

低聚木糖生产用里氏木霉木聚糖酶 选择性合成的研究现状

毛连山, 余世袁

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要:对低聚木糖生产用里氏木霉木聚糖酶选择性合成的研究现状进行了较全面的总结和评述。系统地介绍了里氏木霉木聚糖酶的多样性以及碳源、pH 和碳氮比等培养条件对合成内切木聚糖酶和木糖苷酶的影响, 提出了调控这些培养条件选择性合成低木糖苷酶活的木聚糖酶的方法。

关键词:低聚木糖; 里氏木霉; 内切木聚糖酶; 木糖苷酶; 选择性合成

中图分类号: Q556; TS245.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)02-0017-05

Present situation of research on selective biosynthesis of *Trichoderma reesei* xylanases for xylo-oligosaccharides production

MAO Lian-shan, YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The present situation of research on selective biosynthesis of *Trichoderma reesei* xylanases for xylo-oligosaccharides production is reviewed in detail. The multiplicity of *Trichoderma reesei* xylanase, and the effects of carbon source, pH value and ratio of carbon to nitrogen on synthesis of endo-xylanase and xylosidase are systematically reviewed, and the methods to controll these cultivation conditions to synthesise xylosidase-poor xylanases are put forward in order to make the xylanases better application in xylo-oligosaccharides production.

Key words: xylo-oligosaccharides; *Trichoderma reesei*; endo-xylanase; xylosidase; selective biosynthesis

低聚木糖是一种非消化性低聚糖, 能选择性增殖肠道内的双歧杆菌, 是一种优良的双歧杆菌增殖因子^[1-3], 其独特的生理活性和良好的理化特性使低聚木糖被认为是目前最有前途的功能性低聚糖之一。低聚木糖是利用木聚糖酶定向酶解木聚糖制备而成的。木聚糖酶是降解半纤维素木聚糖的一组酶的总称, 该酶系的组成比较复杂, 主要包括作用于主链的内切木聚糖酶和木糖苷酶。一般而言, 前者从主链内部作用于木糖苷链, 可随机将木聚糖主链降解成短链的低聚木糖, 而后者作用于短链的低聚木糖, 从非还原性末端释放出木糖^[4]。由于木聚糖酶的酶系中存在木糖苷酶, 导致低聚木糖产品中木糖的含量增高, 降低了低聚木糖的纯度和得率, 该技术的关键是如何培养出低木糖苷酶活的木聚糖酶, 为此, 国内外进行了大量的研究。本文系统地介绍了碳源、碳氮比、pH 对合成里氏木霉内切木聚糖酶和木糖苷酶的影响, 提出了调控这些培养条件制备高活力和高纯度的内切木聚糖酶的方法, 为选择性合

成适合于低聚木糖生产用木聚糖酶提供方法。

1 里氏木霉木聚糖酶的多样性

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是一种丝状真菌, 具有产木聚糖酶的水平一般比酵母菌和细菌都高, 所产的木聚糖酶为胞外酶, 便于酶的分离和提取, 可以同时产生降解木聚糖支链所必需的几种辅助酶等优点, 因此特别便于工业化推广应用。里氏木霉 Rut C-30 是野生的里氏木霉 QM6a 的诱变株, 由于其具有稳定的生理特性、较好的抗“代谢阻遏”能力及优质高产木聚糖酶和纤维素酶的能力, 在木聚糖酶和纤维素酶生产上被普遍被认为是最有工业推广价值的菌株^[5]。里氏木霉不仅纤维素酶基因和木聚糖酶基因是互相独立的, 可以通过培养条件的调控选择性地合成低纤维素酶活的木聚糖酶^[6], 而且内切木聚糖酶和木糖苷酶的合成也分别受不同的基因控制, 在适当的生长条件下有可能抑制木糖苷酶的合成, 从而选择性地合成低木糖苷酶活的木聚糖酶。

收稿日期: 2006-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070636) 和南京林业大学科技创新资助课题 (163030005)

作者简介: 毛连山 (1970-), 男, 博士, 副教授, 从事林产生物化学加工方面的研究, lianshan214@163.com。

里氏木霉木聚糖酶的多样性除了与遗传因素有关外,还与微生物的培养条件和后转化修饰作用有关。Torrönen 等^[7]通过分离纯化发现,在里氏木霉的培养液中有 2 种内切木聚糖酶 XYN I 和 XYN II,它们对木聚糖的亲合力不同,相对分子质量和等电点分别为 19 000、21 000 和 5.2、9.0,这 2 种木聚糖酶的酶活力占培养液总活力的 90% 以上;后来他们^[8]通过 X 射线衍射发现,这 2 种木聚糖酶的三维结构也不同,但二者氨基酸序列高度相似(大约有 50% 是相同的),XYN I 的活性部位较窄,只含有 3 个活性点,而 XYN II 有 5 个活性点,并且活性部位的氨基酸不同,因而这 2 种木聚糖酶的最适 pH 也不同。Arja 等^[9]发现,XYN II 有很多异构体,这些异构体分子质量相同,许多性质也相似,只是等电点不同,而且酶活力明显低于 XYN II。Xu 等^[10]发现,里氏木霉培养液中存在另一种内切木聚糖酶,通过氨基酸序列分析该内切木聚糖酶明显不同于 XYN I 和 XYN II,其相对分子质量和等电点分别为 32 000、9.1,用此酶水解桦木木聚糖,水解产物主要是木二糖、木三糖以及其他低聚木糖。研究还发现,这种酶只被纤维素和 L-山梨糖诱导,而不被木糖及其衍生物诱导。Tenkanen 等^[11]在里氏木霉的培养液中发现第 4 种内切木聚糖酶,这种木聚糖酶的相对分子质量与等电点分别是 43 000、7.0,与其他木聚糖酶相比,这种酶的异构体较多,但酶活力较低。里氏木霉培养液中除了内切木聚糖酶外,还有木糖苷酶。Poutanen 等^[12]发现,里氏木霉培养液中的木糖苷酶相对分子质量和等电点分别为 10 万、4.7,最适 pH 和温度分别是 4.0、60℃,这种酶同时具有阿拉伯呋喃糖醛酶的活性。直到 2005 年,Rojas 等^[13]才采用同步加速器小角 X 射线衍射和圆形二色性光谱对里氏木霉木糖苷酶的分子结构进行了详细分析。实际的木聚糖酶系的复杂程度可能更高,许多含量较少的木聚糖酶因分离纯化困难和在实际应用时作用小等原因而被研究者忽略。另外,在里氏木霉培养液中还发现阿拉伯呋喃糖醛酶^[14]和乙酰酯酶^[15]。因此由于里氏培养液中酶的组分较多,各种组分的测定方法不同,操作比较烦琐。2005 年,Markov 等^[16]发现采用色谱调焦和蛋白质片断鉴定相结合,可以辨认里氏木霉培养液中已知的所有酶,包括各种类型的纤维素酶,木聚糖酶以及阿拉伯呋喃糖醛酶、乙酰酯酶、甘露糖酶、牛乳糖酶、多聚半乳糖醛酶等其他辅助酶。

2 里氏木霉内切木聚糖酶和木糖苷酶合成的影响因素

2.1 碳源

在木聚糖酶的制备过程中,充当碳源的物质不但是微生物生长代谢的能量来源,而且也是酶合成诱导物的重要来源。碳源的类型和性质直接影响酶的活力和产率,同时碳源的成本也是影响酶生产成本的重要因素。因此,选择适宜的碳源是决定木聚糖酶生产的关键。

纯木聚糖被认为是许多丝状真菌合成木聚糖酶极好的碳源,并能专一性地诱导木聚糖酶的合成^[17]。但纯木聚糖制备成本很高,无应用价值,仅限于作实验室研究用的碳源。近年来的研究发现^[18],许多木霉属真菌以木质纤维原料(包括麦草、玉米芯、玉米秸秆、蔗渣、酒糟等)为碳源,可产生高活力的木聚糖酶。刘超纲等^[19]在研究不同碳源对里氏木霉产木聚糖酶影响时发现,纤维素和木聚糖的复合物对木聚糖酶的合成具有诱导作用,比以纯木聚糖为碳源产木聚糖酶的水平还高。Xiong 等^[20]研究认为,L-树胶醛糖与乳糖或葡萄糖的混合物是里氏木霉合成木聚糖酶的较好的碳源,以分批添料的方式加入碳源更能大幅度地促进木聚糖酶的合成。笔者^[6]以亚硫酸盐纸浆与木聚糖混合物为碳源,也能有效地促进里氏木霉合成木聚糖酶。显而易见,混合碳源似乎更有利于里氏木霉木聚糖酶的合成。Olsson 等^[21]研究认为,纤维素的存在更有利于里氏木霉合成内切木聚糖酶。

木糖苷酶的合成同样受碳源种类的影响,1995 年,Gasparic^[22]对由 *Prevotella ruminicola* B1 产生的木糖苷酶的研究发现,细菌在木聚糖培养基上生长比在葡萄糖培养基上生长产生的木糖苷酶活性高出至少 20 倍。2001 年,Tsujibo 等^[23]证明 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 木糖苷酶的活性可被桦木木聚糖、木二糖和木三糖所诱导,而单糖如木糖、阿拉伯糖和葡萄糖不能诱导木糖苷酶的合成。向含桦木木聚糖的培养基中加入葡萄糖可强烈抑制木糖苷酶的合成,这说明木糖苷酶对新陈代谢副产物的抑制作用十分敏感,而且木糖苷酶的合成受木聚糖诱导作用和葡萄糖抑制作用的双重控制。2004 年,Zanoelo 等^[24]对 *Scytalidium thermophilum* 木糖苷酶的研究发现,培养基中加入葡萄糖后可显著降低木糖苷酶的活性。Kristufek 等^[25]研究发现,里氏木霉木糖苷酶的活性可被木聚糖、木二糖和木三糖诱导,在木

聚糖或木二糖中添加甲基木糖苷更能促进木糖苷酶的合成,另外延长木糖存在的时间也能诱导木糖苷酶的合成。笔者^[26]在以酶解渣为碳源制备木聚糖时发现,低聚木糖含量较多的酶解渣能促进里氏木霉合成木聚糖酶,尤其能促进木糖苷酶的合成。因此为了能得到低木糖苷酶活的木聚糖酶,里氏木霉应以纤维素和少量的木聚糖混合物为碳源,并且这种木聚糖易被里氏木霉消耗利用。

2.2 氮源和碳氮比

在木聚糖酶的制备过程中,酶的合成同时受酶诱导物和酶蛋白质前体的调控,酶诱导物主要来自于可利用的碳源,而酶蛋白质的前体主要来自于氮源^[27],因此氮源和碳源一样,其类型和性质也会影响酶的活力和产率。另外,微生物酶的合成一般都有一个合适的碳氮比范围,碳氮比过低易造成微生物因氮源过多而生长过旺,进而对碳源消耗过快,导致酶合成水平下降;碳氮比过高则易造成微生物因氮源不足而生长缓慢,生命力减弱,也不利于酶的合成。

氮源的类型较多,不同类型的氮源其性质也不相同,对酶的活力和产率也有影响。蛋白胨含有菌种必需的氨基酸,酵母浸膏则含有大量的维生素,两者不仅可促进菌丝体生长,而且有利于产酶,都是产酶的较好氮源。Haapala等^[28]的研究表明,以固定化里氏木霉 QM6a 制备木聚糖酶时,氮源对产酶的影响比 pH 更为重要。洪枫^[29]在研究氮源对里氏木霉 Rut C-30 合成木聚糖酶影响时发现,酵母浸膏的产酶效果最好,其次是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。笔者^[30]研究发现,混合氮源比单一氮源更有利于里氏木霉合成木聚糖酶,将尿素、蛋白胨和酵母浸膏按一定的比例混合作为氮源的产酶效果最好。

碳氮比大小是影响微生物酶合成的又一重要因素。许多研究者认为微生物酶的合成一般都有一个合适的碳氮比范围。笔者^[31]在研究里氏木霉 Rut C-30 产木聚糖酶时发现,低碳氮比有利于促进内切木聚糖酶的合成,抑制木糖苷酶的合成。因为在低碳氮比培养下,由于存在的氮源较多,合成酶蛋白质的前体也就较多,微生物生长较快,消耗碳源速度也较快;对于富含木聚糖的木质纤维原料产酶,微生物总是首先利用其中易消化的木聚糖,随着碳源中木聚糖的减少,微生物同时利用纤维素,而葡萄糖对木糖苷酶具有抑制作用,导致木糖苷酶的合成量下降。

2.3 pH

以获取酶为目的的微生物培养过程大致可分成

3个阶段,即:微生物生长繁殖期、产酶期和产酶衰退期。在微生物培养前期主要是接种菌的生长繁殖,只有当菌丝体达到一定的浓度后才开始酶的大量合成。任何微生物都有一个合适生长的 pH 范围,因此,培养初期以及培养过程中 pH 直接影响微生物的生长和酶的合成。另外,微生物往往能同时产生好几种酶,每一种酶都有各自的最适生长 pH 和产酶 pH,可以通过调控培养初期以及培养过程中的 pH 来选择性合成某一种酶。

Dekker 研究认为^[32],里氏木霉 QM9414 合成木聚糖酶的最适 pH 为 4~5;同时 Poutanen 等^[33]研究认为,里氏木霉 QM9414 合成内切木聚糖酶的最适 pH 为 5.2,合成木糖苷酶的最适 pH 为 4.0。Bailey 等^[34]在研究里氏木霉 Rut C-30 合成木聚糖酶时发现,在培养过程中维持较高的 pH 似乎更有利于木聚糖酶的合成,并认为木聚糖酶合成的最适 pH 为 6.5~7.0,而且在此 pH 下能抑制纤维素酶的合成,提高木聚糖酶活和纤维素酶活的比值。Xiong 等^[35]研究认为,低 pH(4.0)有利于 XYN I 的合成,高 pH(6.0)有利于 XYN III 的合成,而 XYN II 在低 pH 和高 pH 都会合成。笔者^[36]研究发现,较高的初始 pH(6.0)有利于里氏木霉木聚糖酶的合成。洪枫^[29]在研究里氏木霉 Rut C-30 合成木聚糖酶时发现,内切木聚糖酶的最适 pH 为 4.0~5.0,而木糖苷酶的最适 pH 为 3.0~4.0,这对通过人工调控提高里氏木霉选择性合成内切木聚糖酶的能力具有指导意义。

3 里氏木霉木聚糖酶的诱导及低聚木糖生产用酶的选择性合成

木聚糖酶是诱导酶,木聚糖酶的大量合成受诱导物的调控。目前尽管研究人员对木聚糖酶的诱导合成机理尚不完全清楚,但普遍认为,微生物在利用木聚糖的过程中先靠分泌少量结构性酶使木聚糖降解,并产生少量可溶性低聚糖,这些低分子物质可透过细胞膜进入细胞并刺激微生物大量合成木聚糖酶^[37]。这种解释使人们有根据地认为木聚糖的降解产物是木聚糖酶合成的诱导物。后来的研究也证明^[38],木糖、木二糖、木三糖及其他可溶性低聚木糖对木聚糖酶的合成都具有诱导作用。其中最引人注目的是木二糖及其异构体,它们能够迅速地诱导一些真菌专一性地合成木聚糖酶^[39]。然而,在培养基中成倍地增大木二糖的浓度对木聚糖酶活的提高作用不大,而在木二糖中加入一定量的纤维二糖或乳糖却可以成倍地提高木聚糖酶活^[40],这种现象被

认为是由于这些非诱导性糖的加入不但可以提高菌丝的生长量,同时可以减慢木聚糖被消耗的速度,从而延长了诱导物的存在时间。Sternberg 等认为^[41],结构类似于木二糖的非代谢性 β -甲基-木糖苷对木聚糖酶的合成也具有诱导作用。另外许多研究表明^[42-43],槐糖和 L-山梨糖可以诱导里氏木霉同时产生纤维素酶和木聚糖酶,这种诱导产生的木聚糖酶大多是非专一性的,这种非专一性的木聚糖酶既可以降解木聚糖,又可以降解纤维素。

由于在大多数微生物木聚糖酶系统中都具有木糖苷酶,人们一直为木糖苷酶和内切木聚糖酶的合成是受共同的基因控制还是受不同的基因控制而感到困惑。Baba 等^[44]成功地实现了嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus* No.21)的内切木聚糖酶和外切- β -木糖苷酶的克隆基因在大肠杆菌上的表达,并且 2 种基因既可以同时表达,也可以单独表达。也就是说木聚糖酶的生产可按生产者的要求来进行,同一菌株既可生产内切木聚糖酶,也可生产木糖苷酶。Irie 等^[45]通过 ⁶⁰Co γ 射线对球毛壳霉菌株进行诱变,不仅大幅度提高了其产木聚糖酶的能力,同时也大大改善了木聚糖酶系。诱变后的球毛壳霉菌株的木聚糖酶活从初发菌株的 3.5×10^{-7} kat/g 提高到 4.017×10^{-5} kat/g(固态发酵),酶解产物的低聚木糖与木糖之比也从原来的 34:66 上升到 79:21。洪枫^[29]在研究初始 pH 对里氏木霉合成木聚糖酶影响时认为,低 pH 对内切木聚糖酶的合成有利,但更有利于木糖苷酶的合成,而且在低 pH 条件下木糖苷酶表现出较高的活性。笔者^[31]在研究里氏木霉 Rut C-30 产木聚糖酶时发现,低碳氮比有利于促进内切木聚糖酶的合成,抑制木糖苷酶的合成。由此可知,内切木聚糖酶和木糖苷酶对培养条件存在一定的差异,微生物具有选择性合成内切木聚糖酶的潜力。碳源和碳氮比对内切木聚糖酶和木糖苷酶的合成有着很大的影响,笔者^[46]以低分子质量木聚糖(质量浓度为 7 g/L)为碳源,将培养基的碳氮比降低为 4.0,调控培养 60 h,用该木聚糖酶酶解粗木聚糖,产物中低聚木糖含量占总糖的 86.32%。

4 结语

里氏木霉与其他微生物一样,其木聚糖酶酶系的组成非常复杂,每一种组分的合成分别受不同的基因控制,同时还与培养条件和后转化修饰作用有关。因此要提高里氏木霉内切木聚糖酶的选择性,最好的途径是采用基因工程技术改造微生物,去除

木糖苷酶的基因,使得微生物只能合成内切木聚糖酶;同时,碳源及其添加方式、氮源、碳氮比和 pH 等培养条件对微生物合成内切木聚糖酶和木糖苷酶都有影响,在适当的生长条件下可以抑制木糖苷酶的合成,从而选择性地合成低木糖苷酶活的木聚糖酶,使得该酶系的组成适合于低聚木糖生产;另外,内切木聚糖酶和木糖苷酶的分子质量差别较大,可以采用现代分离技术如超滤来将其分离,选择合适的操作条件(超滤膜的种类、操作压力、温度、进料速度等)去除培养液中的木糖苷酶,使得内切木聚糖酶得到纯化。

参考文献

- [1] 徐勇,余世袁,勇强,等.低聚木糖增殖双歧杆菌培养条件的影响[J].林产化学与工业,2001,21(3):34-38.
- [2] 郑建仙.功能性食品甜味剂[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 勇强,徐勇,余世袁,等.低聚木糖在饲料工业中的应用[J].饲料研究,2004(4):17-19.
- [4] Saddler J N. Bioconversion of forestry and agricultural plant residues [M]. Oxford: CAB International, 1993:131-182.
- [5] Tenkanen M, Puls J, Poutanen K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1992, 14(7):566-574.
- [6] 毛连山,勇强,姚春才,等.纸浆漂白用木聚糖酶的选择性合成[J].林产化学与工业,2005,25(1):56-62.
- [7] Torronen A, Mach R L, Messner R, et al. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: Characterization of both enzymes and genes [J]. Biotechnology, 1992, 10(11):1461-1465.
- [8] Torronen A, Rouvinen J. Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei* [J]. Biochemistry, 1995, 34(3):847-856.
- [9] Arja L, Matti S A, Nisse K, et al. Endoxylanase II from *Trichoderma reesei* has several isoforms with different isoelectric points [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2000, 31(1):61-68.
- [10] Xu J, Takakuwa N, Nogawa M, et al. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(6):718-724.
- [11] Tenkanen M, Saloheimo M, Biely P, et al. A novel xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* Rut C30 showing unique exo-action [C]//Courtin C M, Veraverbeke W S, Delcour J A. Recent advances in enzymes in grain processing [Proceedings of the European Symposium on Enzymes in Grain Processing]. 3rd. Belgium: University of Katholieke, 2002:41-46.
- [12] Poutanen K, Puls J. Characteristics of *Trichoderma reesei*-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 28(4/5):425-432.
- [13] Rojas A L, Fischer H, Eneiskaya E V, et al. Structural insights into the -xylosidase from *Trichoderma reesei* obtained by synchrotron small-angle x-ray scattering and circular dichroism spectroscopy [J]. Biochemistry,

- 2005,44(47):15578-15584.
- [14] Poutanen K. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Biotechnology, 1988,7(4):271-281.
- [15] Poutanen K, Sundberg M. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988,28(4/5):419-424.
- [16] Markov A V, Gusakov A V, Kondratyeva E G, et al. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei* [J]. Biochemistry (Moscow), 2005,70(6):657-663.
- [17] Gilbert M, Breuil C, Yaguchi M, et al. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thelavia terrestris* 255B [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1992,34/35:247-259.
- [18] Poutanen K, Ratto M, Puls J, et al. Evaluation of different microbial xylanolytic systems[J]. Journal of Biotechnology, 1987,6(1):49-60.
- [19] 刘超纲, 勇强, 余世袁. 纤维素和木聚糖复合诱导合成木聚糖酶的研究[J]. 林产化学与工业, 2001,21(1):69-73.
- [20] Xiong H R, Turunen O, Pastinen O, et al. Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004,64(3):353-358.
- [21] Olsson L, Christensen T M, Hansen K P, et al. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003,33(5):612-619.
- [22] Gasparic A, Martin J, Daniel A S, et al. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4: Sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1,4)-xylosidase activities[J]. Appl Environ Microbiol, 1995,61(8):2958-2964.
- [23] Tsujibo H, Takada C, Tsuji A, et al. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular beta-D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001,65(8):1824-1831.
- [24] Zanoelo F F, Polizeli Md Mde L, Terenzi H F, et al. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta-D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2004,31(4):166-170.
- [25] Kristufek D, Zeilinger S, Kubicek C P. Regulation of -xylosidase formation by xylose in *Trichoderma reesei* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995,42(5):713-717.
- [26] 毛连山, 徐勇, 宋向阳, 等. 以酶解渣为碳源制备木聚糖酶的研究[J]. 林产化学与工业, 2001,21(4):33-38.
- [27] Hrmova M, Bielek P, Vrsanaka M. Cellulose- and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger* [J]. Enzyme Microbiol Technol, 1989,11(9):610-616.
- [28] Haapala R, Parkkinen E, Suominen P, et al. Production of endo-1,4-glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei* [J]. Enzyme Microbiol Technol, 1996,18(7):495-501.
- [29] 洪枫. 里氏木霉合成木聚糖酶及制备功能性低聚木糖的研究 [D]. 南京:南京林业大学, 1998:50-60.
- [30] 毛连山, 勇强, 姚春才, 等. 培养基成分对里氏木霉合成木聚糖酶的影响[J]. 现代化工, 2005,25(suppl 1):151-153.
- [31] 毛连山, 宋向阳, 勇强, 等. 碳氮比对里氏木霉合成木聚糖酶的影响[J]. 林产化学与工业, 2002,22(3):41-44.
- [32] Dekker R F H. Bioconversion of hemicellulose: Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1983,25(4):1127-1146.
- [33] Poutanen K, Ratto M, Puls J, et al. Evaluation of different microbial xylanolytic systems [J]. Journal of Biotechnology, 1987,6(1):49-60.
- [34] Bailey M J, Buchert J, Viikari L. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993,40(2/3):224-229.
- [35] Xiong H R, von W N, Leisola M, et al. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30 [J]. Process Biochemistry, 2004,39(6):729-733.
- [36] 毛连山, 宋向阳, 勇强, 等. 初始 pH 值对里氏木霉合成木聚糖酶和纤维素酶的影响[J]. 南京林业大学学报, 2002,26(3):11-14.
- [37] Panda T. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804 [J]. Process Biochem, 1989,24(3):104-108.
- [38] Hrmova M, Petrakova E, Biely P. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose [J]. Journal of General Microbiology, 1991,137(3):541-547.
- [39] Biely P, Petrakova E. Glycosidic bond rearrangements in isomeric xylobioses by yeast xylan-degrading enzymes [J]. FEBS Letters, 1984,178(2):323-326.
- [40] Ghosh M, Nanda G. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994,60(12):4620-4623.
- [41] Sternberg D, Mandels G R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose [J]. Journal of Bacteriology, 1979,139(3):76176-76179.
- [42] Nisizawa T, Suzuki H, Nakayama M, et al. Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride* [J]. Journal of Biochemistry, 1971,70(3):375-385.
- [43] Xu J P, Nogawa M, Okada H, et al. Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7 [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1998,62(8):1555-1559.
- [44] Baba T, Shinke R, Nanmori T. Construction of xylose- or xylobiose-selective producing systems from xylan by utilization of genes coding thermostable xylan-degrading enzymes of *Bacillus stearothermophilus* No.21 [J]. Oyo Oshitsu Kagaku, 1996,43(3):373-376.
- [45] Irie T, Chiba K, Kutsuna T, et al. Breeding of *Chaetomium gracile mutant* 1161 for high yield xylobiose [J]. Hakkō Kagaku Kaishi, 1992,70(1):1-7.
- [46] 毛连山, 勇强, 姚春才, 等. 低聚木糖生产用木聚糖酶的选择性合成 [J]. 现代化工, 2004,24(suppl):132-134. ■