中温纤维分解真菌尖镰孢 *Fusarium oxysporum* 中一种新的耐热内切葡聚糖酶

刘淑艳 段新源 卢雪梅* 高培基*

(山东大学生命科学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100. * 联系人, E-mail: gaopi@sdu.edu.cn; luxuemei@sdu.edu.cn)

摘要 *Fusarium oxysporum* L19 是一株典型的中温真菌, 从其培养液中分离到一种新的耐热内切葡聚糖酶 (EGt). 用传统的酶动力学方法, 以 CMC-Na 为底物, 30 min 的反应时间确定其最适反应温度为 75 °C; 热稳定性指数衰减拟合曲线显示 70 °C 半衰期为 15.1 min; 该酶不作用于对硝基苯纤维二糖苷(pNPC). EGt 对大多数金属离子及化学试剂不敏感, N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)的蛋白质侧链修饰表明, Trp 处于其活性中心. N-末端氨基酸序列为 SYRVPAANGFPNPDASQEKQ, 基因测序以及广范的序列比对分析显示, EGt 与已知的内切葡聚糖酶没有同源性. 这是首次从中温真菌 *Fusarium oxysporum* 中分离到耐热纤维素酶, 多种同工酶的表达可能有助于其适应复杂的生存环境.

关键词 *Fusarium oxysporum* 耐热内切葡聚糖酶 热稳定性 热活性 生物制浆

纤维素是地球上最丰富的可再生性资源, 其生物降解依靠多种纤维素酶组分的协同作用, 这种多组分的复杂体系被称之为纤维素酶系^[1]. 依据催化方式的不同, 纤维素酶分为内切葡聚糖酶(endo-1,4-glucanase, EC3.2.1.4, EG)、外切葡聚糖酶(1,4-β-D-glucan glucanohydrolases, EC3.2.1.74 和 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91, CBH)和 β-葡萄糖苷酶(glucosidases, EC3.2.1.21, BG). 其中内切葡聚糖酶作用于纤维素分子内部的非结晶区, 随机水解 β-1,4-糖苷键, 将长链纤维素分子截断, 产生大量带非还原性末端的不同长度的纤维素短链^[2,3]. 内、外切葡聚糖酶的协同作用是纤维素彻底降解的关键因素. 随着对纤维素酶认识的深入, 人们根据纤维素酶的结构和作用机制又将其分为不同的糖苷水解酶家族^[4], 可以在线(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>)查看这些糖苷水解酶家族的最新信息.

内切葡聚糖酶在棉纤维的生物抛光, 提高纸浆的滤水性、打浆性, 废纸脱墨, 增强洗涤剂的有效性和利用植物原料作为动物饲料等方面具有巨大的潜力^[5,6]. 目前, 这些工业用酶主要来源于木霉(*Trichoderma*)和曲霉(*Aspergillus*)^[7], 但是这些酶在高温下缺乏活性. 而纤维材料的酶解糖化只有在 60 °C 以上进行才能适合生产, 因此, 选育和设计新的耐高温纤维素酶是非常必要的.

耐热纤维素酶主要来自嗜热菌和超嗜热菌^[8,9].

近来, 嗜热真菌因其具有快速生长, 高效降解纤维素, 易于纯化的特性以及对结晶纤维素可观的分解能力而成为更具潜力的耐热纤维素酶的来源. 目前, 已经有多种嗜热真菌的内切葡聚糖酶被纯化和鉴定, 如 *Chaetomium thermophilum* var *dissitum*, *C. thermophilum* var *coprophile*, *Humicola insolens*, *Humicola grisea* var *thermoidea*, *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces emersonii* 和 *Thermoascus aurantiacus* 等, 它们的最适反应温度在 50~80 °C 之间^[10~13]. 但是从中温真菌分离耐热纤维素酶目前还未见报道. 近年来, 由于丝状真菌尖镰孢 *Fusarium oxysporum* 具有一步将纤维素和半纤维素转化为乙醇的非凡能力而受到重视. 它是多种纤维素酶、半纤维素酶的良好来源^[14,15], 目前至少已从该菌中分离到了 4 种内切葡聚糖酶、多种木聚糖酶以及其他纤维素降解相关酶^[15~19]. 而且, 其内切葡聚糖酶 EGI 的三维结构已经被解析^[20]. 本实验室所分离到的 *F. oxysporum* L19 是一株中温菌, 但其胞外存在多种耐热内切葡聚糖酶, 本文对其中一种新的耐热内切葡聚糖酶进行了纯化和鉴定.

1 材料与方法

() 培养基及培养方法. *F. oxysporum* L-19 由本实验室分离自腐烂的麦草. 其产酶培养基为在 Mandels 盐^[21]中加入 2% 的麸皮, 自然 pH (约 7.0). 150 mL 上述培养液置于 500 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 30

min. 接种量为1%, 28℃摇床(150 r/min)振荡培养7 d. 培养物4℃, 8000×g离心10 min, 收取上清液, 超滤(5000 MW, Millipore)浓缩备用.

() 耐热内切葡聚糖酶的纯化. 浓缩的无细胞培养液, 置于醋酸缓冲液(50 mmol/L, pH 4.4)中透析过夜, 经DEAE-Sephacrose FF阴离子交换柱(25 cm × 2.5 cm)去色素; 将富含内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶的部分收集, 超滤浓缩(5000 MW, Millipore), 再经Bio-gel P100(90 cm × 2 cm)层析分离, 醋酸缓冲液(pH 4.4, 50 mmol/L)洗脱, 收集内切葡聚糖酶峰, 超滤(5000 MW, Millipore)浓缩; 最后经CM-Sephacrose FF阳离子交换柱(25 cm × 2 cm), 0~0.8 mol/L的NaCl梯度洗脱, 得目的酶, 将其收集, 透析脱盐, 冷冻干燥浓缩.

() 酶活力和蛋白浓度的测定. 内切葡聚糖酶(CMCase)的测定参考文献[22]. 1%的CMC-Na(质量体积比)醋酸缓冲液(pH 5.4, 50 mmol/L)中加入0.1 mL适当稀释的酶液, 反应30 min后, 用二硝基水杨酸(DNS)检测还原糖的生成量. 1个酶活单位(U)定义为: 以葡萄糖为标准, 每min转化底物生成1 μmol葡萄糖所需的酶量. 外切葡聚糖酶(pNPCase)的测定参考文献[23], 以对硝基苯纤维二糖苷(pNPC, Sigma)为底物. β-葡萄糖苷酶测定参考文献[16]. 蛋白含量的测定以牛血清白蛋白为标准, 采用考马斯亮蓝染色法.

() 酶学性质测定. 除特殊说明外, 以下实验均以纯化的耐热内切葡聚糖酶为材料, 标准分析条件下进行. 在30~85℃范围内进行酶促反应, 确定酶的最适反应温度; 等量的酶液溶于醋酸缓冲液(50 mmol/L, pH 5.4)中, 分别在30, 40, 50, 60和70℃预保温, 间隔一定时间取出, 立即冷却, 在75℃下反应30 min测定残余酶活力, 以确定其热稳定性; 在测定活力的反应体系中添加不同的金属离子和化学试剂至终浓度2.0 mmol/L, 考察其对酶活力的影响; 经6 mol/L浓盐酸, 110℃消化24 h后, 氨基酸自动分析仪(HITACHI 836)进行氨基酸含量测定; 将酶与一定量的蛋白修饰剂在30℃作用30 min, 用制备蛋白质侧链修饰剂的溶液代替含有修饰剂的溶液作为空白对照, 测定残余酶活力, 确定酶活性中心氨基酸种类[24].

() 蛋白性质测定. 纯化的耐热内切葡聚糖酶

分子量采用SDS-PAGE(12%的分离胶, 4%的浓缩胶)测定, 蛋白染色用考马斯亮蓝R-250 (Sigma), 低分子量的蛋白标准品为上海生工制品. IEF-PAGE测定等电点, 胶浓度为5%, 两性载体pH 3.0~10.0 (Pharmacia), 广泛pH标准品(Pharmacia)用于指示等电点. N-末端测序采用Edman降解法, Applied Biosystems 491蛋白质序列分析仪测序.

() 总RNA的提取, RT-PCR扩增和基因测序. 分子生物学方法参考文献[25]. *F. oxysporum* L19的总RNA的提取和酶基因RT-PCR扩增分别用总RNA提取试剂盒(Promega, 美国)和RNA PCR试剂盒(TaKaRa, 日本). 5'端引物根据纯化的耐热内切葡聚糖酶N-端第8~14个氨基酸序列而设计(5'-AACGGHTTCCCYAACCCYGAY-3'), 3'端引物依据mRNA具有polyA尾的特性设计(polyT). 扩增产物与T-easy载体(Promega, 美国)连接并克隆至大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α中克隆基因在上海Invitrogen公司测序.

测得的序列去除引物序列后, 利用网上免费资源NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>)、糖苷水解酶数据库(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>)和生物软件OMIGA 2.0进行生物信息学分析.

2 结果

2.1 温度对 *F. oxysporum* L19 生长的影响

取4块直径为1 cm左右的新鲜*F. oxysporum* L19培养物, 分别置于新的PDA (potato dextrose agar)平板上, 在不同温度下培养5 d. 以菌丝圈直径表征生长量[26]. 该菌在28℃生长旺盛, 15和37℃下生长极为缓慢, 45℃不生长. 28℃条件下的菌丝圈直径分别为15和37℃培养条件下的3.4和4.2倍, 是一株典型的中温真菌.

2.2 耐热内切葡聚糖酶的纯化

F. oxysporum L19胞外酶中, 至少含有4种耐热内切葡聚糖酶和几种中温内切葡聚糖酶. 其中的一种耐热内切葡聚糖酶(命名为EGt), 经3次柱层析得到纯化. 其总收率为19.3%; 纯化倍数为43.5倍. EGt不具有外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶活力, 对CMC-Na的比活力为67.4 U/mg蛋白.

EGt为单亚基酶, SDS-PAGE为单带, 相应分子量为42.7 kD, IEF-PAGE显示等电点为5.0 (图1).

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-1343>

图 1 EGt 的电泳分析

(a) SDS-PAGE 图. 1, 标准蛋白; 2, 粗酶液; 3, 纯化的 EGt. (b) IEF-PAGE 图. 1, 标准蛋白; 2, 纯化的 EGt (pI 5.0). 蛋白染色液为考马斯亮蓝 R-250

2.3 EGt 酶学性质测定

() 热稳定性(thermostability)和热活性(thermoactivity). EGt 在 75 表现最高活力, 80 时仍保持其最高活力的 85%~90%(图 2), 明显高于一般的中温酶(中温酶的最适温度为 20~50), 而与嗜热真菌主要的胞外内切葡聚糖酶的最适温度一致^[11,12]. 用 Prism 软件(Ver 4.0, Graph Pad)对 EGt 的热稳定性曲线进行单指数衰减拟合分析显示, EGt 在 60 和 70 的半衰期(half-life time)分别为 21.2 和 15.1 min(图 3)

图 2 温度对 EGt 酶活力的影响

反应温度为 30~85 (间隔 5), 反应时间为 30 min

() 动力学参数的测定. EGt 与 0.1%~0.5% 的 CMC-Na 在标准反应体系中测定酶活力, Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 求得 EGt 的 V_{max} 为 94.1 U/mg, K_m 为 0.57%(g/mL). 由于不能精确的测定纤维素类高分子不均一性聚合物的克分子浓度, 使用重量百分比浓度表示其 K_m 值.

图 3 预保温时间对 EGt 酶活力的影响

用单指数衰减方程拟合曲线, 拟合方程为 $Y = \text{Span} \times \exp[K \times X] + \text{plateau}$, 半衰期为 0.69/K, 适合度分析 (R^2) 均大于 0.95. 点代表实验数据, 线代表拟合曲线

() 金属离子及化学试剂对 EGt 活力的影响. Mg^{2+} , Co^{2+} , $Na_2S_2O_4$ 对 EGt 有显著的激活作用, 2.0mmol/L 浓度即使酶活力增加 10% 以上; 而 Pb^{2+} , Fe^{3+} 对酶有强烈的抑制作用, 将两种金属离子分别加入反应体系后, 均使酶的活力降低约 50%, EDTA 也有一定的抑制作用(表 1). 这在其他来源的纤维素酶研究中有类似的报道^[27,28]

() 化学修饰. N-溴代琥珀酸亚胺(NBS)对 EGt 内切葡聚糖酶活力的影响依赖于处理时间和所用试剂的浓度. 1 $\mu\text{mol/L}$ NBS (NBS 与 EGt 的比例约为 30 : 1) 处理 30 min, 即可使 EGt 的酶活力损失 90%, 说明 NBS 强烈抑制酶的活性. 因此, 与大多数内切葡聚糖酶相类似, EGt 中的色氨酸残基可能直接参与了酶的催化^[24,29].

() 氨基酸组成分析. 酸水解分析蛋白氨基酸组成会造成一些氨基酸的破坏, 如色氨酸通常被完全破坏, 谷氨酰胺和天冬酰胺被部分转化为谷氨酸和天冬氨酸, 羟基氨基酸回收也只有 90%. 如表 2 所示, EGt 含有较多的脯氨酸和低含量的半胱氨酸, 依可检测氨基酸的含量进行排序, 它们分别位于第 3 和第 20 位. 许多研究表明, 脯氨酸的含量与酶的热稳定性正相关, 而半胱氨酸的含量则随着热稳定性的增加而减少^[30,31]. 可能正是这些氨基酸赋予了 EGt 一定的热稳定性

表 1 金属离子及化学试剂对 EGt 酶活力的影响^{a)}

金属离子/ 化学试剂	残余酶活力(%)	金属离子/ 化学试剂	残余酶活力(%)
—	100		
MgSO ₄	112	CoCl ₂	116
Fe ₂ (SO ₄) ₃	53	CaCl ₂	99
EDTA	79	Pb(Ac) ₂	50
Na ₂ S ₂ O ₄	119	NaCl	100
CuSO ₄	88	SDS	103
ZnCl ₂	95	BaCl ₂	103

a) 100%酶活力相当于 40 U/mg 的酶蛋白

表2 氨基酸组成分析

氨基酸	含量 ^{a)} (%)	氨基酸	含量(%)
Pro	11.5	Ile	1.5
Met	1.3	Val	4.5
Arg	2.3	Cys	0.3
His	2.0	Ala	5.8
Lys	4.6	Gly	15.9
Phe	3.3	Glu ^{b)}	13.2
Try	4.7	Ser	10.4
Leu	3.6	Thr	5.8
.Asp ^{b)}	8.9		

a) 氨基酸含量的计算以可检测的氨基酸的总量为 100%; b) 谷氨酰胺和天冬酰胺被大部分转化为谷氨酸和天冬氨酸, 色氨酸被完全破坏

2.4 EGt 序列分析

蛋白序列分析是研究蛋白质结构与功能的有效手段, EGt 的 N-末端序列为 SYRVPAANGFPNP DASQEKQ. 用分子生物学的手段对其基因进行克隆, 将一个含有 1204 个碱基的 cDNA 序列的克隆进行了测序和分析. 其中包含一个 1011 个核酸的可读框(ORF), 编码一个 337 个氨基酸的蛋白, 理论分子量和等电点分别为 36738.61 Da 和 5.0. 其完整基因序列和预测的氨基酸序列见图 4.

预测蛋白的 N-端序列和理论等电点与实验测定值完全一致. 对预测蛋白的氨基酸组成分析进一步证实 EGt 含有相对较多的脯氨酸(含量位于第 6 位)和少量的半胱氨酸(含量位于第 19 位). 但是其理论分子量与实测值并不完全对应, 由于真菌的纤维素酶都要经过一些复杂的翻译后修饰(如糖基化修饰)过程, 在此过程中蛋白的一级结构可能被改变或者一些新的衍生物被连接到氨基酸的侧链基团, 因此导致预测蛋白的理论分子量小于实测分子量. 而且由于分子量测定和氨基酸分析实验方法本身的局限性, 实测值略偏离预测值是可能的.

EGt 基因序列及其预测的氨基酸序列用 BLAST 进行网上比对的结果显示, 该蛋白与一种纤维分解真菌 *Gibberella zeae* PH-1 的一个预测蛋白有 78% 的同源性, 但是没有发现与其相似的内切葡聚糖酶已知序列.

3 讨论

本实验室曾报道将 *F. oxysporum* L19 用于麦草生物制浆, 用该菌处理麦草仅 5 d, 即发生明显分丝现象, 从而提高了化学预浸效率, 增强了纸浆强度^[32]. *F. oxysporum* L19 具有完整的纤维酶系, 并有多种耐热内切葡聚糖酶分泌至胞外, 本文所报道的其中一种耐热内切葡聚糖酶(EGt), 其生化特性完全不同于 *F. oxysporum* 中已知的内切葡聚糖酶(表 3).

表 3 EGt 与 *F. oxysporum* 中已报道的内切葡聚糖酶生化性质的比较

	分子量/kD	等电点	最适温度/	文献
1	23.2	8.6	50	17
2	41.7	6.4	55	18
3	Nr ^{a)}	5.0	NR	19
EGt	42.7	5.0	75	

a) NR 表示文献中没有报道

Bok 等人^[33]从 *Thermotoga* sp FjSS3-B.1 中得到内切葡聚糖酶, 是迄今为止报道的最为耐热的内切葡聚糖酶, 其最适活性温度可达 106 . 嗜热真菌的内切葡聚糖酶最适酶活温度在 50~80 之间^[11]. 研究最多的产纤维素酶的嗜热真菌是 *Humicola* spp, 其内切葡聚糖酶最适温度在 60 左右^[34~36]. EGt 虽然来源于典型的中温真菌 *F. oxysporum* L19, 但其最适反应温度可以达到 75 , 而 70 的半衰期却只有 15.1 min. 因此, 将其归于耐热酶(thermophilic enzyme), 而不是热稳定性酶(thermostable enzyme)更为合适. 事实上, EGt 的最适活力温度已经说明其具有一定的工业应用潜力.

目前, 只有 3 种 *F. oxysporum* 内切葡聚糖酶的基因被发表, 分别为内切葡聚糖酶 , 内切葡聚糖酶 Cel45A 和内切葡聚糖酶 B^[37]. 根据序列同源性和相应的蛋白结构, 这 3 种内切葡聚糖酶分别属于糖苷水解酶家族 7, 45 和 6, 它们彼此之间序列同源性很低(均小于 10%). 根据糖苷水解酶家族的分类原则, 已知的内切葡聚糖酶分属于 14 个家族. 通常, 来自于不同家族的内切葡聚糖酶序列具有显著差异. 然而, 目前还没有足够的证据将 EGt 归于某一个家族. 这也说明蛋白的一级结构不是决定其功能的惟一因

```

1      AACGGTTTCCCTAACCCCGACGCTTCACAGGAGAAGCAGATCGCTATCCAGGCTGGTGGAA
      N G F P N P D A S Q E K Q I A I Q A G G
61     AAGCTACCTGGTGCTCCTCTTCCCACTCTCGGTGTTGGTCTACCAAGCTTTCCAG
      K L P G A P L P T T L G V G S T T A F Q
121    CTCATTGCTTCAACGAGCTCTTTGAGACTGCTTACTTTTGCTCTCTTCTCTACAATGTC
      L I A F N E L F E T A Y F C S L L Y N V
181    ACTAACGGCATTGAAGGATACAAAGTTGAGGGTGACAAGTTGCATGAGGCCAAGCATGTT
      T N G I E G Y K V E G D K L H E A K H V
241    CTCAAGACTGTCTTGCTCAAGAAGAGCAGCAGCCATCGGTGCTTGGCCACTCTCAAG
      L K T V L A Q E E Q H A I G A L A T L K
301    TCAGCTGGCAAATTTGCTCCTTCACCTTGCAAATACCAATTCCCGTTCGACAAGCTCAAG
      S A G K F A P S P C K Y Q F P V D N L K
361    GACGCCATACTTCTCGCTGAGACATTCACTGTCAGTCGTTCTCGGTGCTCTCCAAGACGCC
      D A I L L A E T F T A V V L G A L Q D A
421    AACGTTGTCTTCGCTAGCGAGGGCTTCCAGAGGTTGTCCGCTGATCTCGTCCGTCATC
      N V V F A S E G L P E V V R L I S S V I
481    GGCCAAGAGGGTGAGCAAAATGGTTTCTACCGTATCTACCTCGGCCAAGTTCCTTCTGAG
      G Q E G E Q N G F Y R I Y L G Q V P S E
541    TCACCTGCTGACCACTGTCCTGCTGCTTTTGCCTGGTCTGCTCTCCAGGCTTTTATT
      S P F L T T V P A A F A W S A L Q G F I
601    GTTCCTGGCTCTTGCACTGAGGACATCAAGAAGATCAACCTTCCCATCTTCCCTGCTCTC
      V P G S C T E D I K K I N L P I F P A L
661    CAGGTCACCGCGGTGCCATTGCTGTTCTTGAGGCTGAGGACCAAGTCTAAGCTTTCAGC
      Q V N G G A I A V L E A E D Q S L T F S
721    GCCACTCTTGAAGAGTCTCACAAGGGCGAGGATATCTATATCACTACACCACTGGCCAG
      A T L E E S H K G E D I Y I T Y T T G Q
781    CAGCTTCCCTACAGTGTCGAAGGCTGAGAAGCTCAAGTGGAATGCAAGAGTGTCAAGCTT
      Q L P Y S V K A E N V K W N G K S V K L
841    GAGGCTGAGTTCCTTACCATAAGCTGGTCGCTCAGGGCTTCAACCACTGCTCTGACT
      E A E F P Y H K L V A Q G F T H A A L T
901    ACTTCCAACAACATTGCCACTCCTGATGACGTTCCCACTTCACTTTGCTGCTCCCGGC
      T S N N I A T P D D V P N F T L A A P G
961    CTCATCCAAGTCAAGAACCCTCTTGACGGAGGCAAGGCAAGCTACTCTGAC
      L I Q V K N P L D G G K A S Y S D

```

图4 EGt基因及其氨基酸序列

基因序列从天冬酰胺的密码子开始,它是用于设计5'端的引物的第1个氨基酸。与实验测定的N端序列相同的氨基酸用粗体及下划线标注

素。针对 EGt 基因在不同体系中的体外表达工作本室正在进行中。

令人惊奇的是,某些生存在中温环境中的微生物一直保持着产生耐热酶的能力。但是,通常这些耐热酶的分泌量都很少,可能正是利用这种高度的热活性来弥补分泌量的不足^[26]。例如,生活在深海中的嗜冷菌为抵御不良环境,在 15℃ 培养条件下能够产生中温的和一些热稳定性蛋白酶^[38,39], Brenchley^[40]也报道了嗜冷菌产生具有不同的最适温度的β-半乳糖苷酶。微生物产生多种同工酶可能有利于其适应复杂的生存环境,尤其是在高温或高盐等极端的环境中。这从一个侧面反映出环境条件下微生物菌种来源的复杂性和多样性。

本研究已经证明,中温菌中同样也存在耐热酶。EGt 与同一菌株来源的中温酶的比较研究正在进行中,这将了解其存在的意义提供更多的信息。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30370013, 30470051)和国家重点基础研究发展规划(批准号: 2003CB716006, 2004CB719702)资助项目。

参 考 文 献

- Warren R A J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 183~212
- Béguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 13: 25~58
- Lynd L R, Paul J, Weimer H, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66: 506~577[DOI]
- Bayer E A, Shoham Y, Lamed R. Cellulose-decomposing prokaryotes and their enzyme systems. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. eds. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2001. 1~74
- Dienes D, Egyházi A, Réczey K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Ind Crop Prod*, 2004, 20: 11~21[DOI]
- Duan X Y, Liu S Y, Zhang W C, et al. Volumetric productivity improvement for endoglucanase of *Trichoderma pseudokoningii* S-38. *J Appl Microbiol*, 2004, 96: 772~776[DOI]
- Bhat M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Bio-technol Adv*, 2000, 18: 355~383[DOI]
- Hongpattarkere T. Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzyme and their biotechnological applications. *J Sci*

- Technol, 2002, 24: 481~491
- 9 Huang X P. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen nov, sp nov. World J Microb Biot, 2004, 20: 85~92[DOI]
- 10 Canevascini G. Cellulolytic thermophilic fungi. In: Johri B N, Olson J, Satyanarayana T, eds. Thermophilic Moulds in Biotechnology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. 139~167
- 11 Manheshwari R, Bharadwaj G, Bhat M K. Physiology and enzymes of thermophilic fungi. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64: 461~488[DOI]
- 12 Vieille C, Zeikus G J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65: 1~43[DOI]
- 13 Li D C, Lu M, Li Y L, et al. Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. Enzyme Microb Technol, 2003, 33: 932~937[DOI]
- 14 Esperanza G G, Isabel M, Roncero G. Molecular characterization of a novel endo- β -1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. Curr Genet, 2001, 40: 268~275[DOI]
- 15 Ruiz-Roldán M C, Pietro A D, Huertas-González M D. Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants. Mol Gen Genet, 1999, 261: 530~536[DOI]
- 16 Christakopoulos P, Goodenough P W, Kekos D. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. Eur J Biochem, 1994, 224: 378~385
- 17 Christakopoulos P, Kekos D, Macris B J, et al. Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,4- β -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. J Biotechnol, 1995, 39: 85~93[DOI]
- 18 Christakopoulos P, Mamma D, Nerinckx W, et al. Purification and characterization of a less randomly acting endo-1,4- β -D-glucanase from the culture filtrates of *Fusarium oxysporum*. Arch Biochem Biophys, 1995, 316: 428~433
- 19 Gianni P, Dimitris K, Basil J M. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Ind Crop Prod, 2003, 18: 37~45[DOI]
- 20 Sulzenbacher G, Driguez H, Henrissat B. Structure of the *Fusarium oxysporum* endoglucanase I with a nonhydrolysable substrate analogue: Substrate distortion gives rise to the preferred axial orientation for the leaving group. Biochem, 1996, 35: 15280~15287[DOI]
- 21 Mandels M, Reese E T. Induction of cellulose in fungi by cellobiose. J Bacteriol, 1957, 73: 816~826
- 22 Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959, 31: 426~428[DOI]
- 23 Deshpande M V, Eriksson K E, Pettersson L G. An assay for selective determination of exo-1,4- β -glucanase in a mixture of cellulolytic enzymes. Anal Biochem, 1984, 138: 481~487[DOI]
- 24 Petrova S D, Bakalova N G, Koley D N. Catalytically important amino acid residues in endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp M7. Biochem(Moscow), 2005. BM04-307
- 25 Sambrook J, Russell D W. 黄培堂, 译. 分子克隆: 实验手册. 第3版. 北京: 科学出版社, 2001. 516~588
- 26 Jordaan J, Leukes W D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. Enzyme Microb Tech, 2003, 33: 212~219[DOI]
- 27 曹健, 郭德宪, 曾实. 里氏木霉纤维素酶的纯化和性质. 食品科学, 2003, 24(5): 72~75
- 28 曾家豫, 冯克宽, 马永录. 木霉 4131 菌株纤维素酶的分离纯化和部分性质的研究. 兰州大学学报(自然科学版), 1999, 35(1): 190~193
- 29 阎伯旭, 曲音波, 高培基. 色氨酸残基在内切葡聚糖酶分子中的作用. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14: 181~185
- 30 Sandgren M, Gualfetti P J, Paech C, et al. The *Humicola grisea* Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. Protein Sci, 2003, 12: 2782~2793[DOI]
- 31 Suzuki Y, Hatahaki K, Oda H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34: 707~714
- 32 Lu X M, Hu M, Zhao J, et al. Short time fermentation of wheat straw with fungi to produce bio-chemimechanical pulp. 9th international conference on biotechnology in the pulp and paper industry. Africa, 2004. 64~66
- 33 Bok J D, Yemool D. A, Eveleigh D E. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4774~4781
- 34 Ali M S, Akhand A A, Gomez P F, et al. Cellulase from *Humicola* spp. J Basic Microbiol, 1993, 33: 155~159
- 35 Davies G J, Ducros V, Lewis R. J, et al. Oligosaccharide specificity of a family 7 endoglucanase: Insertion of potential sugar-binding subsites. J Biotechnol, 1997, 57: 91~100[DOI]
- 36 Schülein M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. J Biotechnol, 1997, 57: 71~81[DOI]
- 37 Sheppard P O, Grant F, J, Oort P J. The use of conserved cellulose family-specific sequences of clone cellulase homologue cDNA from *Fusarium oxysporum*. Gene, 1994, 150: 163~167[DOI]
- 38 Chen X L, Zhang Y Z, Gao P J. Study on the different cold-adapted protease produced by the deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. SM 99155. Oceanologia Linnologia sinica, 2003, 34: 155~160
- 39 Oikawa T, Kazuoka T, Soda K. Paradoxical thermostable enzymes from psychrophile: Molecular characterization and potentiality for biotechnological application. J Mol Catalysis, B: Enzymatic, 2003, 23: 65~70[DOI]
- 40 Brenchley J E. Psychrophilic microorganisms and their cold active enzymes. J Ind Microbiol Biot, 1996, 17: 432~437[DOI]