

文章编号:1009-038X(2005)01-0052-07

F/10 和 G/11 木聚糖酶家族的不同热稳定性机制

刘亮伟^{1,2}, 张革新¹, 贺铁明², 李炜疆¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:应用生物信息学方法分析了木聚糖酶初级序列中20种氨基酸同其最适温度之间的关系,发现在F/10家族中有正相关作用的氨基酸是W,负相关作用的是A,D,H,S;理论上最高最适温度是119.8℃。在G/11家族中有正相关作用的氨基酸是L,D,P,Y,负相关作用的是H;理论上最高最适温度为105.6℃。惊奇地发现在不同家族中D起不同的作用,这只能从它们各自不同的蛋白质空间结构上进行解释。从初级序列基础上证明了木聚糖酶的不同蛋白质家族有不同的热稳定性机制。

关键词:木聚糖酶;热稳定性;机制;蛋白质工程;氨基酸;蛋白质结构
中图分类号:TS 201.2 **文献标识码:**A

Different Thermostable Mechanisms of F/10 and G/11 Xylanase Family

LIU Liang-wei^{1,2}, ZHANG Ge-xin¹, HE Tie-ming², LI Wei-jiang¹

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this article, bioinformatics method was used to analyze the relationship between primary sequence and the optimum temperature of xylanase. The contents of 20 residues were multivariately regressed with the T_{opt} of xylanase, and it was found that, in F/10 the positively correlated residue is W and the negative residues are A, D, H, and S; the calculated maximum T_{opt} is 119.8 °C. Whereas in G/11 the positively correlated residues are L, D, P, and Y, the negative residue is H; the calculated maximum T_{opt} is 105.6 °C. The surprising finding of different effect of D can explained by structures of $(\alpha/\beta)_8$ of F/10 family xylanase and β -jelly roll of G/11 family xylanase. It was demonstrated that different families of xylanase have inconsistent mechanisms thermostable.

Key words: xylanase, thermostability, mechanism, protein engineering, amino acid, protein structure

木聚糖酶(EC 3. 2. 1. 8)在生物技术领域具有广泛的用途,例如饲料^[1]、食品处理^[2]、果汁和酒

的澄清^[3],特别是在纸浆和造纸工业中的应用越来越受到重视^[4]。在近来的报道中,它甚至同临床前

收稿日期:2004-03-01; 修回日期:2004-10-11.

作者简介:刘亮伟(1967-),男,河南长葛人,酶的分子生物学专业博士研究生。

景有关系^[5]。在造纸工业中,用木聚糖酶去除木质素——碳水化合物中的木聚糖,以此加速木质素从细胞壁中释放出来,从而降低氯类化学物质的用量,减少对环境的污染。但常常是生物工程环境比较苛刻,而需要热稳定性比较高的酶。正如纸浆的漂白是在低 pH 值环境中,紧接是对木材的热处理,这样就大大限制了木聚糖酶的应用。

关于蛋白质热稳定机制的问题,人们提出了很多理论,诸如“运载规则”^[6]、“脯氨酸规则”^[7]、疏水核的充分堆积^[8,9]、静电相互作用^[8,10]、螺旋偶极子的稳定^[11]以及缩短的环^[12]等。来源于 *Bacillus* 菌株 D3 木聚糖酶的热稳定性归因于蛋白质表面的 6 个芳香族残基^[13],然而 *T. lanuginosus* 木聚糖酶的热稳定性归因于存在额外的二硫键和带电残基密度的增加^[14]。而对于 F/10 家族木聚糖酶空间结构的比较结果发现,热稳定主要是由于疏水核的堆积、带电侧链同螺旋偶极子的有利相互作用和螺旋 N 端引入脯氨酸,然而盐桥的贡献特别小^[15]。对于 G/11 家族木聚糖酶的结构和序列的量化分析结果把热稳定性归因于较密集的“铰链”区域^[5]。同样对热稳定影响的因素还有带电残基数目的增加和蛋白质二级结构的稳定^[16]。

为了澄清热稳定机制,人们越来越开始将注意力放在单个折叠类蛋白质中^[5,15-17]。当然从结构功能关系来分析蛋白质的稳定性有很大优越性,但是受到有限的蛋白质结构数目所限制,特别是在单一蛋白质家族中没有足够多的嗜热和嗜温的蛋白质结构以供统计分析^[18]。同时也有如文章所指出的基于嗜热和嗜温的蛋白两两比较产生矛盾的结果^[19]。基于蛋白质折叠原理,氨基酸序列中包含了蛋白质的折叠信息^[20],所以认为有必要基于蛋白质的一级序列来研究热稳定性。运用序列同功能之间的关系,作者分析了 G/11 家族木聚糖酶的 pH 值有关氨基酸和两家族间的区别^[21,22],F/10 家族木聚糖酶中氨基酸同最适温度的关系^[22]。同有限的蛋白质结构相比较,序列的数目是巨大的,并且把它直接同蛋白质的功能相联系,可以绕过预测天文数字般的蛋白质空间构象所遇到的尴尬。同以前的研究不同,作者直接分析了氨基酸质量同木聚糖酶最适温度 T_{opt} 的关系。使用每个木聚糖酶起作用的最佳温度,正如所指出的属于某一特定酶的理想温度^[23]。运用来源生物的最适生长温度或通常生长温度有时是有错误的,如众所周知的 *B. licheniformis* α -淀粉酶,来源生物是嗜温的,但 α -淀粉酶的最适温度却是 90 °C^[24]。另一个例子是 *Thermoanaer-*

obacterium sp. 菌株 JW/SL-YS485 的木聚糖酶、乙酰木聚糖酯酶和 α 葡萄糖醛酸酶,前两个酶的活性温度是 80 °C 和 84 °C,而第 3 种酶的最适温度却仅仅是 60 °C^[25]。在构建分析数据库时,作者同样发现来源于同一种生物的木聚糖酶有不同的 T_{opt} ,如 *A. kawachii* 的 P33557 和 P33559,最适温度分别是 50 °C 和 60 °C,尽管这种差别不能将它们区分为嗜热和嗜温两类不同的酶,但这确实反映了它们在热稳定性方面的不同,如果不加区分地处理这一组数据,那么真正的热稳定影响因素可能从分析结果中消失。作者同时发现了其他的同源生物的木聚糖酶有不同的酶最适温度(P36218 和 P36217; Q00177、P55332 和 P55333; P45703 和 P45705; Q60041 和 Q60042)。另外,作者没有区分哪个酶是嗜热或嗜温,因为有时很难在这两个组之间进行区分,并且不同的区分方法会产生不同的结果。最后,文章的相关分析着重于分析在每个家族中全局的趋势,并不考虑单个木聚糖酶的个别差异,所以可以在总体上反应一个木聚糖酶家族的热稳定性影响因素。

当前的工作处理了从 Swiss-Prot (Release 41.0 of 05-Mar-2003) 数据库中下载的 48 条木聚糖酶序列,它们归属于 F/10 家族有 23 条,G/11 家族有 25 条。在文献中查找有关木聚糖酶的最适反应温度,分析了 20 种氨基酸同最适温度间的关系。该结果将对澄清热稳定机制和用酶工程改造热稳定木聚糖酶有用。

1 材料和方法

1.1 数据库的构建

作者从 Swiss-Prot (Release 41.0 of 05-Mar-2003) 数据库中下载了所有的木聚糖酶序列。因为该数据库是一个非冗余性的数据库,并且都是经过专家认读的,错误很少,保证了数据的可靠性。其中有 65 条木聚糖酶序列,2 条因为是片断而被剔除出去(P80717, P80718)。而后查阅了有关文献来寻找有关的木聚糖酶的最适温度,如果发现有不同的报道,则采用较高的最适温度,考虑到试验误差,较高温度说明酶本身属性是那样;如果发现成组木聚糖酶的报道同单个酶的报道不同,则采用成组报道的数据,这样会减少随机误差。经过筛选,发现 48 条木聚糖酶有最适温度,但是一条属于 43 家族(P45796)。根据其 PDB 数据库中的模型结构同 G/11 结构相近,所以把它归类于 G/11 家族进行分析,这样可以增加数据库中的数据,同样可以减小随机误差。这些 48 条木聚糖酶分属在 F/10 家族有

23 条, G/11 有 25 条(见表 1).

1.2 方法

用 FORTRAN 语言编程计算各个序列中 20 种氨基酸的含量,然后用 SAS (8.1 Version) 统计软件进行多元回归分析. 回归程序选择的是逐步回归分析方法,采用缺省设定值的方法. 在经验公式中的每个变量的回归系数保留小数点后 1 位有效数字.

2 结果和讨论

2.1 F/10 家族

经过多元回归分析之后,得到如下的经验公式(根据 F-检验,公式中的每个氨基酸都达到显著水平 $Pr < 0.15$, 并且该数学模型达到极其显著程度, $Pr < 0.01$):

$$T_{opt} = 136.6 - 3.1[A] - 4.8[D] - 11.2[H] - 2.4[S] + 11.5[W]$$

2.1.1 经验公式的有效性和计算最大和最小 T_{opt}

经过回归分析后,检查了公式的有效性,预测的各个木聚糖酶最适温度在表 1 中列出. 从预测温度可以看出,所得经验公式相当有用,除 7 条木聚糖酶的预测温度与实验温度有较大差别(> 8)之外(Q60042, P23556, P56588, P45703, P33559, P26514, O59859),其余的木聚糖酶预测温度都与其报道温度比较接近.

表 1 木聚糖酶最适温度和预测温度

Tab. 1 Xylanase optimum and predicted temperature

ID	T_{opt}	T_{pre}	$\Delta(T_o - T_p)$
F/10			
Q60042	102	84.143	17.857
Q60041	90	91.443	-1.443
Q60037	90	84.085	5.915
Q12603	85	85.911	-0.911
P40942	80	81.003	-1.003
P23360	80	72.811	7.189
P51584	75	67.429	7.571
P07528	70	69.729	0.271
P23556	70	81.023	-11.023
P40944	70	75.148	-5.148
P36917	70	71.67	-1.67
P10478	70	76.457	-6.457

续表 1

ID	T_{opt}	T_{pre}	$\Delta(T_o - T_p)$
P56588	67	57.837	9.163
P07986	65	66.164	-1.164
P40943	65	67.135	-2.135
P45703	60	50.873	9.127
P33559	60	49.62	10.38
P26514	60	68.666	-8.666
P14768	55	60.965	-5.965
P26223	55	58.203	-3.203
Q00177	52	49.909	2.091
O59859	40	52.887	-12.887
P29417	40	44.807	-4.807
G/11			
O43097	82	72.373	9.627
P33558	70	64.73	5.27
P35809	65	63.237	1.763
P55329	60	54.992	5.008
P55334	60	63.099	-3.099
P55332	58	56.579	1.421
P48824	55	57.959	-2.959
P09850	55	56.6	-1.6
P45705	55	55.56	-0.56
P26515	55	51.1	3.9
P26220	55	52.383	2.617
P45796	55	58.227	-3.227
P35811	55	49.467	5.533
P55333	54	54.824	-0.824
P55328	50	54.992	-4.992
P33557	50	54.992	-4.992
P48793	50	46.626	3.374
P00694	50	47.117	2.883
P18429	50	52.126	-2.126
P29126	50	45.16	74.833
P36217	45	50.016	-5.016
Q06562	45	40.519	4.481
P17137	43	52.649	-9.649
P36218	40	36.668	3.332
P29127	40	52.296	-12.296

注: ID. 木聚糖酶在 Swiss-Prot 数据库中的序列号; T_{opt} . 木聚糖酶的最适温度; T_{pre} . 根据经验公式所得的预测温度; $\Delta(T_o - T_p)$. (最适温度 - 预测温度).

从该家族木聚糖酶序列中,找到了在经验公式中有关氨基酸的最大值和最小值([A], [D], [H], [S], [W]; 5.18/12.87, 4.62/8.7, 1.07/4.85, 2.27/16.58, 3.41/1.55; 分别在 P23556/P07986, P14768/P07528, P36917/P45703, Q12603/P14768, Q12603/P51584), 计算了在该家族中理论上最大和最小最适温度分别为 119.8 °C 和 -21.6 °C.

2.1.2 经验公式的意义 从经验公式可以看出,在该家族中,木聚糖酶的最适温度与色氨酸含量呈正相关作用,而同丙氨酸、天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸的含量呈负相关. 色氨酸的正相关作用可以理解,因为色氨酸是疏水性最强的氨基酸和长距离作用残基^[26],同时是最有效的 π -受体^[27]. 可以认为在 F/10 家族中,热稳定性主要是由疏水作用来维持,正如文献所指出的这种作用是稳定蛋白质结构的最主要因素^[28],因为静电作用残基天冬氨酸和组氨酸的含量在热稳定性中起负相关作用. 丝氨酸的负相关作用并不奇怪,因为它具有特别高的柔性^[29],是最不稳定的残基^[30],并且常常被认为缺少它是嗜热蛋白质的普遍趋势^[31];同时它也出现在“运载规则”中^[6]. 但是,正如文献所指出的在蛋白质热稳定中具有低含量的丙氨酸^[17]. 作者也发现,丙氨酸在该家族木聚糖酶的热稳定性中起负作用,因为已有的知识认为它有稳定 α -螺旋的作用^[7]. 其他丙氨酸降低的热稳定酶有淀粉酶^[32]和环化糊精糖苷转移酶^[33],因为它们同 F/10 家族木聚糖酶有相似的 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠结构. 当时这被解释为家族树的特征^[17],现在看来该现象是关系到酶的热稳定性的. 此种现象被观察到,但是没有文献进行分析. 应该分析这 4 种氨基酸[A(丙氨酸), D(天冬氨酸), H(组氨酸), S(丝氨酸)]同色氨酸的不同特性,惟一能够归属这 4 种氨基酸特性的是它们普遍的中短距离作用 E_m s (1.40, 1.16, 1.22, 1.30, 同色氨酸的 1.03 相比),然而色氨酸具有长距离作用 E_l (0.83, 同 A, D, H, S 相比的 0.49, 0.35, 0.54, 0.45)^[34],所以推测色氨酸的长程作用在该家族蛋白质的热稳定中起正相关作用,而其他 4 种氨基酸的中短程作用是负作用. 作者同时注意到,所有这些氨基酸在非规则二级结构(螺旋和折叠片)中出现的频率较高,所以比较容易想到这些不规则区域是影响酶热稳定性的位点区域.

该结果同以前文献一致,文献指出,在该家族中氢键的稳定性作用没有说服力,并且盐桥势能和热稳定性之间没有相关性^[15],同时也没有发现脯氨酸在稳定性方面的作用. 前人也同样发现了丝氨酸
万方数据

显著减少和色氨酸增多^[18]. 但在当时对色氨酸的作用并不明了^[35],现在可以肯定它对酶的稳定性有关,因为该酶有与木聚糖酶相似的 $(\beta/\alpha)_8$ 空间结构. 一个较早的研究结果注意到,嗜冷木聚糖酶表面有相对较丰富的带电残基并归因于同溶剂相互作用^[36],作者认为这是不稳定因素,然而在低温环境中这种作用不明显. 一项失败的纤维素酶热稳定工程的研究显示引入静电相互作用而降低了热稳定性^[37],证实了在 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠类中引入静电没有稳定效果,同样证明了目前的分析结果:在此种折叠类中静电作用起负相关作用. 同时注意到他们在酶工程中所采用的理论并没有显示出此折叠类中氢键和离子对对热稳定性有作用^[31],所以引入静电相互作用是注定要失败的.

2.2 G/11 木聚糖酶家族

经过多元回归分析之后,得到如下的经验公式(根据 F-检验,公式中的每个氨基酸都达到显著水平 $Pr < 0.15$, 并且该数学模型达到极其显著程度, $Pr < 0.01$):

$$T_{opt} = -37.3 + 5.3[D] + 5.5[L] + 5.8[P] + 5.6[Y] - 6.2[H]$$

2.2.1 经验公式的有效性和计算最大和最小 T_{opt}

经过回归分析,检查了公式的有效性,预测的各个木聚糖酶最适温度在表 1 中列出. 从预测温度可以看出,所得该家族的经验公式比 F/10 家族的经验公式要好,只有 3 条木聚糖酶的预测温度与实验温度有较大差别 (> 8) 之外(O43097, P17137, P29127),其余的木聚糖酶的预测温度都与其报告温度比较接近. 其中的 O43097 在文献中最适温度报道为 82 °C^[38],而另一篇同样报道该酶的最适温度为 70 °C^[14],它们有较大出入. 用经验公式预测所得结果为 72 °C,同后者的报道非常接近. 从这个结果可以看出,二硫键对该酶的热稳定性所起的作用并不大,不是如同文献中所认为的那样重要^[14].

从该家族木聚糖酶中选择在经验公式中有关氨基酸的最大和最小值([D], [L], [P], [Y], [H]; 6.19/0, 5.09/1.57, 4.76/1.63, 10.1/5.26, 0.34/2.63; 分别在 O43097/P55334, P45796/P26220, P45796/P55329, P55334/P29127, P26515/P45796), 同样计算了在该家族中木聚糖酶理论上的最大和最小 T_{opt} , 分别为 105.6 °C 和 -6.1 °C.

2.2.2 经验公式的意义 从经验公式中可以看出,在该家族中最适温度与天冬氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、组氨酸的含量有负相关作用. 在回归分析过程中作者注意到苯丙氨酸也同样起到负相关

作用,但是经过逐步回归之后,苯丙氨酸又从回归模型中消失了,因为显著性不明显而没有在模型中出现。看起来在该木聚糖酶家族中有很多因素影响酶的稳定性。天冬氨酸可以形成盐桥、稳定螺旋的N端偶极子^[39]和氢键。亮氨酸的功能非常有意思,因为它有形成螺旋和折叠片的能力^[34],所以非常适合在G/11木聚糖酶中起稳定作用,因为该家族木聚糖酶的结构是由大量的折叠片和一个螺旋所组成。脯氨酸的作用同样在该家族中出现^[7],它也是在蛋白质工程中常用的一个规则:脯氨酸在 β 转角出现频率的增加或总的疏水氨基酸数目的增加可以增加蛋白质的热稳定性。一项近期研究表明, β 转角的第二个位点和 α -螺旋的N端第一个位点对酶的热稳定性非常重要^[40]。同样在酶稳定性中有重要作用的是酪氨酸,因为它是很有有效的 π -受体(尽管比色氨酸稍弱^[27])、能够形成芳香族作用和氢键作用^[41],并且经证实酪氨酸的大部分—OH都对酶的稳定性有利^[42],它的疏水作用同样被报道对稳定性有作用。可以将组氨酸同其它残基分开的性质是它的强极性(51.60)和归一化疏水性(-0.40)^[34],可以归类为有极性而不带电荷,此类氨基酸常被认为是热稳定性的破坏者。

此种结果同文献中关于*T. lanuginosus*木聚糖酶的研究一致,它显示木聚糖酶中带电残基密度有增加^[14],同从*P. varoti*来的木聚糖酶有共同的静电作用而作为稳定因素^[5]。一项近期研究同样证实带电残基数量的增加会加强极性作用^[16]。但是没有发现精氨酸数量的增加对该家族木聚糖酶的热稳定有作用,可能是因为它没有显著到在模型中出现。

2.3 F/10 家族和 G/11 家族的比较

尽管天冬氨酸有能力稳定螺旋偶极子,其作用也在对215条 α -螺旋的特定位点研究中所证实^[39]。然而在F/10家族中是不同的,该家族酶的空间结

构是 $(\beta/\alpha)_8$,螺旋的偶极子大致上是平行排列的,可以想见,在静电相互作用方面是不利的^[43]。而在G/11家族木聚糖酶中,酶的空间结构是 β -果冻卷层,只有一个螺旋,所以天冬氨酸可以稳定螺旋,以此在较高温度下稳定木聚糖酶。在这两个家族的酶中组氨酸有共同的负相关作用,可以归因于它的强极性和归一化疏水性,它的疏水性几乎呈中性可能成为破坏稳定的因素,因为不管在高或低pH值的环境,都会改变它的电荷而对蛋白质的稳定性产生破坏作用。同样注意到,在蛋白质工程中对这两个家族所采用的原则是不同的^[31]。

从在这两个家族中计算所得最大和最小最适温度值,可以看出 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠类要比 β -果冻卷层类结构稳定得多,因为前者的作用范围(-21.6℃~119.8℃)要比后者作用范围(-6.1℃~105.6℃)宽得多,同样显示在高温或低温环境中,疏水作用在蛋白质的稳定中所起的作用要比其他作用重要。从计算结果可以看出,通过酶工程改造木聚糖酶的热稳定性还有很大空间。

3 结 论

当前工作采用生物信息学的方法证实了木聚糖酶的不同家族采用不同的热稳定机制。在F/10家族中,热稳定因素主要依赖于色氨酸的疏水作用,而在G/11家族中看起来有很多因素起作用。这种结果可能对蛋白质的理论折叠和蛋白质酶工程的实际应用都有用途。报道指出基于嗜热和嗜温的蛋白质同源比较结果而采取的定点突变成功例子很少^[44],因为序列差异之处太大,并且中性突变太多。特别重要的是,直接指出了具有同样功能的木聚糖酶因空间结构的不同而采用了不同的热稳定机制,这将会对木聚糖酶的热稳定工程的改造提供有用的指导作用。

参考文献:

- [1] Maat J, Roza M, Verbakel J, et al. Xylans and Xylanases[M]. New York: Elsevier, 1992, 171-186.
- [2] Biely P. Microbial xylanolytic systems [J]. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 286-290.
- [3] Wong K K Y, Saddler J N. Xylan and xylanases[M]. New York: Elsevier, 1992. 171-187.
- [4] Viikari L, Kantellinen A, Sundquist J, et al. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 13: 335-350.
- [5] Kumar P R, Eswaramoorthy S, Vithayathil P J, et al. The tertiary structure at 1.59 resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces varioti* Bainier [J]. *J Mol Biol*, 2000, 295: 581-593.
- [6] Argos P, Rossmann M G, Grau U M, et al. Thermal stability and protein structure [J]. *Biochemistry*, 1979, 18: 5698

—5703.

- [7] Matthews B, Nicholson H, Becktel W. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6663—6667.
- [8] Chan M K, Mukund S, Kletzin A, *et al.* Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase [J]. *Science*, 1995, 267: 1467—1469.
- [9] Sakon J, Adney W S, Himmel M E, *et al.* Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose[J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 10648—10660.
- [10] Ishikawa K, Okumura M, Katayanagi K, *et al.* Crystal structure of ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8 refined at 2.8 resolution[J]. *J Mol Biol*, 1993, 230: 529—542.
- [11] Nicholson H, Anderson D E, Dao-pin S, *et al.* Analysis of the interaction between charged side chains and the α -helix dipole using designed thermostable mutants of phage T4 lysozyme [J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 9816—9828.
- [12] Daggett V, Levitt M. Protein unfolding pathways explored through molecular dynamics simulations [J]. *J Mol Biol*, 1993, 232: 600—619.
- [13] Harris G W, Pickersgill R W, Connerton I, *et al.* Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase[J]. *Proteins*, 1997, 9: 77—86.
- [14] Gruber K, Klintschar G, Hayn M, *et al.* Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 13475—13485.
- [15] Lo Leggio L, Kalogiannis S, Bhat M K, *et al.* High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implication for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with Barrel architecture [J]. *Proteins*, 1999, (36): 295—306.
- [16] Hakulinen N, Turunen O, Janis J, *et al.* Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa* comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 1399—1412.
- [17] Maes D, Zeelen J P, Thanki N, *et al.* The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures [J]. *Proteins*, 1999, 37: 441—453.
- [18] Szilágyi A, Závodszy P. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits; results of a comprehensive survey[J]. *Structure*, 2000, 8: 493—504.
- [19] Panasik N, Brenchley J E, Farber G K. Distributions of structural features contributing to the thermostability in mesophilic and thermophilic glycosyl hydrolases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, (1543): 189—201.
- [20] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chains[J]. *Science*, 1973, 181: 223—230.
- [21] Liu L, Li X, Li X, *et al.* Computational analysis of responsible dipeptides for optimum pH in G/11 xylanase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321: 391—396.
- [22] Liu L, Zhang J, Chen B, *et al.* Principle component analysis in F/10 and G/11 xylanase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322: 277—280.
- [23] Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds and ion pairs[J]. *J Mol Biol*, 1997, 269: 631—643.
- [24] Declerck N, Machius M, Wiegand G, *et al.* Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase[J]. *J Mol Biol*, 2000, 301: 1041—1057.
- [25] Shao W, Deblois S, Wiegel J. A high-molecular weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium sp.* Strain JW/SL-YS485 [J]. *Appl Envir Microbiol*, 1995, 61: 937—940.
- [26] Selvaraj S, Gromiha M M. Importance of long-range interaction in (alpha/beta) 8 barrel fold[J]. *J Protein Chem*, 1998, 17: 691—697.
- [27] Steiner T, Koellner G. Hydrogen bonds with acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3 D structure [J]. *J Mol Biol*, 2001, 305: 535—557.
- [28] White P J, Squirrell D J, Arnaud P, *et al.* Improved thermostability of the north American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354[J]. *Biochem J*, 1996, 319: 343—350.
- [29] Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins. A tool of the selection of peptide antigens[J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72: 212—213.
- [30] Ponnuswamy P K, Muthusamy R, Manavalan P. Amino acids composition and thermal stability of proteins [J]. *Int J Bi*

- ol Macromol**, 1982, (4): 186—190.
- [31] Haney P J, Badger J H, Buldak G L, *et al.* Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species [J]. **Pro Natl Acad Sci USA**, 1999, 96: 3578—3583.
- [32] Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins[J]. **J Biochem** (Tokyo), 1980, 88: 1895—1898.
- [33] Knechtel R M, Wind R D, Rozeboom H J, *et al.* Crystal structure at 2.3 resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermonaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 [J]. **J Mol Biol**, 1996, 256: 611—622.
- [34] Oobatake M, Ooi T. An analysis of non-bonded energy of proteins[J]. **J Theor Biol**, 1977, 67: 567—584.
- [35] Aguilar C F, Sanderson I, Moracci M, *et al.* Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability[J]. **J Mol Biol**, 1997, 271: 789—802.
- [36] Petrescu I, Lamotte-Brasseur J, Chessa J P, *et al.* Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae* [J]. **Extremophiles**, 2000, 4: 137—144.
- [37] Nemeth A, Kamondi S, Szilagyi A, *et al.* Increasing the thermal stability of cellulase using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study [J]. **Biophys Chem**, 2002, 132: 229—241.
- [38] Gubitz G M, Haltrich D, Latal B, *et al.* Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 47: 658—662.
- [39] Richardson J S, Richardson D C. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices[J]. **Science**, 1988, 240: 1648—1652.
- [40] Watanabe K, Suzuki Y. Protein thermostability by proline substitutions [J]. **J Mol Catal B-Enzym**, 1998, (4): 167—180.
- [41] Georis J, de Lemos Esteves F, Lamotte-Brasseur J, *et al.* An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study [J]. **Protein Sci**, 2000, 9: 466—475.
- [42] Pace C N, Horn G, Hebert E J, *et al.* Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability[J]. **J Mol Biol**, 2001, 312: 393—404.
- [43] Hol W G, Halie L M, Sander C. Dipoles of the alpha-helix and beta-sheet: their role in protein folding[J]. **Nature**, 1981, 294: 532—536.
- [44] Martin A, Sieber B, Schmid F X. In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface [J]. **J Mol Biol**, 2001, 307: 726.

(责任编辑:杨萌)

(上接第40页)

- [4] 王益民, 韦福康, 刘敏. 成纤维细胞与创伤修复的研究进展[J]. **Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery**, 2000, 14(2): 126—128.
- [5] 王亮. 新生小鼠表皮细胞的培养-人胎盘组织提取液对细胞生理作用的评价[J]. **日用化学工业**, 2001, 31(1): 61—64.
- [6] 安藤义隆, 安藤裕. 牛胎盘抽出细胞代谢活性物质[P]. 日本专利, 5-71600, 1993-10-07.
- [7] Graeme I Howling, Peter W Dettmar, Paul A Goddard, *et al.* The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro[J]. **Biomaterials**, 2001, 22: 2959—2960.
- [8] Michael R Schaffer, Udaya Tantry. Stimulation of fibroblast proliferation and matrix contraction by wound fluid[J]. **Int J Biochem Cell Biol**, 1997, 24(12): 231—239.
- [9] 王波涛, 陈璧, 胡大海, 等. 烫伤皮肤创面炎性细胞合成 CGRP, SP 对 3T3 细胞的增殖作用[J]. **第四军医大学学报**, 1999, 20(5): 409—411.
- [10] 翁梁, 周秋丽, 王丽娟, 等. 鹿茸多肽促进表皮和成纤维细胞增殖及皮肤创伤愈合[J]. **药理学报**, 2001, 36(11): 817—820.
- [11] 董泉洲, 尚尔和, 王小惠, 等. 羊胎盘营养液的制备及其在化妆品中的应用[J]. **日用化学工业**, 1998, (1): 12—13.

(责任编辑:杨勇)