

doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2013.01.10

东方肉座菌 EU7-22 木聚糖酶和木糖苷酶基因克隆及生物信息学研究

龙传南¹, 蒋凤姣¹, 鄢小兵², 刘健¹, 龙敏南^{1,2*}

(1. 厦门大学能源研究院 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005)

摘要: 东方肉座菌 EU7-22 具有高产半纤维素酶的能力。根据已报道的同属里氏木霉及绿色木霉木聚糖酶、木糖苷酶相关基因序列, 设计 PCR 引物扩增出东方肉座菌内切木聚糖酶(XYN I, XYN II) 及 β -木糖苷酶(β -BXL) 基因。序列经 NCBI Blast 分析: 东方肉座菌 xyn I 基因与里氏木霉 xyn1 基因(X69573.1) 的同源性最高达到 91%; xyn II 基因与绿色木霉 xyn2 基因(EF079061) 同源性最高达到 93%; β -bxl 基因与里氏木霉 β -bxl1 基因(Z69257.1) 的同源性最高达到 94%。生物信息学分析表明内切木聚糖酶 I 和 II 均属于糖基水解酶家族 11, N 末端前 19 个氨基酸均为信号肽。内切木聚糖酶 I 分子量为 24.13 kD, 等电点为 7.87, 含有 3 个糖基化位点; 内切木聚糖酶 II 分子量为 24.44 kD, 等电点为 4.86, 含有 1 个糖基化位点; β -木糖苷酶属于糖基水解酶家族 3, 分子量为 87.27 kD, 等电点为 5.49, N 末端前 20 个氨基酸为信号肽, 含有 8 个糖基化位点。利用 SWISS-Model 对木聚糖酶、木糖苷酶蛋白质三级结构进行了预测和模拟。对木聚糖酶和木糖苷酶基因及其编码蛋白质的生物信息学分析, 为进一步研究这些基因的表达与调控、构建高效利用纤维素组份的工程菌株奠定基础。

关键词: 东方肉座菌 木聚糖酶 木糖苷酶 基因克隆 生物信息学

中图分类号: Q343.1+5 文献标识码: C 文章编号: 1672-5565(2013)-01-058-07

Gene cloning and bioinformatics analysis of Xylanases and Xylosidase from *Hypocrea orientalis*

LONG Chuan-nan¹, JIANG Feng-jiao¹, WU Xiao-bing², LIU Jian¹, LONG Min-nan^{1,2*}

(1. School of Energy Research, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005, China)

Abstract: *Hypocrea orientalis* EU7-22 had a high potential to yield hemicellulase. Two endo-xylanases genes (xyn I, xyn II) and one β -xylosidase gene (β -bxl) were successfully cloned by PCR, according to the reported xylanases and β -xylosidase gene sequences of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride*. The xyn I and β -bxl gene from *H. orientalis* showed the highest nucleotide homology of 91% and 94% with the corresponding gene from *T. reesei*, respectively. While the xyn II gene from *H. orientalis* showed the highest of 93% nucleotide homology with the corresponding gene from *T. viride*. The bioinformatics analysis indicated that the enzyme XYN I and XYN II belonged to the glycosyl hydrolase family 11 with the molecular weight of 24.13 kD and 24.44 kD, respectively. The first 19 AA of N-terminal of XYN I and XYN II were the signal peptide sequence. The enzyme XYN I and XYN II contained three and one N-glycosylation site, respectively. The isoelectric point of enzyme XYN I and XYN II were identified as 7.87 and 4.86, respectively. The enzyme β -BXL belonged to glycosyl hydrolase family 3 with molecular weight of 87.27 kD and isoelectric point of 5.49. The first 20 AA of N-terminal of β -BXL belonged to signal peptide sequence. The enzyme contained 8 N-glycosylation sites. By using SWISS-Mod-

收稿日期: 2011-04-09; 修回日期: 2012-04-09.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(NO.2010CB732201); 中央高校基本科研业务费专项资金(NO.201112G026); 国家自然科学基金(NO.31170067)。

作者简介: 龙传南,男,博士研究生; E-mail: longen2004@126.com.

* 通讯作者: 龙敏南,教授。Tel: 86-592-2188052; Fax: 86-592-2188053; E-mail: longmn@xmu.edu.cn.

el, the tertiary structure of the three enzyme proteins were predicted and simulated. These genes cloning and bioinformatics analysis would help to the further research on mechanism of expression and regulation of hemicellulase.

Keywords: *Hypocrea orientalis*, Xylanases, Xylosidase, Gene cloning, Bioinformatics

天然纤维素生物质是地球上最丰富的可再生资源,但目前被利用生物质只占 11%。纤维素大多被半纤维素包裹,其降解必然受到半纤维素的制约,因而纤维素酶和半纤维素酶联合使用,被广泛应用于造纸、食品加工、纺织、动物饲料和能源工业等诸多领域,具有显著的应用价值^[1]。木聚糖为半纤维素主要组成成份,含量仅次于纤维素的第二丰富的天然多糖^[2]。目前,工业降解木聚糖常用的方法有酸法、碱法和酶法,其中酸法、碱法应用较为广泛,但酸碱水解液中含有较多的有毒物质,对于后期微生物发酵有抑制作用;另外,采用酸法或碱法降解木聚糖,对环境污染严重,从长期生产效果来看,酶法降解木聚糖将是未来木聚糖降解的主要方式^[3]。木聚糖降解需要多种半纤维素酶参与,主要有木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶、乙酰木聚糖酯酶、 α -L-阿拉伯糖酶、阿魏酸酯酶、p-香豆酸酯酶等。但是在木聚糖降解时,起主要作用的酶是:①内切 β -1,4-木聚糖酶(EC3.2.1.8),该酶以内切方式作用于木聚糖主链内部的 β -1,4木糖苷键,主要水解产物为低聚木糖和少量木糖。② β -木糖苷酶(EC3.2.1.37),该酶通过水解低聚木糖的末端来催化释放木糖残基^[2]。其它半纤维素酶起协同辅助作用。已报道的能产半纤维素酶的微生物有细菌、链霉菌、曲霉、青霉和木霉等,人们研究和应用最多的是细菌、曲霉和木霉产半纤维素酶^[4]。

东方肉座菌(*Hypocrea orientalis*)属于木霉属,菌株 EU7-22(原命名为灰绿曲霉 EU7-22)为本实验室分离保存。该菌株不但具有高产纤维素酶的能力,而且还具有高产半纤维素酶的能力。本研究首次从该菌株中克隆内切木聚糖酶和 β -木糖苷酶基因,并采用生物信息学方法分析酶蛋白的性质,为后续开展半纤维素酶的基因工程与蛋白质工程研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PCR 扩增试剂和 pMD19-T 载体均购于宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂购于上海生工生物工程技术有限公司和国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株及培养基

菌株:东方肉座菌(*H. orientalis*) EU7-22,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH-5 α 为本实验室保存。

PDA 培养基:马铃薯 200 g 洗净,去皮,切成小块,煮沸 30 min,6 层纱布过滤,定容至 1 L,加葡萄糖 20 g,自然 pH;固体培养基按 2% 浓度加入琼脂粉。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,用去离子水定容至 1 L;固体培养基按 2% 浓度加入琼脂粉。

1.3 菌株总 DNA 提取

东方肉座菌 EU7-22 经 PDA 液体培养基培养 36 h 后,按照 SDS 裂解法提取丝状真菌染色体总 DNA^[5]。

1.4 引物设计与合成

根据 GenBank 中里氏木霉及绿色木霉内切木聚糖酶 I 基因(xyn1; GenBank accession No. X69573 与 AY320048.1),内切木聚糖酶 II 基因(xyn2; GenBank accession No. X69574 与 EF079061), β -木糖苷酶基因(β -bxl1; GenBank accession No. Z69257.1)的序列分别设计 3 对 PCR 扩增引物(表 1),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 东方肉座菌木聚糖酶和木糖苷酶基因 PCR 扩增引物
Table 1 The primers used in PCR to amplify DNA fragments encoding xylanases and xylosidase in *H. orientalis*

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增基因
XYN I - F	ATGGTCTCCTTCACCTCCCTC	xyn I
XYN I - R	TTAGCTGACCGGTGATGGAAGC	xyn I
XYN II - F	ATGGTTGCC TTTTCCAGCCTC	xyn II
XYN II - R	CTAGTTGCTGACACTCTGTGAGG	xyn II
Bxl - F	ATGGTGAATAACCGCAGCTCTTCTCG	β -bxl
Bxl - R	TTATGCCGTCAG GTGTAGCATCCTTG	β -bxl

1.5 木聚糖酶和木糖苷酶基因的 PCR 扩增

以提取的东方肉座菌总 DNA 为模板,采用 Takara 公司的高保真 Taq 酶,利用引物对 XYN I - F&R, XYN II - F&R 和 Bxl - F&R 进行 PCR 扩增,分别获得内切木聚糖酶 I 基因、内切木聚糖酶 II 基因、 β -木糖苷酶基因片段。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。扩增 β -bxl 基因的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,61 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。

PCR 扩增产物经胶回收试剂盒纯化后,连接到 pMD19-T 载体上,转化 *E. coli* DH-5 α 感受态细胞中,先进行蓝白斑筛选,然后用 M13 通用引物对阳性克隆子进行筛选和测序验证(北京六合华大基因科技股份有限公司)。

1.6 木聚糖酶和木糖苷酶的生物信息学分析

将克隆基因序列在 Genbank 数据库中进行同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>);根据 BLAST 比对的结果,分析基因内含子位置并去掉内含子,利用 Primer Premier 5.0 进行核酸及蛋白质序列分析;用 ProtParam 工具^[6]分析基因编码蛋白质的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质(<http://web.expasy.org/protparam/>);利用 SignalP-4.0 软件^[7]分析 N-末端信号肽序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);利用 NetNGlyc 软件^[8]进行蛋白质 N-糖基化位点预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>);利用 Prosite motif search^[9]对蛋白质的功能位点进行搜索(<http://prosite.expasy.org/>);利用 SWISS-Model^[10]预测和模拟蛋白质的三级结构(<http://swiss-model.expasy.org/workspace/index.php?>)。

2 结果

2.1 PCR 扩增木聚糖酶和木糖苷酶基因片段

以东方肉座菌总 DNA 为模板,利用引物对 XYN I-F&R, XYN II-F&R, Bxl-F&R 分别进行 PCR 扩增,获得内切木聚糖酶 I 基因(xyn I, 约 750 bp)片段,内切木聚糖酶 II 基因(xyn II, 约 750 bp)片段及 β -木糖苷酶基因(β -bxl, 约 2 400 bp)片段。PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1.0%)电泳,结果如图 1 所示。可以看出,PCR 反应均扩增出单一的 DNA 条带,基因片段的大小与预期一致。

2.2 木聚糖酶和木糖苷酶基因序列 Blast 分析

序列测定结果经 NCBI Blast: 东方肉座菌 EU7-22 内切木聚糖酶 I 基因全长 781 bp (GenBank accession No. JQ238610),与里氏木霉 xyn1 基因(X69573.1)同源性最高达到 91%,与绿色木霉 xyn1 基因(AY320048.1)同源性仅为 87%。根据以上两种木霉 xyn1 基因内含子位置,分析菌株 EU7-22 xyn I 基因含有 1 个内含子,位于 276-381 bp 处。利用 Primer Premier 5.0 将 xyn I 基因(去掉内含子)翻译成相应氨基酸序列(编码 224 个氨基酸)并进行 Protein blast,结果显示 xyn I 基因编码的蛋白质属于糖基水解酶家族 11,与假康宁木霉木聚糖酶(ABY71932.1)同源性最高达到 100%,但是序列

覆盖率不及里氏木霉;与里氏木霉内切木聚糖酶 I (AAB29346.1)氨基酸序列同源性达 99%;与绿色木霉内切木聚糖酶 I (AAP83925.1)氨基酸序列同源性仅为 84%。

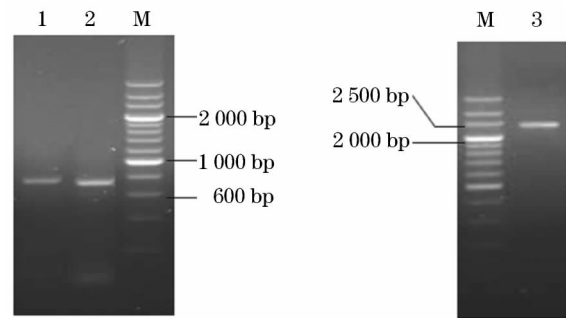


图 1 PCR 扩增木聚糖酶和木糖苷酶基因片段的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of xylanases and xylosidase gene fragments by PCR

(M: 200 bp DNA marker; 1: xyn I; 2: xyn II; 3: β -bxl).

内切木聚糖酶 II 基因全长 752 bp (GenBank accession No. JQ238611),与绿色木霉 xyn2 基因(EF079061)同源性最高达到 93%,与里氏木霉 xyn2 基因(X69574.1)同源性达 89%。根据以上两种木霉 xyn2 基因内含子位置,分析菌株 EU7-22 xyn II 基因含有 1 个内含子位于 291-352 bp 处。利用 Primer Premier 5.0 将 xyn II 基因(去掉内含子)翻译成相应氨基酸序列(编码 229 个氨基酸)并进行 Protein blast,结果显示 xyn II 基因编码的蛋白质属于糖基水解酶家族 11,与里氏木霉内切木聚糖酶 II (P36218.1)氨基酸序列同源性最高达到 96%,与绿色木霉内切木聚糖酶 II (EHK20957.1)氨基酸序列同源性仅为 87%。

β -木糖苷酶基因全长 2 394 bp (GenBank accession No. JQ238612),与里氏木霉 β -bxl1 基因(Z69257.1)同源性最高达 94%,没有木霉属其它菌株相似性结果。根据里氏木霉等 β -bxl1 基因序列信息,分析得知菌株 EU7-22 β -bxl 基因不含内含子。利用 Primer Premier 5.0 将 β -bxl 基因翻译成相应氨基酸序列(编码 797 个氨基酸)进行 Protein blast,结果显示 β -bxl 基因编码的蛋白质属于糖基水解酶家族 3,与里氏木霉 β -木糖苷酶(CAA93248.1)氨基酸序列同源性最高达到 100%。

2.3 木聚糖酶和木糖苷酶基因编码蛋白质 Prot-Param 分析

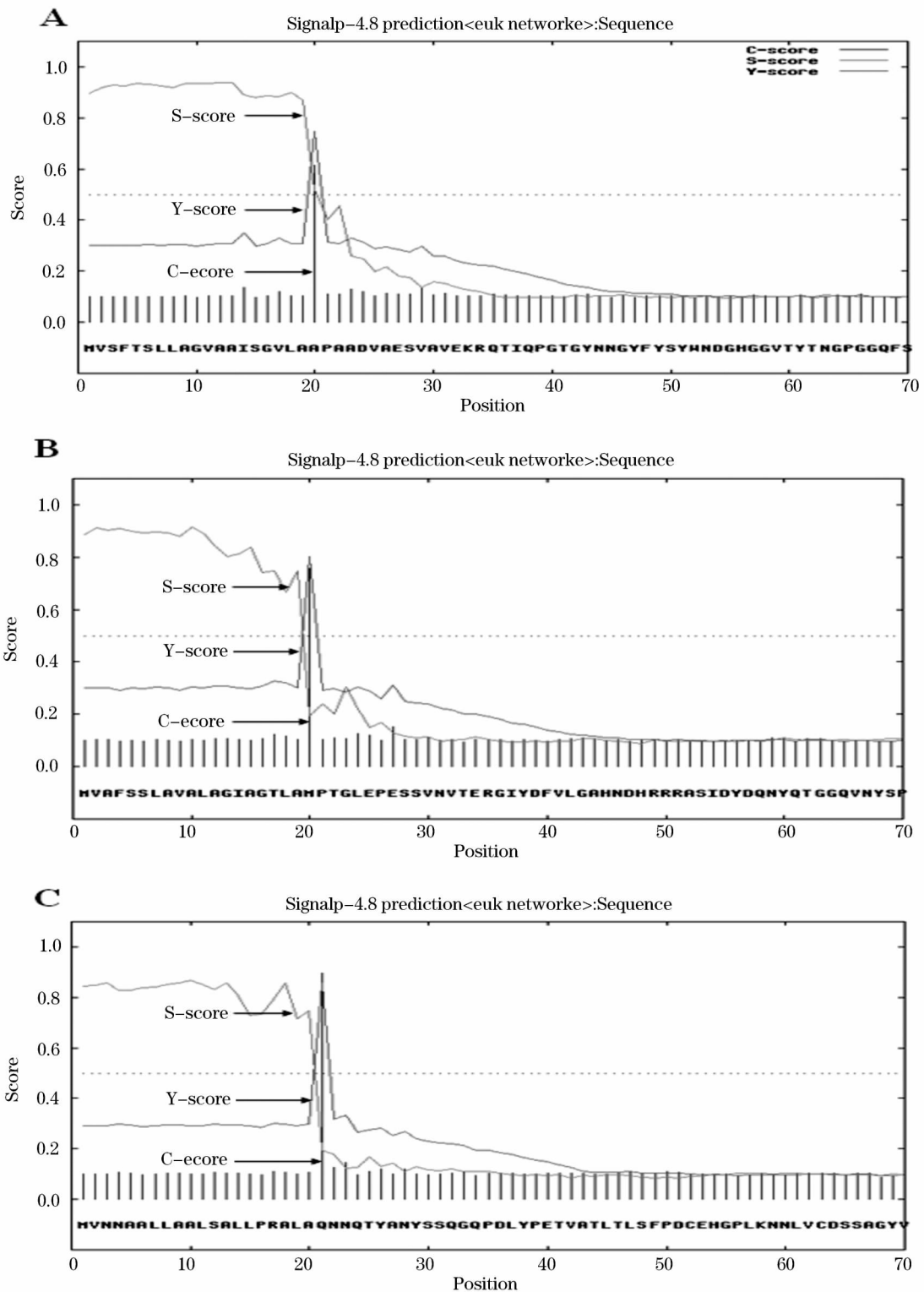


图 2 东方肉座菌木聚糖酶和木糖苷酶蛋白信号肽分析

Fig. 2 SignalP analysis of xylanases and xylosidase proteins from *H. orientalis*

(A: 内切木聚糖酶 I 蛋白; B: 内切木聚糖酶 II 蛋白; C: β -木糖苷酶蛋白)

东方肉座菌 EU7-22 内切木聚糖酶 I (XYN I) 基因编码 224 个氨基酸,用 Protparam 软件预测该蛋白的理化性质 相对分子质量为 24.13 kD,等电点为 7.87,酸性氨基酸总数为 11 个,碱性氨基酸总数为 12 个,理论推导半衰期大于 20 h,不稳定参数

为 18.57,属于稳定性蛋白质。

内切木聚糖酶 II (XYN II) 基因编码 229 个氨基酸,用 Protparam 软件预测该蛋白的理化性质,推测该蛋白相对分子质量为 24.44 kD,等电点为 4.86,酸性氨基酸总数为 16 个,碱性氨基酸总数为 8

个,理论推导半衰期大于 20 h,不稳定参数为 28.19,属于稳定蛋白质。

β -木糖苷酶(β -BXL)基因编码 797 个氨基酸,用 ProtParam 软件预测该蛋白的理化性质,推测该蛋白相对分子质量为 87.27 kD,等电点为 5.49,酸性氨基酸总数为 77 个,碱性氨基酸总数为 64 个,理论推导半衰期大于 20 h,不稳定参数为 32.61,属于稳定性蛋白质。

2.4 木聚糖酶和木糖苷酶基因编码蛋白质 SignalP 分析

利用 SignalP-4.0 软件对东方肉座菌 EU7-22 木聚糖酶系蛋白质 N-末端信号肽序列进行分析。内切木聚糖酶 I 蛋白质(图 2A) N 末端前 1-19 个氨基酸(MVSFTSLLAGVAAISGVLA)为信号肽序列,切割位点位于第 19 与 20 号氨基酸之间;内切木聚糖酶 II 蛋白质(图 2B) N 末端前 1-19 个氨基酸(MVAFSSLAVALAGIAGTLA)

注: C-score: 酶切位点,数值越高说明其作为酶切位点的可能性越高; S-score: 单氨基酸数值,越高说明该氨基酸作为信号肽部分的可能性越高; Y-score: C 值和 S 值的派生值,更准确的确定酶切位点,数值最高处为酶切位点。

为信号肽序列,切割位点位于第 19 与 20 号氨基酸之间; β -木糖苷酶蛋白质(图 2C) N 末端前 1-20 个氨基酸(MVNNAALLAALSALLPRALA)为信号肽序列,切割位点位于第 20 与 21 个氨基酸之间。

2.5 木聚糖酶和木糖苷酶基因编码蛋白质 NetNGlyc 分析

利用 NetNGlyc-1.0 软件预测蛋白质 N-糖基化位点,内切木聚糖酶 I 蛋白质可能含有 3 个糖基化位点 N^{72} WSN、 N^{95} FSG、 N^{131} PST(图 3A);内切木聚糖酶 II 蛋白质可能只含有 1 个糖基化位点 N^{31} VTE(图 3B); β -木糖苷酶蛋白质则可能含有 8 个糖基化位点 N^{23} QTY、 N^{28} YSS、 N^{143} RTL、 N^{327} QSS、 N^{353} ESF、 N^{404} ISY、 N^{481} STA、 N^{657} TSS(图 3C)。

2.6 酶蛋白 Prosite motif search 分析及 SWISS-Model 三维结构模拟

利用 Prosite motif search 对蛋白质的功能位点进行分析,内切木聚糖酶 I 蛋白质含有 2 个糖基水解酶家族 11 的特征序列: P117LIE120YYIVENF,活性位点为第 120 个氨基酸(谷氨酸, E); V208AVE211GYFSSGSA,活性位点为第 211 个氨基酸(谷氨酸, E);利用 SWISS-Model 预测和模拟该蛋白质的三级结构(图 4A)。参考模板为 T. longibrachiatum 木聚糖酶 2(PDB: 2jic)^[11],且该区域(N-端第 24-224 个氨基酸)两者氨基酸序列相似性

达 100%。

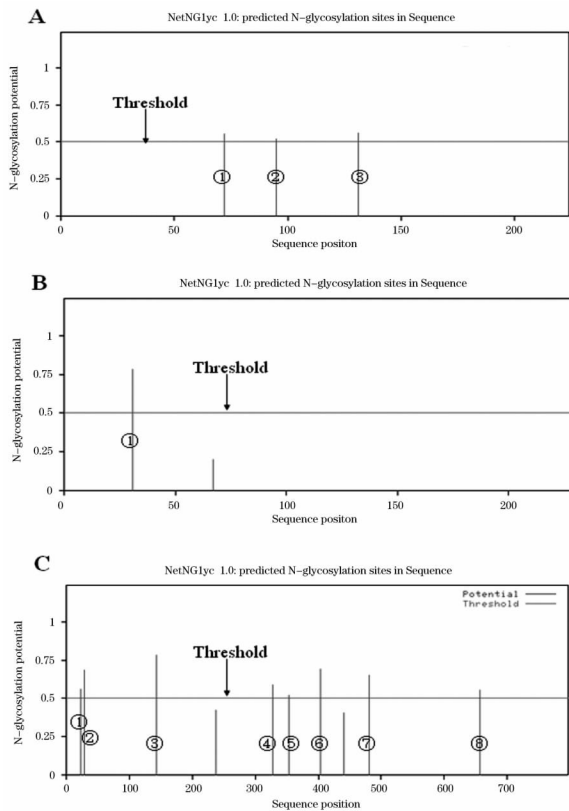
内切木聚糖酶 II 蛋白质含有 2 个糖基水解酶家族 11 的特征序列: P123LVE126YYIME DN,活性位点为第 126 个氨基酸(谷氨酸, E); V212AVE215GWGSGSA,活性位点为第 215 个氨基酸(谷氨酸, E);利用 SWISS-Model 预测和模拟该蛋白三级结构(图 4B)。参考模板为 H. Jecorina 木聚糖酶 I(PDB: 1xyn)^[12],且该区域(N-端第 52-229 个氨基酸)两者氨基酸序列相似性达 98.32%。

β -木糖苷酶蛋白属于糖基水解酶家族 3,利用 Prosite motif search 对蛋白质的功能位点进行搜索,没有找到该蛋白糖基水解酶家族 3 的特征序列。利用 SWISS-Model 预测和模拟该蛋白质三级结构(图 4C)。参考模板为 Kluyveromyces marxianus β -葡萄糖苷酶 I(属于蛋白糖基水解酶家族 3)(PDB: 3abz)^[13],且该区域(N-端第 71-776 个氨基酸)两者氨基酸序列相似性仅有 18.55%。

3 讨论

内切木聚糖酶 β -木糖苷酶是木聚糖水解酶系中最重要的酶,随着基因工程、蛋白质工程等生物技术的发展及应用,人们对木聚糖酶 β -木糖苷酶的研究不断深入^[2]。本研究成功克隆了东方肉座菌 EU7-22 内切木聚糖酶 β -木糖苷酶基因完整序列。xyn I 基因与里氏木霉 xyn1 基因(X69573.1)同源性最高达到 91%; xyn II 基因与绿色木霉 xyn2 基因(EF079061)同源性最高达到 93%; β -bxl 基因与里氏木霉 β -bxl1 基因(Z69257.1)同源性最高达到 94%。

根据 Henrissat 等^[14]的分类标准,木聚糖酶有两个家族,即第 10 族糖苷酶和第 11 族糖苷酶。总的来说,第 10 族的木聚糖酶的结构、理化性质较相似,但第 11 族木聚糖酶在 pI、pH 值、热稳定性及酶分子的结构等方面相差较大。从菌株 EU7-22 中克隆的两个内切木聚糖酶基因编码的蛋白质均属于糖基水解酶家族 11,根据 ProtParam 软件预测内切木聚糖酶的等电点,两者相差较大,内切木聚糖酶 I 的 pI 为 7.87;内切木聚糖酶 II 的 pI 为 4.86。根据 Cantarel 等^[15]的分类标准 β -木糖苷酶有 5 个家族,即第 3、第 39、第 43、第 52 和第 54 族糖基水解酶,但是真菌产生的 β -木糖苷酶大都属于第 3、43、54 族糖基水解酶。从菌株 EU7-22 中克隆的 β -bxl 基因编码的蛋白质属于糖基水解酶家族 3。



注: Threshold = 0.5 为 N 糖基化位点的临界值, 数值超过 0.5 可能为糖基化位点, 数值越高, 引起 N 糖基化的可能性越大。

图 3 东方肉座菌木聚糖酶和木糖苷酶蛋白 N - 糖基化位点分析

Fig. 3 NetNGlyc analysis of xylanases and xylosidase proteins from *H. orientalis*

(A: 内切木聚糖酶 I 蛋白; B: 内切木聚糖酶 II 蛋白;
C: β - 木糖苷酶蛋白)

天然纤维素物质是地球上最丰富的而未被有效利用可再生资源, 高效地将纤维素物质全组份转化为生物燃料对人类目前面临的能源短缺有重要的战略意义。Qing 等^[16-17]在纤维素酶水解纤维素过程中发现木聚寡糖对其具有强烈抑制作用, 在纤维素酶水解预处理玉米秸秆中, 添加木聚糖酶和 β - 木糖苷酶能够显著降低低聚木糖及木聚寡糖对纤维素酶的抑制作用, 从而提高酶解效率。因此, 对半纤维素酶的研究, 不仅可以提高对纤维素生物质组份中半纤维素组份的利用, 而且还可以改善纤维素组份降解和利用效率。

通过对东方肉座菌内切木聚糖酶和 β - 木糖苷酶的基因克隆及其编码蛋白的分析与预测, 为进一步构建具有高催化效力的酶蛋白突变体和高表达工程菌株奠定了基础。

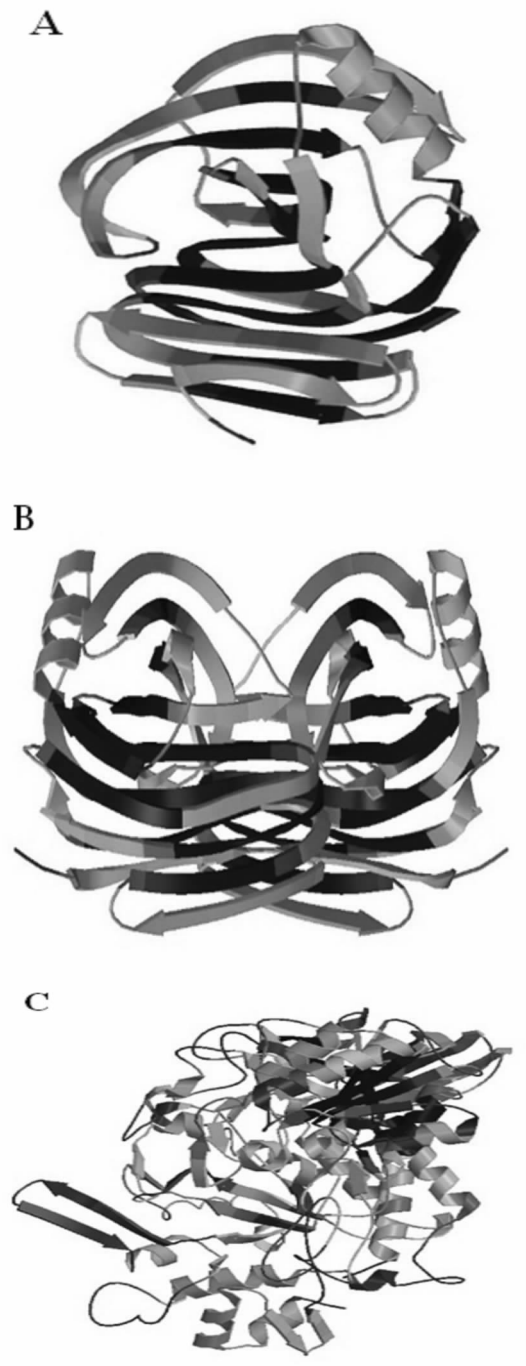


图 4 SWISS - Model 模拟东方肉座菌木聚糖酶和木糖苷酶蛋白质三级结构

Fig. 4 Structure prediction of xylanases and xylosidase proteins from *H. orientalis* by SWISS - Model

(A: 内切木聚糖酶 I 蛋白; B: 内切木聚糖酶 II 蛋白;
C: β - 木糖苷酶蛋白)

参考文献 (References)

[1] Ponte P. I. P., Ferreira L. M. A., Soares M. A. C., Aguiar M. A. N. M., Lemos J. P. C., Mendes I., Fontes C. M. A. Use of cellulases and xylanases to supplement diets containing Alfalfa for broiler chicks: effects on bird performance and skin color [J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2004, 13 (3): 412 - 420.

- [2] Collins T. ,Gerday C. ,Feller G. Xylanases ,xylanase families and extremophilic xylanases [J]. FEMS Microbiology Reviews ,2005 , 29: 3 – 23.
- [3] 王文雅,刘卿,傅晓蕾,袁其朋. 木聚糖降解酶系基因代谢调控研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(6): 143 – 150.
- [4] 怀文辉,何秀萍,郭文杰,张博润. 微生物木聚糖酶降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报,2000,27(2): 137 – 139.
- [5] 汪天虹. 分子生物学实验[M]. 北京: 北京大学出版社,2009, 21 – 22.
- [6] Wilkins M. R. ,Gasteiger E. ,Bairoch A. ,Sanchez J. C. ,Williams K. L. ,Appel R. D. ,Hochstrasser D. F. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server[J]. Methods in Molecular Biology ,1999 ,112: 531 – 552.
- [7] Petersen T. N. ,Brunak S. ,Heijne G. ,Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods ,2011 ,8: 785 – 786.
- [8] Gupta R. ,Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function[J]. Pacific Symposium on Biocomputing ,2002 ,7: 310 – 322.
- [9] Sigrist C. J. A. ,Cerutti L ,de Castro E. ,Langendijk – Genevaux P. S. ,Bulliard V. ,Bairoch A. ,Hulo N. PROSITE , a protein domain database for functional characterization and annotation[J]. Nucleic Acids Research ,2010 ,38: 161 – 166.
- [10] Arnold K. ,Bordoli L. ,Kopp J. ,Schwede T. The SWISS – MODEL Workspace: A web – based environment for protein structure homology modeling [J]. Bioinformatics ,2006 ,22: 195 – 201.
- [11] Moukhametzianov R. ,Burghammer M. ,Edwards P. C. ,Petitdemange S. ,Popov D. ,Fransen M. ,McMullan G. ,Schertler G. F. X. ,Riek C. Protein crystallography with a micrometre – sized synchrotron – radiation beam [J]. Acta Crystallographica D Biological Crystallography ,2008 ,64: 158 – 166.
- [12] Torronen A. ,Rouvinen J. Structural Comparison of Two Major endo – 1,4 – Xylanases from *Trichoderma reesei*[J]. Biochemistry ,1995 ,34: 847 – 856.
- [13] Yoshida E. ,Hidaka M. ,Fushinobu S. ,Koyanagi T. ,Minami H. ,Tamaki H. ,Kitaoka M. ,Katayama T. ,Kumagai H. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β – glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biochemical Journal ,2010 ,431(1): 39 – 49.
- [14] Henrissat B. ,Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities [J]. Biochemical Journal ,1993 ,293: 781 – 788.
- [15] Cantarel B. L. ,Coutinho P. M. ,Rancurel C. ,Bernard T. ,Lombard V. ,Henrissat B. The Carbohydrate – Active Enzymes database(CAZy) : an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research ,2009 ,37: 233 – 238.
- [16] Qing Q. ,Yang B. ,Wyman C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes[J]. Bioresource Technology ,2010 ,101: 9624 – 9630.
- [17] Qing Q. ,Wyman C. E. Supplementation with xylanase and xylosidase to reduce xylo – oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover[J]. Biotechnology for Biofuels ,2011 ,4: 1 – 18.