

木聚糖酶 XYNB 分子中折叠股 B1 和 B2 间的疏水作用对酶热稳定性的影响

Hydrophobic Interaction between β -sheet B1 and B2 in Xylanase XYNB Influencing the Enzyme Thermostability

杨浩萌¹, 姚 斌^{1*}, 罗会颖¹, 张王照¹, 王亚茹¹, 袁铁铮¹, 柏映国¹, 伍宁丰², 范云六²
YANG Hao-Meng¹, YAO Bin¹, LUO Hui-Ying¹, ZHANG Wang-Zhao¹, WANG Ya-Ru¹, YUAN Tie-Zheng¹, BAI Ying-Guo¹, WU Ning-Feng² and FAN Yun-Liu²

1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 对来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的高比活木聚糖酶 XYNB 进行同源建模, 并结合嗜热木聚糖酶氮末端芳香族氨基酸疏水作用的结构分析, 设计了 XYNB 的 T11Y 定点突变, 观察 XYNB 分子中折叠股 B1 和 B2 的疏水作用对酶的热稳定性的影响。将突变酶 XYNB' 在毕赤酵母中表达, 表达的 XYNB' 经纯化后与原酶 XYNB (同样经毕赤酵母表达后纯化) 进行酶学性质比较, 结果表明, XYNB' 的耐热性比 XYNB 有明显的提高, 但最适温度与原酶一样为 60℃。另外, XYNB' 的最适 pH、 K_m 值及比活性均有一定的改变。实验证实了木聚糖酶 XYNB 的氮端芳香族氨基酸之间的疏水相互作用与其热稳定性相关, 为进一步的结构与功能研究提供了优良的基因材料。

关键词 木聚糖酶 XYNB, 定点突变, 热稳定性

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0414-06

Abstract A homology modeling of xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 was made by Swiss-Model. The hydrophobic interaction between β -sheet B₁ and B₂ in the tertiary structure model of XYNB was compared with other thermophilic xylanase. A T11Y mutation was introduced in XYNB by site-directed mutagenesis to improve the thermostability of the enzyme. The XYNB and mutant xylanase (XYNB') expressed in *Pichia pastoris* were purified and their enzymatic properties were determined. The result revealed that the thermostability of XYNB' was obviously higher than that of XYNB. The optimal temperature of XYNB' for its activity was 60℃, similar to XYNB. But, compare to XYNB, the optimal pH value, the K_m value and the specific activity of XYNB' had also been changed. The research results suggested that the aromatic interaction between β -sheet B₁ and B₂ in xylanase should increase enzyme thermostability. The mutant xylanase XYNB' is a good material for further research in the relationship between structure and function of xylanase.

Key words xylanase XYNB, site-directed mutagenesis, thermostability

Received: December 7, 2004; Accepted: March 2, 2005.

This work was supported by Grant from Chinese National Programs for High Technology Research and Development (863 Program) (No. 2003AA214030) and Chinese Key International S&T Cooperation Projects (No. 2004DFA06800).

* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

国家高技术研究与发展计划 (863 计划) 项目 (No. 2003AA214030) 和国际科技合作重点项目 (No. 2004DFA06800) 资助。

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的复合酶系。内切 β -1,4-木聚糖酶以内切方式水解木聚糖分子中的 β -1,4 糖苷键,是一类重要的半纤维素酶^[1]。木聚糖酶在造纸、饲料、食品等行业和环境科学上都有着广泛的应用前景^[2]。目前对木聚糖酶的结构与功能进行了较多的研究,在分子水平上对与各种酶学性质相关的结构有了一定的了解。影响木聚糖酶热稳定性的因素很多,主要有以下几点:第一,现已发现有 22 种木聚糖酶含有热稳定区,其中 16 种的热稳定区在酶的氮末端^[3]。第二,盐桥结构和二硫键对木聚糖酶的热稳定性有一定的作用,它们通过静电吸引和共价键的作用使酶的结构更加紧密,从而提高酶的稳定性^[4]。第三,某些木聚糖酶的稳定性与其表面的精氨酸和脯氨酸的含量有关。对于嗜热蛋白,一般来说,蛋白表面都有较高的精氨酸含量,其原因可能是精氨酸的胍基基团与其附近的极性基团有很强的相互作用^[5]。耐热性的蛋白中脯氨酸的含量比耐中温蛋白高 40% ~ 50%^[6]。第四,芳香族氨基酸等通过疏水键的相互作用提高酶的疏水性、增强酶和底物的结合作用,从而提高酶的热稳定性^[7]。

来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 是一种具有优良性质的高比活木聚糖酶,其基因是本实验室克隆的新基因^[8]。本文对木聚糖酶 XYNB 进行分子建模、突变位点的设计并证明了其分子内部的疏水作用与其热稳定性相关的结果。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

木聚糖酶基因 *xynB* (EMBL 收录号为: AJ292317)由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆^[8];大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Jm109 和 BL21 (DE3)、克隆质粒 pUC19 和表达质粒 pET22b(+)均由本实验室保存。巴斯德毕赤氏酵母 GS115、载体 pPIC9a 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 培养基

大肠杆菌培养基 LB,毕赤酵母培养基 YPD、MM、MD、BMGY 和 BMMY 的配制方法见参考文献[9]。

1.3 工具酶和生化试剂

限制酶 *Kpn* I、*Eco* R I、*Sma* I、*Nco* I、*Hind* III 和 *Bgl* II 及 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品;可溶性木聚糖 4-O-Me-D-

glucurono-D-xylan(From Birchwood)购自 Sigma 公司;其它化学试剂为国产分析纯。

1.4 方法

1.4.1 定点突变:设计的 PCR 引物如下:

(1)Z9: 5'-TA GAATTC G CCATGG CCACGGT CATCACCACCAACCAGACCGGCTACAACAACGGGTT C-3'(含 *Eco* R I 及 *Nco* I 的酶切位点)

(2)Z10: 5'-TA GGTACC TCAGCCGCTGACCGT GATGTT-3'(含 *Kpn* I 的酶切位点)

其中 Z9 是突变引物,带有下列划线的部分为突变的核苷酸。经过对 XYNB 及其它嗜热木聚糖酶结构与功能的分析,确定突变位点 T11Y,设计突变引物,通过 PCR 的方法进行定点突变,以获得突变基因 *xynB'*。通过 *Kpn* I 和 *Eco* R I 双酶切位点将 *xynB'* 克隆进了 pUC19 载体,电转化大肠杆菌 JM109 以蓝白斑筛选出重组菌落,提取重组质粒 pUC19-*xynB'* 进行序列测定。

1.4.2 重组表达载体的构建:

(1) pET22b(+)-*xynB'* 表达载体

通过 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切位点将突变酶基因 *xynB'* 克隆进了 pET22b(+)载体电转化大肠杆菌 BL21,重组质粒进行酶切鉴定。

(2) pPIC9a-*xynB'* 表达载体

将重组质粒 pUC19-*xynB'* 用 *Eco* R I 和 *Sma* I 进行双酶切,回收 *xynB'* 基因,定向插入到 pPIC9a 上的 *Eco* R I 和 *Sma* I 位点之间,形成重组质粒 pPIC9a-*xynB'* 从而将目的基因克隆到 AOX1 启动子下游,而且与信号肽编码序列形成正确的阅读框架。

1.5 重组木聚糖酶的表达及纯化

1.5.1 大肠杆菌中的诱导表达:将过夜活化的菌种以 1/100 的接种量转接入 5mL LB 培养基中(加 Amp 至终浓度 0.1mg/mL),37℃ 摇菌 3h,使 OD_{600} 的值达到 0.6 ~ 0.7,加入 IPTG 至终浓度 0.1mmol/L,28℃ 150r/min 诱导 3 ~ 4h,将菌体离心沉淀,并用 pH5.2 的柠檬酸缓冲液洗涤,以 600 μ L 该缓冲液悬浮菌体。在冰浴中以 100Hz 频率超声波击打细胞,每次 6s,间隔 20s,击打至菌液透明,离心,对细胞裂解上清液进行酶活性测定,酶活性测定方法见文献[8,10],并进行表达蛋白的 SDS-PAGE 分析。

1.5.2 毕赤酵母中的表达:

(1)酵母的电击转化和筛选:

将重组质粒 pPIC9a-*xynB'* 用 *Bgl* II 酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母,挑取阳性转化子。电转化

及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

(2)重组酵母的培养、诱导表达和检测:

具体方法见参考文献[11]。重组酵母的发酵为高细胞密度补料发酵,发酵过程分为菌株培养阶段、碳源饲喂阶段和诱导表达阶段,具体方法见 Invitrogen 操作手册。

1.6 重组木聚糖酶的纯化

酵母发酵上清液经脱盐柱 Hiprep Desalting 26/10 (Amersham pharmacia biotech 预装柱)脱盐后,再经过分子筛 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech 预装柱)纯化,得到电泳纯的目标蛋白。

1.7 木聚糖酶活性的测定

采用国际通用的 Somogyi-Nelson 法。

酶活单位定义:1 个木聚糖酶活性单位(IU)为以 1% 可溶性木聚糖(4-O-Me-D-glucurono-D-xylan, Sigma From Birchwood)为底物,每分钟在 pH5.2、55℃ 条件下分解木聚糖生成 1μmol 木糖所需的酶量。

1.8 酶学性质的分析与比较

将纯化后的突变酶与原酶(同样经毕赤酵母表达并纯化)^[11]进行酶学性质的比较研究。包括酶的最适温度和热稳定性、最适 pH 和 pH 稳定性、比活性、金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响、酶动力学性质、酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力等性质。测定方法见参考文献[8]。

2 结果

2.1 突变位点的确定

对 XYNB 的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成。推测木聚糖酶 XYNB 属于第 11 族木聚糖酶^[12],由两个反向的 β 折叠片和一个短的 α 螺旋组成。整个酶分子成右手型结构。图 1 中标出 Thr¹¹ 和 Tyr¹⁶。它们分别位于氮端的 β 折叠股 B1 和 B2 上。从同为第 11 族的 4 种嗜热木聚糖酶的结构分析中发现,在其氮端 β 折叠股 B1 和 B2 上存在芳香族氨基酸的疏水相互

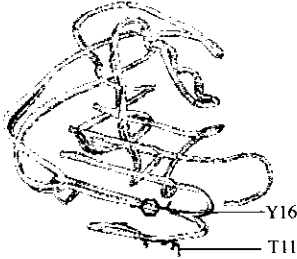


图 1 XYNB 的分子模型

Fig.1 The molecular model of XYNB

作用(表 1),而这种相互作用可能对稳定酶的结构、提高酶的热稳定性起作用^[7]。在 XYNB 结构中的相似位点是 T11-Y16,如将 Thr¹¹ 突变为 Tyr¹¹,则有可能形成相似的疏水相互作用。

表 1 四个嗜热木聚糖酶的最适温度和氮端芳香族氨基酸的疏水相互作用的分析

Table 1 Optimum temperature and aromatic interaction of N-terminal in four thermophilic xylanase

Protein	Organism	Optimum temperature /℃	Aromatic bond in strands B1 and B2 of Catalytic domain	Accession No. (GenBank)
Xylanase	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp. Rt69B.1	70	Y12 - Y16	AF036925
Xylanase B	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	85	F14-Y18	U76545
TfxA	<i>Thermomonospora fusca</i>	75	Y9-F14	U01242
XynA	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	70	W21-Y26	U35436

2.2 定点突变

以 xynB 为模板,扩增出突变基因 xynB',其编码的氨基酸由原来的 Thr¹¹ 突变为 Tyr¹¹。突变基因克隆到 pUC19 上,通过测序分析,确定突变位点与设计的目标位点一致。

2.3 重组表达质粒的构建

构建的大肠杆菌表达载体和毕赤酵母表达载体的示意图见图 2。

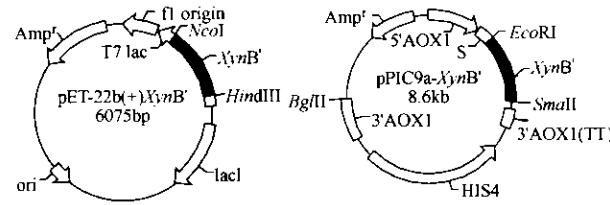


图 2 重组表达质粒 pET-22b-xynB' 及 pPIC9a-xynB' 的示意图

Fig.2 Physical map of recombinant expression plasmid pET-22b-xynB' and pPIC9a-xynB'

2.4 重组木聚糖酶的表达及纯化

2.4.1 在大肠杆菌中的表达:实验表明,突变酶在大肠杆菌中得到了表达(图 3),表达的突变酶分子量为 21kD,与理论分子量一致。重组大肠杆菌细胞裂解液上清的酶活性为 5 IU/mL,这说明突变酶有正常的木聚糖酶活性。

2.4.2 毕赤酵母中的表达: 首先在摇床水平上对毕赤酵母重组子进行诱导表达, 诱导 72h 后进行酶活性测定, 筛选出高表达菌株用于进一步的发酵罐扩大培养。在摇床水平上表达量最高的重组子其酶活性达到 30 IU/mL。在发酵罐上培养, 随着甲醇诱导时间的延长, 发酵上清液中木聚糖酶酶活力显著增加, 酶蛋白不断积累, 诱导 120h 后木聚糖酶活性可达 400 IU/mL(图 4)。

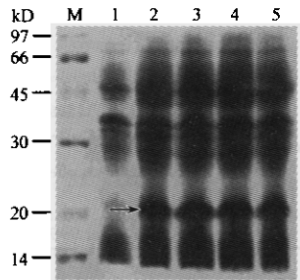


图 3 大肠杆菌表达的木聚糖酶 XYNB' 的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SDS-GAGE analysis of xylanase expressed in *E. coli*BL21(DE3)
1: CK; 2~5: XYNB' expressed in *E.coli*BL21(21kD).

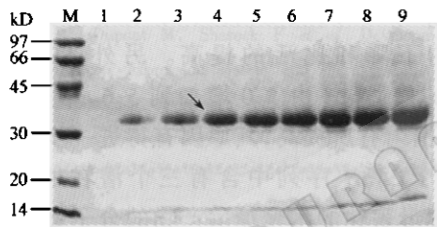


图 4 发酵罐中酵母表达的木聚糖酶 XYNB' 的 SDS-PAGE 分析
Fig.4 SDS-GAGE analysis of xylanase expressed in *Pichia pastaris*
1: CK; 2~9: expressed XYNB' in different time after induction with methanol (31kD).

2.4.3 木聚糖酶 XYNB' 的纯化: 经纯化后, 达到电泳纯的突变酶 XYNB' (图 5), 与以前纯化的经毕赤酵母表达的原酶 XYNB^[11] 一起进行酶学性质的比较研究。

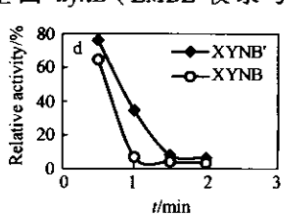
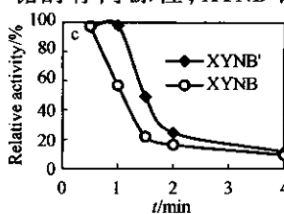
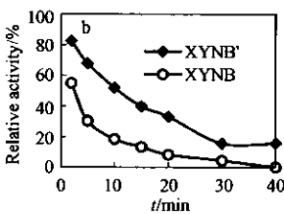
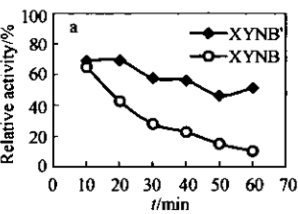


图 6 突变酶 XYNB' 和原酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较
Fig.6 Comparision of thermostability of XYNB and XYNB'
a:60°C; b:70°C; c:80°C; d:90°C.

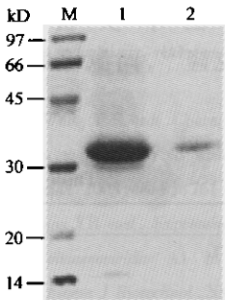


图 5 木聚糖酶 XYNB' 纯化的 SDS-PAGE 分析
Fig.5 SDS-GAGE analysis of purified XYNB'
1: crude XYNB'; 2: purified XYNB'.

2.5 酶学性质的分析与比较

实验结果表明, XYNB' 的热稳定性较 XYNB 有较大幅度的提高(图 6), 在 60°C 和 70°C 分别处理 60min 和 10min, XYNB' 剩余酶活性在 50% 以上, 而 XYNB 剩余酶活性只有 10.28% 和 18.65%。在 80°C 和 90°C 分别处理 1min, XYNB' 剩余酶活性分别为 98.07% 和 34.39%; 而 XYNB 剩余酶活性只有 56.99% 和 6.91%。在热稳定性提高的同时, 其最适温度并未改变, 与原酶一样为 60°C。

在 pH 性质上, XYNB' 的最适 pH 为 5.6, 与原酶 XYNB 的 5.0 有所差异, pH 稳定性在酸性范围内有所提高。在酶的比活性方面, XYNB' 为 1179.6IU/mg, 较 XYNB 提高了 33%。在酶的动力学方面, 突变酶 XYNB' 在 K_m 值上比原酶低 43%, 这说明突变酶具有更高的催化效率。金属离子 Ni^{2+} 对原酶有轻微的激活作用, 而对突变酶表现为轻微的抑制作用, 别的金属离子和化学试剂方面, 突变酶和原酶的表现一致。酶经突变后, 依然维持了原酶独特的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的特性。

3 讨论

目前, 在 GenBank 上已发表的第 11 族木聚糖酶的三维结构有 10 多个, 并且他们的氨基酸序列和三级结构有较高的相似性^[13]。XYNB 与第 11 族木聚糖酶有同源性, XYNB 的基因 *xynB* (EMBL 收录号

为: AJ292317) 由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆^[8], 同源性最高的达到 86%^[8], 因此我们可以建立 XYNB 的分子模型。

表 2 木聚糖酶 XYNB 和 XYNB' 的酶学性质比较
Table 2 Comparision of enzyme properties of XYNB and XYNB'

Properties of enzyme	XYNB	XYNB'
Optimum temperature/℃	60	60
Optimum pH	5.2	5.6
pH stability ¹	5-9	4-9
K _m /(g/kg) ²	20.87	11.89
V _{max} /(μmol/mg·min)	4568	3045
Specific activity/(IU/mg)	886.89	1179.6
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, Cr ³⁺ , Ni ²⁺ activate slightly Zn ²⁺ , Mn ²⁺ inhibit slightly SDS show no effect on activity	EDTA, Cr ³⁺ , activate slightly Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ inhibit slightly SDS show no effect on activity
Cellulase activity	No activity	No activity
Resistance to pepson and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 99% of its activity

1: pH range in which the relative activity was above 80% .
2: unknown molecular weight and concentration of xylan led to the unit of g/kg indicating K_m value.

在第 11 组木聚糖酶中, 盐桥相对于芳香族氨基酸的相互作用而言, 对提高酶的热稳定性影响较弱。同源性比较结果也显示, 二硫键的形成对提高第 11 组木聚糖酶的热稳定性没有太大影响^[13]。因此我们把提高木聚糖酶的热稳定性的重点放在对氮端芳香族氨基酸的分析上。

我们通过对 4 个嗜热木聚糖酶氮端的分析发现(表 1), 嗜热木聚糖酶氮端存在多个芳香族氨基酸, 研究表明它们组成酶与底物的结合位点, 并且它们之间的疏水相互作用对酶的稳定性有一定影响^[13, 14]。推测在氮端引入适当的突变, 使木聚糖酶氮端稳定性提高, 从而提高酶的热稳定性。因此, 我们在 XYNB 中引入 T11Y 的定点突变, 使 XYNB 氮端的 β 折叠股 B1 和 B2 上存在与嗜热木聚糖酶氮端相似的 Y11-Y16 疏水相互作用。结果表明, T11Y 突变酶 XYNB' 的热稳定性有明显的提高。XYNB' 在 60℃ 和 70℃ 分别处理 60min, 10min。剩余酶活性在 50% 以上, 而 XYNB 剩余酶活性只有 10.28% 和 18.65%。XYNB' 在 80℃ 和 90℃ 分别处理 1min, 剩余酶活性分别为 98.07% 和 34.39%; 而 XYNB 剩余酶活性只有 56.99% 和 6.91%。与 XYNB 进行氮端芳香族氨基酸的疏水相互作用比较的四个嗜热木聚糖酶的最适温度都在 70℃ 以上, 而 T11Y 突变酶 XYNB' 的最适温度保持不变为 60℃, 并没有提高, 说明 T11Y 突变对最适温度没有影响, 推测酶的最适温度和热稳定性不是由单一位点决定的, 可能是多种因素共同作用的结果。突变的 Tyr¹¹ 和 Tyr¹⁶ 与附近的其它芳香

族氨基酸组成底物的结合域, 提高了酶与底物的亲和性, 使突变酶的 K_m 值由 20.87 (g/Kg) 下降为 11.89 (g/Kg)。同时影响酶的作用效率, 表现为 V_{max} 的下降和比活的提高。另外 T11Y 突变使 XYNB 的最适 pH 由 5.0 增加到 5.6。pH 稳定性在酸性范围内有所提高, 其原因有待进一步研究。

由于 xynB' 序列中含有三个潜在的糖基化位点, 使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21kD 提高到 31kD 这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致^[11]。由于我们的目的是研究酶的结构与酶学性质之间的关系, 在做酵母表达时并没有筛选表达量最高的, 因此 XYNB' 与 XYNB 相比表达量有所不同。

来自 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 具有较优良的酶学性质^[8, 11]。它是目前分离到的比活性最高的木聚糖酶, 具有抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的能力, 而且金属离子和表面活性剂对 XYNB 的酶促反应均无明显影响, 也有较好的 pH 稳定性。但其耐热性一般。在 XYNB 中引入 T11Y 的定点突变, 在保持了 XYNB 优良性质的基础上, 进一步提高了酶的热稳定性, 同时也提高了酶的催化效率, 使此酶具有更好的应用价值。

本文的实验结果说明, 第 11 族木聚糖酶氮端芳香族氨基酸之间的疏水相互作用对提高木聚糖酶的热稳定性有很重要的作用。突变酶 XYNB' 与原酶 XYNB 仅有一个氨基酸的差异, 但在性质上除了热稳定性有显著变化外, 在别的性质上如酶的动力学性质、酶的比活性、最适 pH 等方面均有所变化, 为

进一步的木聚糖酶结构与功能的研究提供了优良的材料。随着大量性质各异的木聚糖酶及基因材料,尤其是在极端微生物中具有极端性质的木聚糖酶的不断分离,有望使木聚糖酶的结构与功能研究取得突变性的进展,并对其应用作出贡献。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Prade RA. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, **13**: 101 - 131
- [2] Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, **22**(1): 33 - 64
- [3] Hu YH(胡沂淮), Shao WL(邵蔚蓝). Xylanase. *Chemistry of Life* (生命的化学), 2002, **12**(3): 281 - 285
- [4] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, **65**(1): 1 - 43
- [5] Turunen O, Vuorio M, Fenel F *et al*. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Engineering*, 2002, **15**(2): 141 - 145
- [6] Ebanks R, Dupont M, Shareck F *et al*. Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, **25**: 310 - 314
- [7] Harris GW, Pickersgill RW, Connerton I *et al*. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins*, 1997, **29**: 77 - 86
- [8] Zhang H L, Yao B, Wang Y R *et al*. Characterization, gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(8): 761 - 765
- [9] Zhang HL, Yao B, Wang YR *et al*. Expression of xylanase gene xynA from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 in *Escherichia coli* and *Pichichia pastoris*. *Chinese J Biotechnol*, 2003, **19**(1): 76 - 80
- [10] Zhang HL(张红莲), Yao B(姚斌), Yuan TZ(袁铁铮) *et al*. Purification and properties of 43KD xylanase XYNA from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2002, **10**(1): 10 - 14
- [11] He YZ(何永志), Yao B(姚斌), Wang YR(王亚茹) *et al*. Overexpression of *Streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity and analysis of enzymic properties. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2004, **44**(3): 340 - 344
- [12] Liu L, Zhang J, Chen B *et al*. Principle component analysis in F/10 and G/11 xylanase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **322**(1): 277 - 280
- [13] Sapag A, Wonters J, Lambert C *et al*. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J. Biotechnol*, 2002, **95**(2): 109 - 131
- [14] Roberge M, Shareck F, Morosoli R *et al*. Characterization of active-site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Protein Eng*, 1999, **12**(3): 251 - 257