

综述

## 木聚糖酶碳水化合物结合结构域研究进展

刘亮伟, 程洁, 陈红歌

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

**摘要:** 木聚糖酶含有催化活性结构域, 有时还含有非催化活性结构域, 促进酶与底物结合, 特别是与不溶性底物的结合及降解, 称为碳水化合物结合结构域 (CBM), 它们在木聚糖降解过程中有重要作用。以下从 CBM 来源, 所属家族类型、对不溶性底物结合特性、与底物结合的特定氨基酸、与催化结构域间的连接肽、特别是对影响木聚糖酶稳定性的 5 个方面进行了综述, 说明 CBM 对木聚糖酶性质有很大影响。自然界中碳水化合物结构复杂、难以降解, 所以认识 CBM 相关性质对研究其与木聚糖酶的协同作用、提高木聚糖酶活性有重要意义, 并根据 CBM 属性用于改造木聚糖酶相关性质进行了展望。

**关键词:** 碳水化合物结合结构域, 木聚糖酶, 底物结合, 稳定性

## Xylanase carbohydrate binding module: recent developments

Liangwei Liu, Jie Cheng, and Hongge Chen

College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** Besides the catalytic domain, some xylanases contained a non-catalytic domain which is named as carbohydrate binding module (CBM). CBM can be used to improve their binding-ability to insoluble substrates. We illustrated the importance of CBM by reviewing the source of CBMs, type of families, features of binding to insoluble substrates, specific amino acids involved in substrate-binding, linker peptides connecting the catalytic domain, and the effect of CBMs on xylanase thermostability. CBM is important for xylanase to break down complicate carbohydrates. Perspectives on engineering xylanase activity according to the characteristics of CBMs were given.

**Keywords:** carbohydrate binding module, xylanase, substrate binding, stability

碳水化合物包括纤维素、半纤维素、淀粉类等物质, 半纤维素是仅次于纤维素的第二大可再生物质。碳水化合物的降解在自然界物质和能量循环中占有重要地位, 与可再生能源紧密相关。然而, 碳水化合物结构复杂, 这类物质的降解需要复杂酶系。在丝状真菌、好氧及厌氧细菌产生的纤维素降解酶

中除含有催化活性结构域外 (Catalysis domain, CD), 还含有一类非催化活性结构域, 能够促进纤维素酶体同微晶纤维素结合, 所以这种结构最初称为纤维素结合结构域 (Cellulose binding domain, CBD)。随着碳水化合物水解酶的深入研究, 这种类似结构越来越多, 它们不仅存在于纤维素酶中, 而

**Received:** October 10, 2009; **Accepted:** January 18, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30972123), Henan Science & Technology Fund (No. 092102110102).

**Corresponding author:** Liangwei Liu. Tel: +86-371-63555175; Fax: +86-371-63579690; E-mail: llw321@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30972123), 河南省科技攻关项目 (No. 092102110102) 资助。

且也存在于半纤维素降解酶和其他水解酶中。它们能够促进催化活性结构域与碳水化合物的结合, 现在将这类结构统称为碳水化合物结合结构域 (Carbohydrate binding module, CBM), 也包括结合淀粉的结构域<sup>[1]</sup>。CBM 是组成酶的一个独立区域, 可以和一个或多个 CD 结合; 可以是一个、两个、或多个 CBM 通过连接肽 (Linker) 串联在一起与 CD 相连<sup>[2]</sup>; 有时也会形成独立的亚基结构, 如纤维素酶体中 CBM 亚基和 CD 构成多功能酶复合体。CBM 确切的生物学功能还不完全清楚, 研究显示它们能够增加酶在底物附近聚集浓度, 也可以通过非共价键作用方式将多糖底物断裂开, 从而增加酶的催化活性<sup>[3]</sup>。因为 CBM 在促进酶与底物结合、结合底物特异性、与 CD 的连接、以及对碳水化合物水解酶稳定性等方面都有重要作用, 所以总结 CBM 相关属性, 对碳水化合物水解酶特别是对木聚糖酶活性的深入研究、酶的合理使用、及其相关性质的分子改造都有重要意义。

## 1 CBM 家族

现在发现很多种 CBM, 它们位于 CD 的 N-端、C-端或两端。它们氨基酸长度也不相同, 真菌 CBM 有 36 个氨基酸, 细菌 CBM 有时多达 200 个氨基酸。人们按照疏水性聚类方法把 CBM 分为不同家族, 每个家族都有自己的特征, 2005 年分为 42 个家族<sup>[4]</sup>, 至 2009 年 12 月增加到 57 个家族 ([http://www.cazy.org/fam/acc\\_CBM.html#refs](http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html#refs))<sup>[5]</sup>。绝大部分 CBM 属于 I、II、III 家族 (表 1), 其他家族只有少数几个成员, 有些家族只有一个成员。最简单、分子量最小的 CBM 主要来源于真菌纤维素酶, 归属于 CBM 家族 I, 序列长度一般为 33~36 个氨基酸, 其中研究最透彻的是里氏木霉 *Trichoderma reesei* CBH I。CBM 家族 II 成员较多, 又进一步细分为 CBM2a、CBM2b 两个亚家族, 它们的差别是 CBM2a 含有一个由 8 个氨基酸组成的环 (Loop), 而 CBM2b 则不含这个环<sup>[6]</sup>; 该家族的代表是粪纤维单胞菌 *Cellulomonas fimi* CBM2a 和荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* CBM, 它们位于 CD 的 N 端或 C 端, 序列长度为 95~108 个氨基酸。CBM 家族 III 主要来自

产纤维素酶的细菌种类中, 如厌氧嗜热梭菌 *Clostridium thermocellum* CBM 和食纤维梭菌 *C. cellulosorans* CBM, 它们的序列长度为 150 个氨基酸。其他是一些小的 CBM 家族如: 5 家族的欧文氏杆菌 *Erwinia caryophylli* CBM<sup>[7]</sup>, 10 家族的荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* CBM<sup>[8]</sup>, 它们的结构都由  $\beta$ -sheet 多肽组成。

表 1 主要 CBM 家族类型

Table 1 Major CBM family

Family	Origin name	Amino acid length	Source organism	Example Structure
CBM I	CBD I	33-36	<i>Trichoderma reesei</i>	CBH I Cystein knot
CBM II CBM2a	CBD II	95-108	<i>Cellulomonas fimi</i>	CBM2a $\beta$ -jelly roll
CBM2b			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CBM $\beta$ -jelly roll
CBM III	CBD III	150	<i>Clostridium thermocellum</i>	CBM $\beta$ -jelly roll
CBM5	CBD V	60	<i>Xylanimicrobium pachnodae</i>	CBM V $\beta$ -jelly roll
CBM9	CBDIX	170	<i>Thermotoga maritima SB8</i>	CBM9-1 $\beta$ -jelly roll
CBM22		124	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp. <i>Rt69B.1</i>	CBM22 $\beta$ -jelly roll

复杂碳水化合物的降解需要纤维素酶和半纤维素酶协同作用, CBM 不仅存在于纤维素酶中, 而且也大量存在于半纤维素酶系中。半纤维素酶系中的木聚糖酶、甘露聚糖酶和其他酶类不降解纤维素底物, 但是也含有与纤维素酶中 CBM 相似的结构, 这可能与碳水化合物中纤维素与半纤维素常常结合在一起有关。半纤维素酶中的 CBM 与纤维素酶中的 CBM 功能相似, 能够结合纤维素, 也起到细胞壁黏附、纤维素装配、蛋白质锚定等作用。Black 发现 CBM 和连接肽可以加强半纤维素酶降解复杂底物如植物细胞壁的能力<sup>[3]</sup>。木聚糖酶系主要由 F/10 家族和 G/11 家族木聚糖酶组成。F/10 木聚糖酶常含有 CBM, 能够加强酶与木聚糖特异性结合, 有时也称这类 CBM 为木聚糖结合结构域 (Xylan binding domain, XBD)。但是 G/11 家族木聚糖酶则一般没有 CBM, 这种现象可能反映了两类木聚糖酶进化时间的差异, G/11 木聚糖酶可能比 F/10 木聚糖酶出现

较晚<sup>[9]</sup>。海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 木聚糖酶 A(Xyn10A) 是 F/10 家族木聚糖酶, 含有多个结构域, 在酶体 N-端有 2 个重复的 CBM22, 在 C-端有 2 个重复的 CBM9。以前将这两个 CBM9 称为 C1、C2, 每个结构域序列长度为 170 个氨基酸, 现在称为 CBM9-1 和 CBM9-2, 其中后者离 C-端最近<sup>[10]</sup>。CBM9-1 和 CBM9-2 相似性不高, 通过生物信息学分析, 发现它们的氨基酸序列只有 11% 的一致性; 进一步对这两个结构域进行同源结构模拟, 发现它们有不同的空间结构 (图 1)。反映出它们在酶分子与底物结合及酶分子稳定性中的作用也不相同<sup>[10]</sup>。

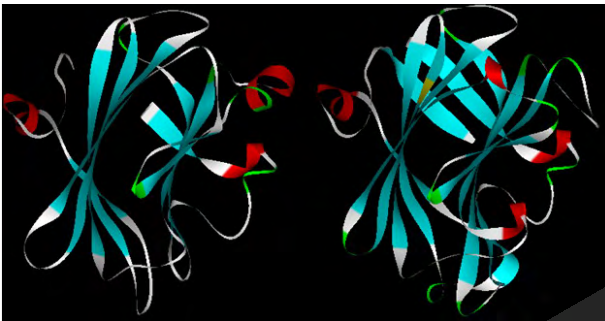


图 1 CBM9-1 和 CBM9-2 结构

Fig. 1 Structures of CBM9-1 and CBM9-2 from *T. maritima* (The structure was made by using Swiss-model software).

## 2 CBM 对底物的结合

一般情况下, CBM 不能增强酶分子对可溶性底物的催化活性, 但是对不溶性底物的催化活性有特殊功能, 多个 CBM 可以协同提高酶分子对不溶性底物的亲和力, 也能促进酶降解不同底物的催化活性。CBM 具有纤维素结合功能, 如 *T. maritima* 木聚糖酶的 CBM9-2 能够特异性结合纤维素和可溶性多糖的还原糖末端, 这也是 CBM 的特有属性<sup>[11]</sup>。F/10 家族木聚糖酶常含有 CBM, 所以对可溶性和不溶性木聚糖都有分解能力。如橄榄绿链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* 木聚糖酶含有 CD 和 CBM, 通过人工方法去掉 CBM, 它就不能降解不溶性木聚糖, 但是并不影响对可溶性木聚糖的降解。通过结构域移位将 CBM 放置在 *C. thermocellum* 木聚糖酶 CD N-端或 C-端不影响对木聚糖的结合力, 说明 CBM 在酶分子中的相对位置与结合木聚糖的功能关系不大<sup>[12]</sup>。通过截去 *T. maritima* 木聚糖酶 XynA 中不同长度的

氨基酸, 表明 C-端 CBM 具有调节酶与微晶纤维素结合功能, 单独的 CBM9-2 也可以提高酶与纤维素结合能力。CBM9-1、CBM9-2 与其他已知 CBM 序列相似性很低, 属于一种新的 CBM 种类<sup>[11]</sup>。将耐热梭状芽孢杆菌 *Clostridium stercorarium* CBM6 融合在嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus halodurans* 木聚糖酶 C-端, 提高了酶对不溶性燕麦木聚糖的水解活性, 对可溶性木聚糖的水解活性则没有太大影响, 显示 CBM 的主要功能是提高酶分子对不溶性木聚糖的水解活性<sup>[13]</sup>。

## 3 CBM 与底物的结合位点

CBM 主要功能是促进木聚糖酶与不溶性底物结合, 可促进酶体结合无定型纤维素、微晶纤维素、不溶性燕麦木聚糖、大麦  $\beta$ -葡聚糖等, 结合底物亲和力是 CBM 重要指标。来源于同一菌种的 CBM 有相对一致的结构, 但是也有一些差别。通过定点突变和化学修饰方法寻找结合底物的氨基酸, 人们发现不含 CBM 的 *Bacillus* 木聚糖酶, 结合底物的氨基酸主要是 Trp5、Phe7、Tyr120、Tyr166、Trp199、Tyr261、Tyr293、Tyr311、Tyr314 和 Phe315<sup>[14]</sup>。而含有 CBM 的木聚糖酶, 是通过 CBM 中的 Trp 和 Tyr 几个芳香族氨基酸与底物结合, 这些氨基酸组成一个平面结构, 能够与纤维素底物表面的葡聚糖链结合<sup>[15-17]</sup>。CBM 家族 1、2a、3、5 都有结合纤维晶体的表面, 研究葡萄糖和纤维二糖结构后, 人们认为 CBM 通过带电氨基酸间形成的氢键网络、以及 Trp175 和 Trp71 的堆积作用与不溶性底物结合, 微晶纤维素组成螺旋式楼梯状结构与 CBM 对应表面结合, 而 Tyr8、Trp22、Trp24 是 CBM10 家族结合底物的关键氨基酸<sup>[18]</sup>。研究发现 CBM9-2 全部结合在单糖、双糖、寡糖的还原糖末端<sup>[10]</sup>, 多于 2 个单糖的纤维寡糖不能增强 CBM 与底物的亲合力, 说明纤维二糖能够占据 CBM 中与底物结合的所有氨基酸位点<sup>[11]</sup>, 所以推测结合底物长度不高于纤维二糖。

## 4 CBM 与催化结构域之间的连接肽

CBM 通过连接区域与 CD 相连, 这个区域称为连接肽 (Linker)。通常连接肽的序列长度为 6~9 个

氨基酸,有时不同木聚糖酶分子之间 linker 长度差异很大。一般情况下,不同酶分子之间连接肽序列同源性不高。这些 linker 富含 Pro、Thr、Ser 等氨基酸,其中 Ser 或 Pro 含量较多;它们能够形成柔韧的绞链区,有助于不同结构域形成有活性的空间构象。纤维弧菌 *Cellvibrio japonicus* 木聚糖酶 Xyn10C 是由一个 F/10 家族的 CD 通过 linker 和 CBM15 相连组成的,晶体结构显示 linker 是无规则卷曲线段,呈现出很高的柔韧性<sup>[19]</sup>。David 等用 NMR 研究木聚糖酶 Cex 中连接肽结构,发现 linker 富含 Pro 和 Thr,在纳秒-皮秒尺度上显示出高度变化的柔性,它能够将不同结构域从空间上隔开。连接肽也有助于木聚糖酶通过 CBM 锚定于细胞壁上,促进 CD 催化降解复杂底物<sup>[20]</sup>。

连接肽在结构域融合过程中有重要作用,将葡聚糖酶 Cel5Z 同木聚糖酶 XynX 融合的过程中发现,当 Cel5Z 连接在 XynX 前面时,融合酶不显示双功能酶活性;而将 Cel5Z 连接在 XynX 后面时,融合酶则显示出双功能活性<sup>[21]</sup>。因此推测 Cel5Z 连接在 XynX 前面没有活性,是由于 2 个结构域之间少了 linker 序列。因为木聚糖酶后面有不同长度的连接区域,转化子 pXC100 (Cel5Z 连接在 XynX 后面) 含有 CBD 和 SLD 区域,转化子 pXC200 (Cel5Z 连接在 XynX 后面) 也含有 CBD 区域,而转化子 pXC300 (Cel5Z 连接在 XynX 前面) 没有显示结构域之间的 linker 区域。研究显示,双功能酶活性随着结构域间连接区域的缩短而相应减少;说明将不同结构域连接在一起时,linker 会影响结构域能否形成有活性的构象<sup>[22]</sup>。不同序列的 linker 对酶活性也有较大影响,对 linker 序列优化后,融合酶活性有较大提高<sup>[23]</sup>。说明连接肽影响融合酶的功能和活性,如果没有可变化的连接肽,两个结构域就无法形成有活性的空间构象。笔者认为要想将 Cel5Z 连接在 XynX 前面有双功能酶活性,必须在两个结构域之间加入合适的 linker 序列。

## 5 CBM 对酶稳定性的影响

人们发现某些微生物(解糖高温厌氧杆菌和热纤梭菌)所产木聚糖酶,去除其 N-端 CBM 会显

著降低酶的稳定性;而去除 C-端 CBM,一般不影响酶分子稳定性,因此认为酶分子中某些区域(主要是 N-端 CBM)对稳定性起促进作用,所以将这些区域称为热稳定性结构域(Thermostable domain, TSD),能够提高酶分子的最适温度( $T_{opt}$ ),它们常常串联在一起。嗜热性细菌 F/10 木聚糖酶中普遍含有这种 TSD,16 种嗜热性酶中 TSD 结合在 CD 的 N 端<sup>[13]</sup>。某些 CBM 既能够升高酶分子的  $T_{opt}$ ,又能够提高酶的稳定性<sup>[24]</sup>。通过人工方法,将耐高温放线菌 *Thermomonospora fusca* 木聚糖酶 TfxA 的 N-端和高比活 *S. olivaceoviridis* 木聚糖酶 XYNB 的 C-端融合在一起,融合酶稳定性提高 6 倍<sup>[25]</sup>。Zhao 等将 *C. stercorarium* 木聚糖酶 Xyn10B 截去不同长度,发现去掉 CBM22 后酶  $T_{opt}$  从 75°C 降低到 65°C;而去掉 CBM9 对木聚糖和葡聚糖活性没有太大影响。说明 Xyn10B 特性主要依赖于 CBM22 而不是 CBM9, CBM22 能显著影响木聚糖酶和葡聚糖酶催化活性<sup>[4]</sup>。李相前等将海栖热袍菌木聚糖酶 A 的 CBD 融合在葡聚糖酶 C-端,从而提高了葡聚糖酶的稳定性<sup>[26]</sup>。

但是, TSD 对酶的稳定性作用还没有得到完全证实。因为嗜热酶中发现 TSD 不久,人们在嗜中温 *C. fimi* 酶中发现了 TSD 同源序列,说明 TSD 不是嗜热酶的特有结构,从而使 TSD 的稳定性作用受到质疑。在瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 木聚糖酶中进行结构域融合,发现融合酶 XYN3A4 与亲本酶 XYN3 和 XYN3A 的  $T_{opt}$  都是 50°C,融合酶最适温度没有提高,只是提高了融合酶对底物亲合力和水解活性<sup>[27]</sup>。Sunna 等删除木聚糖酶 XynA 中一些氨基酸片段,发现 TSD 与 XBD 功能相近,可以选择性地亲和可溶性木聚糖,与羟甲基纤维素有微弱结合力,也有一定稳定性作用<sup>[28]</sup>。研究 *C. thermocellum* 木聚糖酶 X6 说明 TSD 也是一种 CBM<sup>[29]</sup>。Shin 等研究木聚糖酶 XynX 中 TSD 与 CD 的关系,表明该 TSD 既能增加酶与底物结合力,也能增加酶的稳定性<sup>[12]</sup>。Abou-Hachem 等发现海洋红嗜热盐菌 *Rhodothermus marinus* 木聚糖酶 Xyn10A 带有 CBM 时,其变性温度随  $Ca^{2+}$  浓度升高而增加,而去掉 CBM 变性温度则下降<sup>[30]</sup>,说明 CBM 与酶的稳定性有一定

关系。但是, 后续研究又出现了相反结果, 融合 *T. neapolitana* CBM22 后, 增强了 *B. halodurans* 木聚糖酶对不溶性木聚糖的水解能力, 但是融合酶稳定性下降了<sup>[31]</sup>。Mangala 等融合 *C. stercorarium* CBM VI 后, *B. halodurans* 木聚糖酶  $T_{opt}$  从野生型 70℃ 降低到 60℃<sup>[13]</sup>。Dias 等研究 *C. thermocellum* 木聚糖酶时, 发现 N-端结构域的连接肽边界区域提高了酶的稳定性, 由此推测 CBM22-1 不是 TSD<sup>[32]</sup>。将褐色热单孢菌 *Thermomonospora fusca* 木聚糖酶 A 的 N-端序列替换黑曲霉 *Aspergillus niger* 木聚糖酶 A 对应序列后, 杂合酶的作用温度为 60℃, 比野生型酶作用温度有一定程度的升高<sup>[33]</sup>, 说明边界序列可能影响酶的稳定性。

由此可见, CBM 与稳定性的关系还存在争议, 笔者研究发现, 木聚糖酶的稳定性除了与其本身氨基酸序列有关<sup>[34-36]</sup>, 还可能与 CBM 性质不同有关。因此认为不是所有 CBM, 而只是某些 CBM 能够增加酶的稳定性; 另外, 将 CBM 与催化活性结构域相连时, 没有合适的连接肽也可能降低酶稳定性; 所以需要进一步研究 CBM 对木聚糖酶稳定性的影响。

## 6 展望

由 CBM 的性质可知, 木聚糖酶活性在很大程度上依赖于 CBM, 它能够增加催化结构域与底物的结合能力, 是因为 CBM 形成与底物结合的表面结构、同时它们与催化结构域之间的 linker 使各个结构域形成有活性的空间构象; 另外, 某些 CBM 与稳定性有关, 提高木聚糖酶适应高温能力, 这些特性可用于木聚糖酶性质改造。

一方面, 根据 CBM 亲合不溶性底物特性, 将单一催化结构域连接 CBM 增加酶对不溶性底物的降解作用。由于进化原因, 不是所有木聚糖酶都含有 CBM, 其中 G/11 木聚糖酶常含单一催化活性结构域, 对可溶性底物降解活性较高; 但是没有 CBM, 对不溶性底物降解活性较低。根据 CBM 结合并促进酶对不溶性底物降解的活性, 在酶分子改造中, 通过人工方法将 CBM 与催化活性结构域连接, 可以提高对不溶性底物的催化活性。也可以用 CBM 改造木

聚糖酶降解底物的特异性, 以降解特殊类型的碳水化合物。另一方面, 某些 CBM, 特别是高温菌的 CBM 可能与酶稳定性有关, 可能提高中温酶适应高温能力。在酶分子改造中, 利用这些 CBM 提高单一催化结构域的稳定性。笔者正将嗜高温菌海栖热袍菌 *T. maritima* CBM 与中温黑曲霉 *A. niger* 木聚糖酶 III 进行结构域融合, 以提高后者作用温度和对不溶性底物的结合能力。*A. niger* 木聚糖酶 III 是 G/11 家族单一的催化活性结构域, 对可溶性底物有较高降解活性, 但是对不溶性底物催化活性较低; 同时它的  $T_{opt}$  为 50℃, 稳定性也较低, 在 54℃ 保温 30 min, 酶活性则下降 53%, 不适应工业生产的高温环境<sup>[37]</sup>。通过结构域融合方法可以给这个酶加上嗜高温的 CBM, 结构域融合是通过融合 PCR 将不同结构域基因连接起来, 在此过程中, 融合 PCR 的自我延伸程序是扩增融合基因的主要影响因素<sup>[38]</sup>。另外, 各个结构域需要形成有活性的空间构象, 合适 linker 是影响结构域折叠的重要因素, 所以需要加入不同长度和种类的 linker, 以保证融合结构域折叠成正确空间构象。

通过综述 CBM 的特性, 说明 CBM 是影响木聚糖酶活性重要的非催化活性结构域, CBM 的相关特征可以用来改造木聚糖酶的性质, 开发具有新功能的木聚糖酶, 以适应催化复杂碳水化合物的需要。

## REFERENCES

- [1] Rodriguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, et al. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**: 341-346.
- [2] Harhangi H, Freelove A, Ubhayasekera W, et al. Cel6A, a major exoglucanase from the cellulosome of the anaerobic fungi *Piromyces* sp. E2 and *Piromyces equi*. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1628**: 30-39.
- [3] Black GW, Rixon JE, Clarke JH, et al. Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates. *Biochem J*, 1996, **319**: 515-520.
- [4] Zhao G, Ali E, Araki R, et al. Function of the family-9 and family-22 carbohydrate-binding modules in a modular beta-1,3-1,4-glucanase/xylanase derived from *Clostridium*

- stercorarium* Xyn10B. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**: 1562–1567.
- [5] Boraston A, Bolam D, Gilbert H, *et al.* Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J*, 2004, **382**: 769–781.
- [6] Simpson P, Xie H, Bolam D, *et al.* The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 41137–41142.
- [7] Brun E, Johnson P, Creagh A, *et al.* Structure and binding specificity of the second N-terminal cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* endoglucanase C. *Biochemistry*, 2000, **39**: 2445–2458.
- [8] Raghothama S, Simpson P, Szabo L, *et al.* Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from *Pseudomonas* xylanase A. *Biochemistry*, 2000, **39**: 978–984.
- [9] Liu LW, Qin TC, Wang B, *et al.* Molecular evolution of xylanase. *J Food Sci Biotech*, 2007, **26**: 110–118.  
刘亮伟, 秦天苍, 王宝, 等. 木聚糖酶的分子进化. 食品与生物技术学报, 2007, **26**: 110–118.
- [10] Notenboom V, Boraston A, Kilburn D, *et al.* Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry*, 2001, **40**: 6248–6256.
- [11] Boraston A, Creagh A, Alam M, *et al.* Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A. *Biochemistry*, 2001, **40**: 6240–6247.
- [12] 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. *Appl Envir Microbiol*, 2002, **68**: 3496–3501.
- [13] 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 Mol Catal B-Enzym*, 2003, **21**: 221–230.
- [14] Simpson H, Barras F. Functional analysis of the carbohydrate-binding domains of *Erwinia chrysanthemi* Cel5 (Endoglucanase Z) and an *Escherichia coli* putative chitinase. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 4611–4616.
- [15] Reinikainen T, Teleman O. The activity of native and mutated cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Proteins*, 1999, **22**: 392–403.
- [16] McLean B, Bray M, Boraston A, *et al.* Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein Eng*, 2000, **13**: 801–809.
- [17] Connerton I, Cummings N, Harris G, *et al.* A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1433**: 110–121.
- [18] Panyi T, Szabo L, Nagy T, *et al.* Trp22, Trp24, and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from *Pseudomonas* xylanase A to insoluble ligands. *Biochemistry*, 2000, **39**: 985–991.
- [19] 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 Biol Chem*, 2004, **279**: 11777–11788.
- [20] 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 Biol Chem*, 2007, **282**: 2091–2100.
- [21] An J, Kim Y, Lim W, *et al.* Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**: 989–995.
- [22] Lu P, Feng M, Li W, *et al.* Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced  $\beta$ -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **261**: 224–230.
- [23] Lu P, Feng M. Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**: 579–587.
- [24] Wassenberg D, Schurig H, Liebl W, *et al.* Xylanase XynA from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: structure and stability of the recombinant enzyme and its isolated cellulose-binding domain. *Protein Sci*, 1997, **6**: 1718–1726.
- [25] Yang HM, Meng K, Luo HY, *et al.* Improvement of the thermostability of xylanase by N-terminus replacement. *Chin J Biotech*, 2006, **22**: 26–32.  
杨浩萌, 孟昆, 罗会颖, 等. 通过 N 端替换提高木聚糖酶的热稳定性. 生物工程学报, 2006, **22**: 26–32.
- [26] LI XQ, Shao WL. The construction of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel12B fused with CBD and the characterization of chimeric enzyme. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **46**: 726–729.  
李相前, 邵蔚蓝. 海栖热袍菌葡聚糖内切酶 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. 微生物学报, 2006, **46**: 726–729.
- [27] Mesta L, Rasche C, Durand R, *et al.* Construction of a chimeric xylanase using multidomain enzymes from *Neocallimastix frontalis*. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **29**: 456–463.
- [28] Sunna A, Gibbs M, Bergquist P. The thermostabilizing domain, XynA, of *Caldibacillus cellulovorans* xylanase is a xylan binding domain. *Biochem J*, 2000, **346**: 583–586.
- [29] Charnock S, Bolam D, Turkenburg J, *et al.* The X6 "thermostabilizing" domains of xylanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the *Clostridium thermocellum* X6b domain. *Biochemistry*, 2000, **39**: 5013–5021.
- [30] Abou-Hachem M, Olsson F, Karlsson E. Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles*, 2003, **7**: 483–491.
- [31] Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Extremophiles*, 2007, **11**: 169–177.
- [32] Dias F, Goyal A, Gilbert H, *et al.* The N-terminal family 22 carbohydrate-binding module of xylanase 10B of *Clostridium thermocellum* is not a thermostabilizing domain. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **238**: 71–78.
- [33] Sun J, Liu M, Xu Y, *et al.* Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement. *Pro Exp Puri*, 2005, **42**: 122–130.
- [34] Liu L, Wang M, Shao W, *et al.* A novel model to calculate dipeptides responsible for optimum temperature in F/10 xylanase. *Process Biochem*, 2005, **40**: 1389–1394.
- [35] Liu L, Dong H, Wang S, *et al.* Computational analysis of di-peptides correlated with the optimal temperature in G/11 xylanase. *Process Biochem*, 2006, **41**: 305–311.
- [36] Liu L, Wang B, Chen H, *et al.* Rational pH-engineering of the thermostable xylanase based on computational model. *Process Biochem*, 2009, **44**: 912–915.
- [37] Chen H, Yan X, Liu X, *et al.* Purification and characterization of a novel bifunctional xylanase, xynIII, isolated from *Aspergillus niger* A-25. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, **16**: 1132–1138.
- [38] Liu LW, Yang HY, Hu Y, *et al.* The fusion-PCR added self-extension process. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25**: 96–98.
- 刘亮伟, 杨海玉, 胡瑜, 等. 加入自我延伸程序的融合 PCR. 中国农学通报, 2009, **25**: 96–98.