

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0088 - 06

以基因重组技术开发木聚糖类半纤维素资源

邵蔚蓝, 薛业敏

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 木聚糖类半纤维素是一类取之不尽而又亟待开发利用的碳水化合物, 经生物降解后所产生的木糖和少量其它单糖, 可以用作基本碳源生产各种发酵产品, 包括有机酸、氨基酸、单细胞蛋白、糖醇、工业酶类、溶剂或燃料醇。有关半纤维素酶及其基因的研究已经积累了很多资料, 其中包括木聚糖酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、葡萄糖醛酸酶、木聚糖乙酰酯酶以及它们的基因。通过基因重组技术可以使发酵工程菌获得降解半纤维素的能力, 或者把能有效降解半纤维素的微生物构建成发酵工程菌, 从而把半纤维素转化为所需求的生物工程产品。

关键词: 可再生资源; 半纤维素酶; 基因重组技术; 发酵工程菌

中图分类号: Q 343.1

文献标识码: A

Molecular Biotechnology in Exploiting the Resource of Hemicellulose

SHAO Wei-lan, XUE Ye-min

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Hemicellulose is a kind of very abundant carbohydrate, which is not yet exploited. Xylose is the main sugar produced from biodegradation of hemicellulose, and can be used as carbon source for fermentation of organic acids, amino acids, single cell protein, alditols, enzymes, or fuels and solvents. Hemicellulases including xylanase, xylosidase, arabinosidase, glucuronidase, and acetylxytan esterase have been well characterized, and many genes encoding these enzymes have been cloned and analyzed. It is time to construct strains of recombinant genes, which can degrade hemicellulose and convert xylose to desired industrial products.

Key words: hemicellulose; hemicellulases; recombinant genes; fermentation

随着人口的不断增长和资源的进一步消耗, 可再生资源的开发利用已经成为人们共同关注的问题。在植物的光合产物中, 半纤维素是仅次于淀粉和纤维素的一大类碳水化合物, 如秸秆中半纤维素的含量占其干重的 25% ~ 50%^[8]。除了其数量之大, 半纤维素成为可再生资源的另一个因素是它比植物中的其它组分更易于提取和水解^[6, 21]。如果人们能够使纤维素和半纤维素得到充分降解和有效

转化, 2 kg 秸秆就可以充当 0.5 kg 粮食了, 见表 1。纤维素的结构及其降解过程相对简单一些, 因此, 半纤维素开发利用成为关键问题, 它的解决对人类有不可估量的效益。

收稿日期: 2001 - 10 - 25; 修订日期: 2001 - 12 - 10。

作者简介: 邵蔚蓝 (1958 -) 女, 江苏盐城人, 美国博士, 教授, 博士生导师。

万方数据

表 1 不同植物中木质纤维的成分比较

Tab.1 Percentage composition of lighocellulose in vascular plants

类别	成分/%		
	纤维素	半纤维素	木质素
禾本科植物	25 ~ 40	25 ~ 50	10 ~ 30
软木	45 ~ 50	25 ~ 35	25 ~ 35
硬木	45 ~ 55	24 ~ 40	18 ~ 25

1 研究进展和策略

我国科学家对于半纤维素酶在食品加工、低聚糖制备、饲料加工、溶解纸浆以及纸浆漂白等方面的应用已经展开了研究并取得了可观的进展^[1~5],而对于半纤维素的开发利用,人们的认识往往局限于从半纤维素发酵生产乙醇.半纤维素发酵生产乙醇是一个很复杂的过程,要解决的难题包括发酵菌株降解半纤维素的能力、代谢戊糖的能力,以及对乙醇的耐受力等;我国粮食生产面积大、储备多、价格低,因此很少介入这种研究.在国外,10 多年前发生的一次石油危机引起发达国家对从半纤维素发酵生产乙醇展开研究,此后,科学家们经过努力,对半纤维素的种类、结构、性质有了明确的认识,鉴定、克隆了各种半纤维素酶,研究了多种能分解利用半纤维素的微生物,并对一些微生物进行了代谢工程方面的研究.

半纤维素包括很多种杂多糖:葡聚糖、木聚糖、甘露聚糖、半乳糖聚糖、聚半乳糖醛酸等^[21];它们分别

出现于不同的植物或同一植物的不同组织中.中国是一个农业大国,最多的、成为环保负担的是大量的秸秆.而秸秆半纤维素的 90% 以上是木聚糖,这正是结构单一、易于水解,而且取之不尽的可再生资源.秸秆中的半纤维素的化学结构如图 1 所示^[20].一条以 β -1,4 糖苷键相联的木聚糖主链,上面带有 1,3-阿拉伯糖或 1,2-葡萄糖醛酸构成的侧枝,被称为阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖(Arabinoglucuronoxylan).其中 α -4-O-Me-GlcA 为 4-甲基葡萄糖醛酸, α -Araf 为阿拉伯呋喃糖.它的聚合度(DP_n)约为 70(残基数),木糖与阿拉伯糖、葡萄糖醛酸的摩尔比约为 8:1:1^[21].它的彻底降解需要 3 ~ 4 种酶参与:木聚糖酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶和葡萄糖醛酸酶,有的木糖苷酶同时也是阿拉伯糖苷酶^[15].这种半纤维素的分解产物主要是木糖和少量阿拉伯糖、葡萄糖醛酸,可以用作基本碳源生产各种发酵产品,包括有机酸、氨基酸、单细胞蛋白、糖醇、工业酶类、溶剂或燃料醇^[6,21].

显然,开展这项研究首先要避繁就简,从近到远,也就是选择分布最广,产生量最大,结构较单一的半纤维素为开发目标,选择较易获得的转化产物如单细胞蛋白、工业酶等为生产对象;通过基因重组技术使发酵工程菌获得降解半纤维素的能力,或者把能有效降解半纤维素的微生物构建成发酵工程菌.大多数半纤维素酶在国内未见研究,国际期刊上发表的有关酶类及其基因的文献对于基因工程或代谢工程等研究工作极为重要.

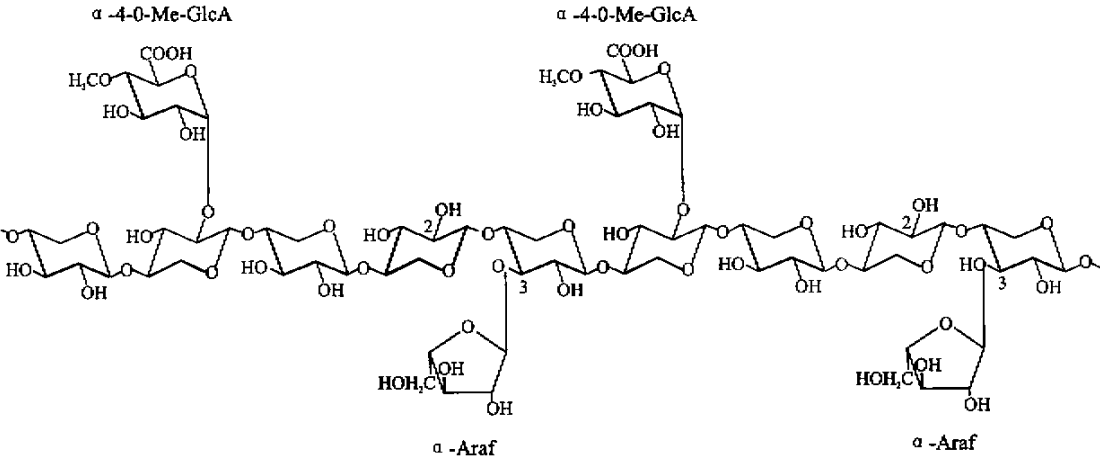


图 1 草本植物和针叶树木中半纤维素的主要成分——阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖的结构示意图

Fig.1 Composition of arabino-4-O-methylglucuronoxylan in grass and softwood

2 半纤维素酶基因的选择

2.1 β -1,4-木聚糖内切酶

β -1,4-木聚糖内切酶(1,4- β -木聚糖木糖水解酶

EC3.2.1.8),简称木聚糖酶,水解木聚糖主干链内部的 1,4-糖苷键,多数作用于木聚糖的无侧枝区段,产生低聚糖或带有侧枝的寡聚糖.木聚糖是半纤维素酶的主要部分,因此,木聚糖酶是最重要,也

是研究得最多的一种半纤维素酶.木聚糖酶一般为胞外酶,被分泌到周围环境或培养液中,但也有另一种机制使酶汇集于细胞表面而不离散^[10,17].木聚糖酶分布很广,许多微生物拥有2~3个不同的酶.已有上百个编码木聚糖酶的基因被克隆和超量表达^[4].基因结构和功能分析显示,酶分子上有催化结构域,其活性中心的氨基酸序列具有高度保守性.根据其保守序列它们分别属于第十、十一家族.同一家族的酶可能起源于共同的祖先,其基因可能在真菌和细菌之间有迁移.除催化结构域以外,许多木聚糖酶还可能具有纤维素结合结构域或热稳定结构域^[9].木聚糖酶基因资料的大量积累为基因工程或代谢工程菌的构建提供了方便,人们可以根据具体情况选择特定的基因来编码具有特性的酶.

在酶的众多生物学、动力学性状中,很重要的性状之一是它的热稳定性,因为如果不需要终止催化反应,酶的半衰期长就意味着效率高.因此,许多嗜热菌被用作研究材料,人们也得到了很多种具有热稳定性的木聚糖酶.例如嗜热厌氧细菌 *Clostridium stercorarium* 的木聚糖酶,最适温度为70~80℃,其半衰期为90 min;从极端嗜热厌氧细菌 *Thermotoma* sp 克隆的木聚糖酶在95℃,半衰期长达90 min^[21].而嗜热真菌 *Thermascus aurantiacus* 产生的木聚糖酶在70℃下24 h活性稳定,80℃下半衰期为90 min^[22].

木聚糖酶是第一个成为工业用商品酶的半纤维素酶,如果以它为半纤维素发酵的目标产物,人们可能需要的是不具有纤维素酶活性的碱性木聚糖酶,因为它被用来进行纸浆预漂白^[5].碱性木聚糖酶的基因主要来自嗜碱微生物,如 *Bacillus* spp 和 *Aeromonas* sp,从这些菌分离纯化的木聚糖酶的最适pH在6.0~10.0.来自 *Aspergillus fischeri* 的碱性木聚糖酶在pH值为9.0时有较强的稳定性,来自 *Cephalosporium* sp 的木聚糖酶是唯一被报道在pH 6.6~9.0较宽范围有活性的嗜碱真菌所产生的,而嗜碱嗜热的 *Bacillus* sp (NCIM 59)在50℃、pH 10的环境中产生两种类型的无纤维素酶活性的木聚糖酶^[9].国内外学者对木聚糖酶已经作了很好的综述^[1-5,9],这里就不再赘叙.

2.2 β-D-木糖苷酶

β-D-木糖苷酶(EC.3.2.1.37)为外切酶,通过从非还原性末端水解低聚木糖和木二糖产生木糖,并能够水解对-硝基苯-β-D-木糖基(PNPX)等人工底物.它是木聚糖类半纤维素酶彻底降解的关键酶之一,因为除了低聚木糖,其它所有发酵产物都必须

通过单糖转化而产生.木糖苷酶存在于细菌和真菌中,相对分子质量在60 000~360 000之间,通常是胞内蛋白.如在酵母 *Cryptococcus albidus* 中,木二糖和木三糖是通过β-木糖苷渗透酶的运输系统进入细胞,再由木糖苷酶进一步分解为木糖.许多木糖苷酶已经被纯化和定性^[20],但是克隆和分析过的木糖苷酶基因并不很多,见表2.

表 2 已被克隆的木聚糖脱分枝酶基因及其来源

Tab.2 Genes of debranch enzymes involved in xylan degradation

微生物种名	基因资料已发表的酶			
	木糖苷酶	阿拉伯糖苷酶	葡萄糖醛酸酶	木糖乙酐酯酶
<i>Aeromonas caviae</i> ME-1	+			
<i>Bacillus pumilus</i>	+			+
<i>B. stearothermophilus</i>	+		+	
<i>Bacteroides ovatus</i>		+		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+			(+)
<i>Clostridium stercorarium</i>	+	+		
<i>Cytophaga xylanolytica</i>		++		
<i>Erwinia chrysanthemi</i> D1	+			
<i>Pseudomonas cellulosa</i>		+		
<i>Streptomyces chartreusis</i>		++		
<i>S. lividans</i>		+		+
<i>S. thermophilaceus</i> OPC-250	+			+
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	+	+		
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	+++			
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+		
<i>A. niger</i>	+	+		+
<i>A. tubingensis</i>		+	+	
<i>Neocallimastix patriciarum</i>				+
<i>Orpinomyces</i> sp				+
<i>Penicillium purpurogenum</i>				+
<i>Trichoderma reesei</i>	+	+	+	+

注:1个+代表1个基因,+++表示在同一种菌中有3个不同的基因同时存在并已被克隆.

通常细菌或真菌中只有一种木糖苷酶,但是研究发现嗜热厌氧细菌 *Thermoanaerobacterium* sp JW/SY485 中有3种不同的酶,其动力学性质各不相同:其中一个酶对底物有很高的亲和性,但总活力并不高;而另一个酶在底物浓度高时具有极高的活性,而与底物的亲和性并不很高.据此推测,这种细

菌在碳源物质稀少时通过高亲和性的酶,在碳源物质丰盛时通过极高活性的酶达到最高效率地吸收和应用底物.因此在选用基因材料时不仅要考虑酶的热稳定性,还要考虑酶的动力学性质.

有些木糖苷酶如来自细菌 *Butyrivibrio fibrisolvens* 和 *Clostridium stercorarium* 的木糖苷酶同时具有阿拉伯糖苷酶的活性,但是真正具有双重活性的酶应数来自嗜热厌氧细菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的木糖/阿拉伯糖苷酶.10多年前美国 Wiegel 研究小组在试图构建一个从半纤维素发酵生产乙醇的基因工程菌时发现了这个酶,以人工底物测试,其木糖苷酶活性和阿拉伯糖苷酶活性分别为每毫克蛋白质 180 和 1 000 IU,远高于其它木糖苷酶或阿拉伯糖苷酶所显示的活性^[15].这个酶的基因已经被克隆并在大肠杆菌中得到表达,它与一个未发现有第二种活性的木糖苷酶有同源性和进化关系,但与其它木糖苷酶都没有明显的同源性^[12],因此当需要同时得到木糖苷酶或阿拉伯糖苷酶时,这个基因应为首选.

2.3 α -L-阿拉伯糖苷酶

α -L-阿拉伯糖苷酶(EC.3.2.1.55)水解非还原末端的阿拉伯糖残基,也水解对-硝基苯- α -L-阿拉伯糖基等人工底物.据报道 *A niger*, *B subtilis* 和 *Streptomyces purpurascens* 中的 α -L-阿拉伯糖苷酶能够水解阿拉伯木聚糖中的 1,3-和 1,5- α -L-阿拉伯糖苷键. *A niger* 的阿拉伯糖苷酶能够水解小的人造底物和阿拉伯聚糖,并能水解阿拉伯聚糖、阿拉伯半乳聚糖和阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖的阿拉伯糖侧枝,该酶首先作用于阿拉伯聚糖中的 α -L-1,3 连接的阿拉伯糖基,程度达 30%,然后缓慢作用 α -L-1,5-阿拉伯聚糖,直到完全转化成阿拉伯糖.来自 *S purpuracens* 的阿拉伯糖苷酶 B 只作用低相对分子质量的 α -L-阿拉伯糖苷和含阿拉伯糖的低聚糖.而从 *A awamori* 中纯化得到的阿拉伯糖苷酶对阿拉伯木聚糖具有高度专一性,从阿拉伯木聚糖只释放阿拉伯糖.阿拉伯糖苷酶和木聚糖酶之间存在着协同作用,当两个酶同时作用时,可以观察到木糖、木二糖和阿拉伯糖的产生增多^[20];同时,水解低聚木糖上的阿拉伯糖侧枝也是木糖苷酶有效地、彻底地降解低聚木糖的前提,因此,阿拉伯糖苷酶在秸秆半纤维素降解中起着重要的作用.

阿拉伯糖苷酶有胞内、胞外酶,也有的是膜蛋白,其相对分子质量可达到 495 000,以单体、二体、四聚、六聚和八聚体的形式存在.几个编码阿拉伯糖苷酶的基因(见表 2)已经从 *B fibrisolvens* (xylB),

S lividans (abfA), *C stercorarium* (arfA) 和 *Pseudomonas fluorescens* (xynC) 等细菌中克隆^[13].源自真菌的阿拉伯糖苷酶的基因也从 *A niger* 和 *T reesei* 中克隆出来. J M Crons 等人成功克隆了 *A niger* MRC11624 中的阿拉伯糖苷酶 abfB 基因,并使它在 *S cerevisiae* 中得到表达,命名为 ABF2. ABF2 有 499 个氨基酸,与 *A niger* N400B 中的阿拉伯糖苷酶 B 有 94% 相同,用随机选择的重组体 *S cerevisiae* 菌株分别在合成和复合培养基中培养 48 h,获得阿拉伯糖苷酶最大活性 0.02 U/mL 和 1.40 U/mL^[7].来自 *T reesei* 的阿拉伯糖苷酶是通过在 *S. cerevisiae* 中建立的 cDNA 表达文库筛选得到的,对重组酵母产生的酶进行不同底物的产酶活性试验,该重组酶能作用于 P-硝基苯- α -L-阿拉伯呋喃糖苷(PNPA)和阿拉伯木聚糖释放 L-阿拉伯糖,与从 *T reesei* 纯化的相应的酶相似^[13].

2.4 α -葡萄糖醛酸酶

α -葡萄糖醛酸酶(EC.3.2.1.)水解甲基葡萄糖醛酸(4-O-MeGlcA)与木聚糖主干上木糖残基间的 α -1,2 键.硬木(阔叶树)中的半纤维素的主要种类是乙酰葡萄糖醛酸木聚糖,软木(针叶树)和秸秆中的木聚糖主要是阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖,木聚糖中的葡萄糖醛酸通常被甲基化成为 4-O-MeGlcA.在这些木聚糖的降解过程中葡萄糖醛酸酶与木聚糖酶相互促进,加速低聚糖的产生,但是低聚糖需经葡萄糖醛酸酶去除 4-O-MeGlcA 侧枝后才能被木糖苷酶彻底降解,因此,葡萄糖醛酸酶是半纤维素酶中很重要的一员.由于葡萄糖醛酸酶在自然界出现不多,而且活性不高,此酶直到 1986 年才见报道.迄今为止,只有少数几个酶得到了纯化和定性^[20],经过基因克隆和分析的就更少了.

α -葡萄糖醛酸酶首先从嗜热真菌 *T aurantiaus* 中得到纯化,该酶能以相同的速度从聚合木聚糖和低聚糖释放 4-O-MeGlcA.第一个从细菌中纯化的是嗜热厌氧细菌 *Thermoanaerobacterium* sp. JW/SY485 中的葡萄糖醛酸酶,该酶存在于细胞内,对于低聚木糖上的葡萄糖醛酸侧枝有较高的活性,这个酶与纯化的同源木糖苷酶协同作用于带有 4-O-MeGlcA 侧枝的低聚木糖,使之得到迅速彻底的降解^[18].细菌 *S olivobromogens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Fibrobacter succinogens*, *Thermotoga maritima* 的胞内酶也得到了鉴定.虽然在丝状真菌中多为胞外酶,大多数 α -葡萄糖醛酸酶只能作用于 4-O-MeGlcA 取代的低聚糖或小型底物.因此,大部分 α -葡萄糖醛酸酶需要同水解主链的木聚糖酶协同作用以便从木

聚糖释放出相当量的 4-O-甲基葡萄糖醛酸. 编码葡萄糖醛酸酶的基因已经从 *B. stercorarius*, *T. maritima*, *T. reesei*, *A. tubingensis* 中克隆出来(见表 2), 由氨基酸序列分析, *T. reesei* 的 *glr1*, *T. maritima* 的 *aguA* 和 *A. tubingensis* 的 *aguA* 相互间具有明显的同源性, 属于糖基水解酶家族第 67 族.

2.5 木聚糖乙酰酯酶

木聚糖乙酰酯酶(EC. 3. 1. 1. 6)能去除乙酰木聚糖木糖残基上 C_2 和 C_3 的 O-乙酰取代基. 来自硬木(阔叶树)的乙酰葡萄糖醛酸木聚糖是高度乙酰化的, 其中木糖残基与乙酰基的数量比约为 10:7; 这种木聚糖在发酵条件下的有效分解, 需要乙酰酯酶的参与. 木聚糖乙酰酯酶于 1985 年首见报道, 较迟发现的主要原因是缺乏适宜的底物. 尽管自然条件下, 木聚糖是高度乙酰化的, 但用于研究木聚糖降解酶系统的木聚糖大部分是以稀碱抽提的, 因而是脱乙酰的木聚糖. 木聚糖乙酰酯酶被认为是许多像 *T. reesei*, *T. viride*, *A. niger*, *S. commune*, *Streptomyces sp* 和 *F. succinogenes* 这样的微生物中木聚糖降解酶系统的一部分. 迄今为止, 被纯化和定性的木聚糖乙酰酯酶很少. *T. reesei* 产生两个被糖基化的相对分子质量为 34 000 的单体同工酶, 该乙酰木聚糖酯酶从乙酰低聚木糖释放乙酸. 来自 *Thermoanaerobacterium sp* JW/ST-YS485 的乙酰木聚糖酯酶 I 和 II 具有相对分子质量 195 000 和 106 000, 并分别具有 32 000 和 26 000 的亚单位, 它们能使乙酰化的木聚糖脱乙酰. 据推测, 乙酰木聚糖酯酶 II 在胞外去除木聚糖的乙酰基, 乙酰木聚糖酯酶 I 在胞内作用于短链的乙酰化低聚木糖^[16]. 来自 *S. commune* 的木聚糖乙酰酯酶从木聚糖释放乙酸, 但乙酰低聚木糖是更适宜的底物, 木聚糖主链上的乙酰基因位阻效应抑制木聚糖酶作用. 来自 *F. succinogenes* 的乙酰木聚糖酯酶通过使木聚糖释放乙酸而在减少这种抑制作用方面起重要作用. 编码木聚糖乙酰酯酶的基因已经从一些细菌和真菌克隆出来, 并进行了序列分析(见表 2), 其中有来自 *Thermoanaerobacterium sp* 和

T. maritima 的基因编码热稳定性木聚糖乙酰酯酶^[11, 14].

3 发酵工程菌的基因构建

木聚糖类半纤维素在自然界大量存在, 它被降解成单糖后, 不仅可以用作乙醇发酵原料, 还可以用来生产各种更易获得的生物制品如单细胞蛋白、木聚糖酶等. 用分子生物学技术构建能分解利用半纤维素的发酵工程菌有两条基本途径:

1) 用编码半纤维素酶的基因转化现有的发酵工程菌, 使它们获得所需要的酶类;

2) 把能够分解利用半纤维素的自然菌株构建成能够大量积累目标产品的发酵工程菌.

许多发酵工程菌如芽孢杆菌、啤酒酵母和常用霉菌都能以木糖为生长基质, 但它们多数不具备完善的酶系统进行半纤维素的分解, 因而需要根据所要利用的半纤维素的种类选择必要的基因进行转化并使它们得到表达. 自然界也有一些微生物能够直接利用半纤维素进行生长, 酶学分析或基因分析结果表明, 它们具有完善的半纤维素酶系统. 这些微生物包括一些放线菌、瘤胃细菌和真菌、嗜热细菌或真菌、树木致病菌和食用真菌等, 如 *B. stercorarius*, *T. saccharolyticum*, *T. maritima*, *A. niger*, *T. reesei* 等. 其中, *T. saccharolyticum* 只拥有半纤维素酶系统, 不能分解利用纤维素, 因此应用作基因供体提供热稳定性酶, 不宜用来构建发酵工程菌; *T. reesei* 是树木致病菌, 用来构建发酵工程菌时应注意病原控制. 值得注意的是基因组研究已经完成的极端高温菌 *T. maritima* 能够分解淀粉、纤维素、半纤维素等多种多聚糖, 是代谢工程的理解材料; *A. niger* 亦已被构建成基因表达系统, 用于某些工业酶的基因表达. 除此以外, 具有更高实用价值的酶系统和基因表达系统正在研制之中, 有望在近期取得突破性进展.

参考文献:

- [1] 怀文辉, 何秀萍, 郭文洁等. 微生物木聚糖降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2000, 27(2): 137-139.
- [2] 刘同军, 张玉臻. 半纤维素酶的应用进展[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(6): 58-61.
- [3] 刘稳, 高培基. 半纤维素酶的分子生物学[J]. 纤维素科学与技术, 1998, 6(1): 9-15.
- [4] 刘相梅, 祁蒙, 曲音波. 木聚糖酶基因克隆, 表达与分泌及定点诱变研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 28-31.
- [5] 曲音波, 高培基, 陈嘉川. 制浆造纸用木聚糖酶的研究进展[J]. 生物工程进展, 1998, 18(6): 36-39.
- [6] BLAZER A, BILLY P. In Wood and Cellulose[M]. Chichester: Willis Horwood Limited, 1987.

- [7] CROUS J M , PRETORIUS I S , VAN ZYL W H. Cloning and expression of the α - L - arabinosidase gene (ABF2) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1996 , 46 : 256 - 260 .
- [8] GLAZER A N , NIKAIIDO H. Microbial Biotechnology [M]. New York : Freeman Company , 1995 .
- [9] KULKARNI N , SHENDYE A , RAO M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases [J]. **FEMS Microbiol Reviews** , 1999 , 23 : 411 - 456 .
- [10] LIU S Y , GHERARDINI F C , MATUSCKEK M , *et al.* Cloning , sequencing , and expression of the gene encoding a large S-layer-associated endoxylanase [J]. **J Bacteriol** , 1996 , 178 : 1539 - 1547 .
- [11] LORENZ W W , WIEGEL J. Isolation , analysis , and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp Strain JW/SL - YS485 [J]. **J bacteriol** , 1997 , 179 : 5436 - 5441 .
- [12] MAI V , WIEGEL J , LORENZ W W. Cloning , sequencing , and characterization of the bifunction of the bifunctional xylosidase - arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. **Gene** , 2000 , 247 : 137 - 143 .
- [13] MARGOLLES - CLARK , TENKANEN E M , NAKARI - SETALA T , *et al.* Cloning of genes encoding α - L - arabinofuranosidase and β - xylosidase from *Trichoderma reesei* [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1996 , 62 : 3840 - 3846 .
- [14] NELSON K E , CLAYTON R A , GILL S R , *et al.* Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* [J]. **Nature** , 1999 , 399 : 323 - 329 .
- [15] SHAO W , WIEGEL J. Purification and characterization of a thermostable β - xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. **J Bacteriol** , 1992 , 174 : 5848 - 5853 .
- [16] SHAO W , WIEGEL J. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp Strain JW/SL - YS485 [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1995 , 61 : 729 - 733 .
- [17] 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 Environ Microbiol** , 1995 , 61 : 937 - 940 .
- [18] SHAO W , OBI S K C , PULS J , *et al.* Purification and characterization of the α - glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL - YS485 , an important enzyme for the utilization of substituted xyans [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1995 , 61 : 1077 - 1081 .
- [19] SIMPSON H D , HAUFLER U R , DANIEL R M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga* [J]. **Biochem J** , 1991 , 277 : 413 - 417 .
- [20] SUNNA A , AUTRANIKIAN G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria [J]. **Critical Reviews in Biotechnology** , 1997 , 17 (1) : 39 - 67 .
- [21] THOMPSON N S. In Wood and Agricultural Residues [M]. New York : Academic Press , 1983 . 101 - 147 .
- [22] YU E K C , TAN L U L , CHAN M H K , *et al.* Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus , *Thermoascus aurantiacus* [J]. **Enzyme Microb Technol** , 1987 , 9 : 16 - 25 .

(责任编辑 李春丽 朱 明)