋白的研究[J]. *生物工程学报*, 2006, 22:293–298.
- ZHANG Guang-ya, FANG Bai-shan. A study on the discrimination of thermophilic and mesophilic proteins based on dipeptide composition[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22:293–298. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)