

β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因在大肠杆菌中共表达

高海有¹ 刘正初^{1*} 段盛文¹ 成莉凤¹ 石岩² 冯湘沅¹ 郑霞¹ 郑科¹ 宋志姣³

(1. 中国农业科学院麻类研究所 湖南 长沙 410205)

(2. 中南大学 冶金科学与工程学院 湖南 长沙 410083)

(3. 广西大学 林学院 广西 南宁 530004)

摘要:【目的】 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶都属于半纤维素酶,它们已经同时运用于工农业生产的许多领域。构建 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达菌株并进行相关评价。【方法】通过设计一个共同的酶切位点,将菌株*Bacillus subtilis* BE-91中的 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因串联到表达载体pET28a(+)上,转化大肠杆菌构建了一株能够共表达 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的菌株B.pET28a-man-xyl。【结果】菌株诱导21 h后,发酵液中 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活分别为713.34 U/mL和1455.83 U/mL,是胞内酶活的11.8倍和2.53倍。【结论】SDS-PAGE分析、水解圈活性检测和胞外酶与胞内酶酶活检测表明:两个酶均以功能蛋白独立分泌到胞外。此外,与 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶单独酶解半纤维素相比,复合酶的酶解效果更好。菌株的成功构建为复合酶制剂(半纤维素酶制剂)的研究和生产奠定基础。

关键词: β -甘露聚糖酶, 木聚糖酶, 大肠杆菌, 共表达

Coexpression of β -mannanase and xylanase genes in *Escherichia coli*

GAO Hai-You¹ LIU Zheng-Chu^{1*} DUAN Sheng-Wen¹ CHENG Li-Feng¹
SHI Yan² FENG Xiang-Yuan¹ ZHENG Xia¹ ZHENG Ke¹ SONG Zhi-Jiao³

(1. Institute of Bast Fibre Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

(2. Central South University School of Metallurgical Science and Engineering, Changsha,

基金项目: 国家麻类产业技术体系建设专项(No. nycytx-19-E21); 湖南省自然科学基金项目(No. 11JJ4021)

*通讯作者: Tel: 86-731-88998535; 信箱: ibfclzc@189.cn

收稿日期: 2011-09-05; 接受日期: 2011-11-09

Hunan 410083, China)

(3. Forestry College of Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract: [Objective] β -mannanase and xylanase are hemicellulase, which are already used in many areas of industrial and agricultural. The aim of this study was to coexpress two hemicellulase genes in *E. coli* (*Escherichia coli*). [Methods] The β -mannanase and xylanase genes were cloned from *Bacillus subtilis* BE-91, then linked together by a common restriction enzyme site and inserted into the pET28a(+), establishing a coexpression strain named B.pET28a-man-xyl for the extracellular production of β -mannanase and xylanase in *E. coli*. [Results] After being induced 21 h, the specific activities of β -mannanase and xylanase were 713.34 U/mL and 1455.83 U/mL, respectively. [Conclusion] The result of SDS-PAGE analysis, hydrolytic ring detection and enzyme activity determination showed that each enzyme was expressed extracellularly as individual functional proteins. In addition, comparing with β -mannanase and xylanase degraded hemicellulose alone, the effect of compound enzymes are much better. The successful construction of a strain which produces xylanase and β -mannanase will be helpful for the study and production of hemicellulases preparation.

Keywords: β -mannanase, Xylanase, *E. coli*, Coexpression

β -甘露聚糖酶和木聚糖酶都属于半纤维素酶, 它们已经广泛应用于许多领域。 β -甘露聚糖酶已经应用于饲料添加剂、石油压裂液破胶剂、洗涤剂添加剂, 并在造纸、纺织、寡糖生产等方面显示出了巨大的应用潜力^[1]。木聚糖酶的应用主要是制浆造纸工业领域以及饲料添加剂^[2]。从目前甘露聚糖酶和木聚糖酶的应用来看, 已经出现交叉结合, 所以构建两者共表达的菌株, 研究对底物的同时降解很有意义, 能够为今后复合酶制剂的生产和应用提供依据。最近已经报道了一些成功构建共表达复合酶菌株的例子, 黄生平^[3]构建了植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母。Niran roongsawang 等^[4]建立了产胞外植酸酶和木聚糖酶的毕赤酵母菌株。Je-Ruei Liu 等^[5]报道了 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶在路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)中共表达并将其表达产物用于饲料添加剂的研究结果。本实验室分离到 1 株木聚糖酶高产菌株——枯草芽孢杆菌 BE-91(*Bacillus subtilis* BE-91)^[6], 徐君飞等^[7]对其

生产的木聚糖酶进行了研究, 研究结果表明该菌株发酵液中的木聚糖酶活性为 408 U/mL。

植物细胞壁是由纤维素、半纤维素和其它聚合物(比如果胶质)缠绕成纤维状结构^[8-9], 一旦半纤维素和其它聚合物溶解并脱落, 纤维就能很容易地从麻杆韧皮上分离出来。出于苧麻纤维提取过程中对半纤维素降解的需要, 本研究拟将从 *Bacillus subtilis* BE-91 菌株中克隆到的 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因, 串联到表达载体 pET28a(+)上构建共表达质粒, 转化大肠杆菌 [*E. coli* BL21(DE3)]构建成 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达基因工程菌株, 并进行表达产物的相关研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Bacillus subtilis BE-91 菌株由中国农业科学院麻类研究所工程酶项目组分离与保存。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)菌株, 大肠杆菌表达质粒 pET28a(+)购自 Novagen 公司。

1.2 工具酶和生化试剂

高保真性 PCR 酶 Kod plus 购自 TOYOBO 公司; 基因组提取试剂盒 MasterPure™ DNA Purification Kit 购自 EPICENTRE 公司; T4 DNA Ligase, 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Xho* I 购自 TaKaRa 公司; 魔芋胶、燕麦木聚糖分别购自成都路特实业有限公司和 Sigma 公司; 台盼蓝购自鼎国生物技术公司, 其余的生化试剂都为分析纯级的商业化产品。

1.3 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达体系的构建

根据本实验室前期对 *Bacillus subtilis* BE-91 菌株 β -甘露聚糖酶基因、木聚糖酶基因(GenBank 登录号: GQ845010.2)的研究结果设计引物, β -甘露聚糖酶基因的扩增引物为 MBfor 和 MHrev, 酶切位点分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III, 木聚糖酶基因的扩增引物为 XHfor 和 XXrev, 酶切位点分别为 *Hind* III 和 *Xho* I, 引物序列见表 1。以 *Bacillus subtilis* BE-91 菌株的基因组 DNA 为模板扩增 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因, 用限制酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切扩增到的 β -甘露聚糖酶基因片段。同时, 用限制酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切扩增到的木聚糖酶基因片段, 然后, 将酶切片段连接到载体 pET28a(+)上生成质粒 pET28a-man 和质粒 pET28a-xyl 以及共表达质粒 pET28a-man-xyl, 转化到宿主细胞 *E. coli* BL21(DE3)。*E. coli* BL21(DE3)感受态的制备及其转化操作均按照《分子克隆》第 3 版进行^[10]。其中, 共表达质粒 pET28a-man-xyl 的图谱如图 1 所示, 通过限制性酶切位点 *Hind* III 连接 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因, 在 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶两个编码基因的连接处插入木聚糖酶基因的一段 5'-UTR (Untranslated regions, UTR)序列。

1.4 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达转化子

的筛选

从 LB (Luria-Bertani)平板上(含卡那霉素, 50 mg/L)随机挑取 3 个转化子进行分子生物学鉴定和水解圈活性检测。甘露聚糖酶活性检测平板是在 LB 平板中添加卡那霉素(50 mg/L)、台盼蓝(0.03%)、魔芋胶(1%)和 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside, 1×10^{-3} mol/L), 木聚糖酶活性检测平板是在 LB 平板中添加卡那霉素、木聚糖(1%)和 IPTG。

1.5 粗酶液和蛋白电泳样品的准备

挑取筛选出的转化子 B.pET28a-man-xyl 单菌落接种到 5 mL 的 LB 培养液(加入卡那霉素), 37 °C 过夜培养。取过夜培养菌液 4 mL 接种到 200 mL 的 LB 培养基中, 在 37 °C 摇床培养, 直到 OD_{600} 达到 0.67。然后加入 IPTG (1×10^{-3} mol/L), 降低温度到 30 °C、180 r/min 进行摇床诱导培养。从 0 h 诱导开始, 每隔 2 h 取出 8 mL 的发酵液, 于 4 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 分别收集上清液和菌体。菌体用预冷的 pH 6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液洗涤, 用等量的缓冲溶液重悬, 将菌体重悬液分别于-70 °C、15 min 和 55 °C、5 min 的条件下反复冻融 3 次, 以裂解细胞, 10 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 并收集上清液。与此同时, 诱导 8 h 时取 1 mL 菌液用于 SDS-PAGE 分析。

1.6 酶活单位的定义及测定

采用 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid)比色法^[11]测定 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活。 β -甘露聚糖酶酶活测定: 1 mL 适当稀释的粗酶液与 2 mL 预热至 65 °C 的浓度为 0.2%的魔芋胶(用 pH 6.0 柠檬酸-磷酸缓冲液配制), 于 65 °C 准确反应 5 min 后加入 2 mL DNS 终止反应。木聚糖酶酶活

表 1 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因扩增引物 Table 1 Primers of β -mannanase and xylanase gene	
引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
MBfor	CGC <u>GGATCC</u> GCGCATACTGTGTCGCCTGTG
MHrev	CGCA <u>AAGCTT</u> TTCACTCAACGATTGGCGTTAAAG
XHfor	CGCA <u>AAGCTT</u> ATTTACCTCAAAGTCGGA
XXrev	CGC <u>CTCGAGT</u> GATTAAGGATGATCTGTT

Note: Sequence under line are restriction sites.

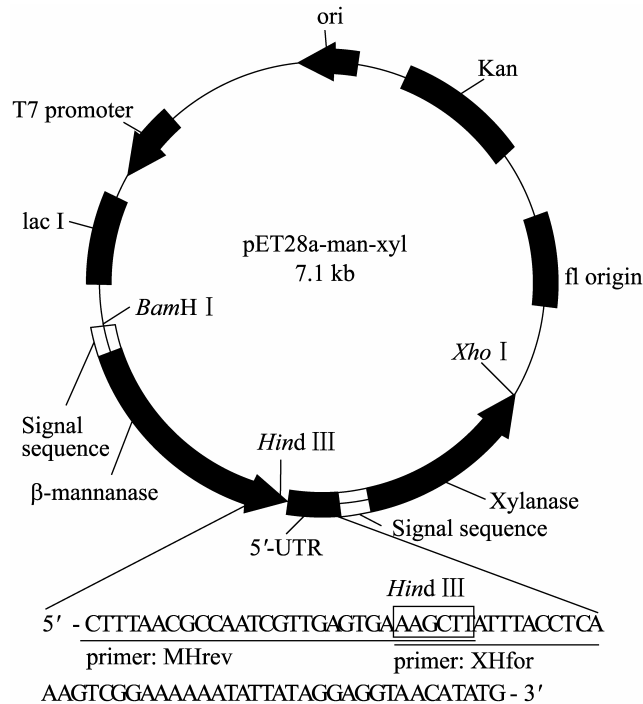


图 1 重组质粒 pET28a-man-xyl 的物理图谱
Fig. 1 Physical map of the recombinant plasmid pET28a-man-xyl

测定: 0.1 mL 适当稀释的粗酶液与 0.9 mL 预热至 60 °C 的燕麦木聚糖(用 pH 5.7 柠檬酸-磷酸缓冲液配制), 于 60 °C 准确反应 5 min 后加入 2 mL DNS 终止反应。同时取酶液煮沸灭活, 冷却后加入等量的底物反应, 作为对照。将上述反应液沸水浴 2 min, 测定 540 nm 时的吸光度。试验重复 3 次。上述条件下, 每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mL)。

1.7 苧麻半纤维素的制备及酶解反应

苧麻半纤维素制备^[12]: 用 4%的 NaOH 于

90 °C 浸泡麻杆粉碎物 2 h, 过滤得滤液, 用浓盐酸调 pH 4.5 后, 加入和滤液等体积的乙醇沉淀半纤维素, 13 000 r/min 离心收集沉淀, 用无水乙醇洗涤沉淀 2 次, 再将沉淀于 45 °C 下烘干即得半纤维素。

酶解反应: 取诱导 8 h 的粗酶液 0.1 mL, 与 0.9 mL 预热至 60 °C 的浓度为 0.5%的苧麻半纤维素(用 pH 6.0 柠檬酸-磷酸缓冲液配制)于 60 °C 反应。同时取 0.1 mL 粗酶液煮沸灭活, 冷却后加入 0.9 mL 底物, 做一组对照。从 0–30 min, 用 DNS

每 5 min 终止 3 个反应液, 测定 540 nm 时的吸光度。以 D-木糖为标准计算还原糖的生成量。

2 结果与分析

2.1 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达体系的构建

将扩增出的 β -甘露聚糖酶基因(1.05 kb, *Bam*H I-*Hind* III)和木聚糖酶基因(0.71 kb, *Hind* III-*Xho* I)插入到表达载体 pET28a(+)上, 生成质粒 pET28a-man、pET28a-xyl 和 pET28a-man-xyl, 转化在宿主细胞 *E. coli* BL21(DE3), 然后涂布到 LB 平板上(含卡那霉素, 50 mg/L), 经过适宜条件下培养, 获得了一批含有 pET28a-man、pET28a-xyl 和 pET28a-man-xyl 质粒的阳性转化子。

2.2 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达菌株的筛选与鉴定

从含有 pET28a-man、pET28a-xyl 和 pET28a-man-xyl 质粒的转化子平板上随机挑取转化子接种到 5 mL 含有卡那霉素的 LB 培养液中过夜培养, 点种到甘露聚糖酶活性检测平板和木聚糖酶

活性检测平板, 37 °C 培养 16 h 后观察平板水解圈。其中, 含有 pET28a-man-xyl 质粒的 3 个转化子在甘露聚糖酶活性检测平板上都能观察到明显的水解圈, 木聚糖酶活性检测平板上的 2 号转化子观察到明显的水解圈, 3 号转化子的水解圈比较微弱, 而 1 号转化子则没有水解圈(图 2)。经过反复在两种活性检测平板验证, 2 号转化子的水解圈大小稳定, 从而筛选到 B.pET28a-man-xyl 菌株并保存。

同时, 抽提过夜培养液的质粒 pET28a-man-xyl 进行 PCR 和双酶切检测, 质粒 PCR 和双酶切都检测到正确的条带(图 3)。图 3 中表现出酶切后的质粒条带不整齐, 分析认为是质粒酶切过程中核酸量的差异和酶切不完全造成的干扰。因为泳道 6 没有切出目的带, 但质粒 PCR 有条带(泳道 12), 条带微弱, 从而说明可能是酶切不完全, 且质粒核酸的量有差异。

此外, 与 B.pET28a-man-xyl 菌株比较, 含有 pET28a-man、pET28a-xyl 质粒的单基因阳性克隆菌株 B.pET28a-man、B.pET28a-xyl 在水解圈和酶活大小检测方面没有明显差异。

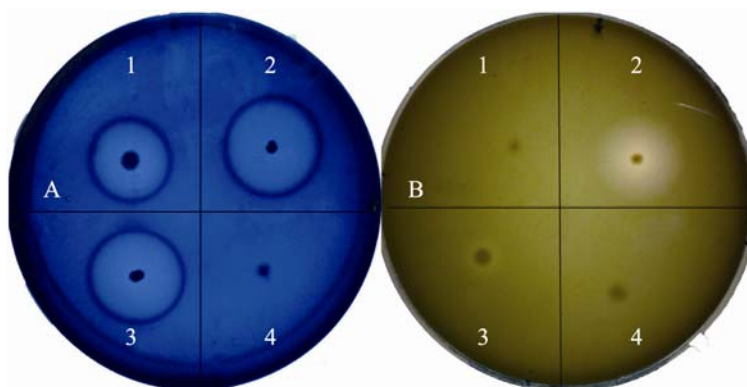


图 2 水解圈法检测转化子

Fig. 2 Hydrolytic ring detection of transformants

注: 平板 A (左边)加入了甘露聚糖, 用于检测甘露聚糖酶活性; 平板 B (右边)加入了木聚糖, 用于检测木聚糖酶活性。1、2、3: 含有质粒 pET28a-man-xyl 的转化子; 4: 对照。

Note: A (left): LB plate containing mannan for detecting β -mannanase activity; B (right): LB plate containing xylan for detecting xylanase activity. No. 1, 2, 3 are transformants containing pET28a-man-xyl plasmid; No. 4 is control.

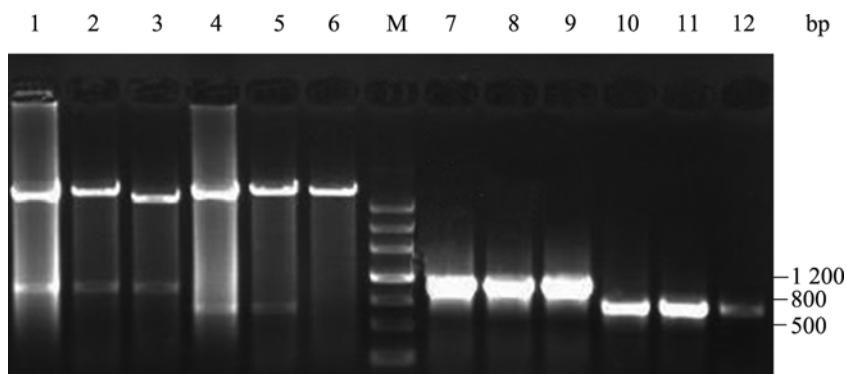


图3 转化子质粒 PCR 和双酶切检测

Fig. 3 Double digestion and PCR of recombinant plasmids

注: 1-3、4-6、7-9、10-12 分别是转化子 1、2 和 3. 1-3, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切; 4-6: *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切; M: 蛋白分子量子标准; 7-9: 引物 Bfor 和 Hrev 的 PCR 产物; 10-12: 引物 Bfor 和 Hrev 的 PCR 产物。

Note: Lane 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 are transformants 1, 2 and 3, respectively. 1-3: Double digested by *Bam*H I and *Hind* III; 4-6: Digested by *Hind* III and *Xho* I; M: Marker; 7-9: PCR fragments of plasmids by primers of Bfor and Hrev; 10-12: PCR fragments of plasmids by primers of Bfor and Hrev.

2.3 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达及酶活分析

筛选出的菌株 B.pET28a-man-xyl (转化子 2) 用于诱导表达。表达的 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶进行 SDS-PAGE 检测和酶活分析。与对照菌株 *E. coli* BL21(DE3) 相比较, B.pET28a-man-xyl 菌株在 35 kD 和 20 kD 附近出现两条明显的特异蛋白带(图 4)。根据核酸序列预测得到 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的分子量大小分别是 40.75 kD 和 23.31 kD, 两条带的大小与预测的一致。同时也表明, β -甘露聚糖酶和木聚糖酶是以独立的方式分泌的, 而不是融合蛋白的形式, 这也是表达蛋白具有活性的基础条件。上清液图谱中可以看出, 两种酶的表达量明显高出原始菌株, 且近乎是以 1:1 的比率进行表达的。

同时对菌株 B.pET28a-man-xyl 的胞外酶和胞内酶的产酶过程进行分析, β -甘露聚糖酶和木聚糖酶酶活见表 2。当 OD_{600} 达到 0.67 时, 菌株的酶活为 0, 随后加入 IPTG 诱导菌株 B.pET28a-man-xyl, 每 2 h 取样检测酶活性。诱导初期, 胞内酶酶活高于胞外酶, β -甘露聚糖酶和木聚糖酶分别在 4 h 和 6 h 时胞外酶酶活超过胞内酶, 在此

之后, 胞外酶酶活随诱导时间延长而上升, 而胞内酶酶活则趋于平衡。诱导 21 h 后, β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的胞外酶酶活分别为 713.34 U/mL 和 1 455.83 U/mL, 是胞内酶酶活的 11.9 倍和 2.53 倍, 胞外酶酶活占总酶活的 70% 以上。

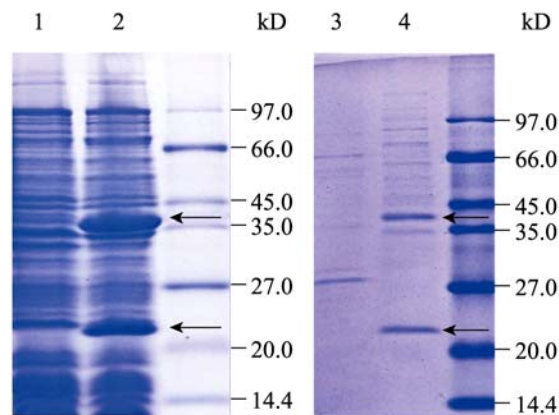


图4 菌株 B. pET28a-man-xyl 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of B.pET28a-man-xyl

注: 1、2: 对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)、菌株 B.pET28a-man-xyl 的全蛋白; 3、4: 菌株 *B. subtilis* BE-91、B.pET28a-man-xyl 的发酵上清液。

Note: 1, 2: Total protein of *E. coli* BL21(DE3) and B.pET28a-man-xyl, respectively; 3, 4: Extracellular supernatants of *B. subtilis* BE-91 and B.pET28a-man-xyl, respectively.

表2 菌株 B.pET28a-man-xyl 的 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶酶活
Table 2 Activity of β -mannanase and xylanase from B.pET28a-man-xyl

诱导时间 Induced time	酶活 Enzyme activity (U/mL)			
	β -甘露聚糖酶 β -mannanase		木聚糖酶 Xylanase	
	Intracellular	Extracellular	Intracellular	Extracellular
0	0	0	0	0
2	40.50	24.48	251.75	0
4	65.70	64.80	673.25	93.50
6	64.26	113.22	629.25	636.73
8	60.30	272.34	583.50	1 198.29
21	59.94	713.34	574.25	1 455.83

Note: One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol reducing sugar from the respective substrate per minute under the assay conditions.

2.4 苎麻半纤维素的酶解

从 40 g 的苎麻杆粉碎物中提取到半纤维素 3.7 g, 得率(半纤维素/麻杆粉碎物)为 9.25%。分别以 B.pET28a-man 菌株的甘露聚糖酶和 B.pET28a-xyl 菌株木聚糖酶, 以及 B.pET28a-man-xyl 的甘露聚糖酶-木聚糖酶复合酶降解半纤维素, 计算还原糖的生成量(表 3)。还原糖的生成量表明, 甘露聚糖酶-木聚糖酶复合酶的降解效率高于单一酶; 且复合酶反应 20 min 后, 还原糖的得率(还原糖的生成量/反应前半纤维素的量 450 μ g)超过 80%。

3 讨论

本研究中, 通过将 β -甘露聚糖酶基因和木聚

糖酶基因以酶切位点连接的方式串联到表达载体 pET28(+)上转化大肠杆菌, 构建了一株 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶共表达菌株。实验结果表明, 两个酶以独立的方式分泌。根据 SDS-PAGE 得出的蛋白大小, 与 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的开放阅读框(Open reading frame, ORF)预测的大小一致。质粒测序结果证明插入片段连接正确。酶活测定结果表明, β -甘露聚糖酶和木聚糖酶都是胞外分泌, 为后续酶的分离纯化以及应用提供了便利, 节约了生产应用成本。 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活都高于基因来源的野生菌株 *Bacillus subtilis* BE-91^[6], 并且远高于 Je-Ruei Liu 等^[5]报道的路氏乳杆菌共表达的 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶。同时, 甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活分别高

表3 酶解苎麻半纤维素生成还原糖的量
Table 3 Reducing sugar volume of production from ramie hemicellulose

酶解反应时间 Reaction time (min)		0	5	10	15	20	25	30
还原糖生成量	MX	0	262.95	329.13	339.93	347.84	365.52	371.32
Reducing sugar volume (μ g)	X	0	111.59	174.55	223.66	227.99	237.68	242.13
	M	0	127.03	144.28	146.85	145.02	144.65	143.18

Note: MX, X, M are mannanase-xylanase, xylanase, mannanase, respectively. D-mannose as standard to calculate the production of reducing sugar degraded by mannanase, and D-xylose as standard to calculate the production of reducing sugar degraded by mannanase-xylanase and xylanase.

于黄生平等^[3]和 Niran roongsawang 等^[4]构建的酵母受体共表达菌株, 是他们所报道的 10 倍以上。相比以酵母为受体构建的表达菌株, 大肠杆菌原核表达菌株的优势在于其生长迅速, 能在短时间内就达到较高的酶活。

为了对复合酶的催化效率进行检验, 对复合酶与单一酶分别降解半纤维素进行试验研究。结果表明, 复合酶的催化效率高于单一酶, 尤其是刚开始反应的短时间内, 复合酶降解半纤维素生成还原糖的量大于单一酶降解反应的总和。由于苕麻杆半纤维素以木聚糖为主, 以 D-木糖为标准计算复合酶降解半纤维素生成还原糖的量, D-木糖的分子量小于 D-甘露糖, 使得结果略微偏小。所以在半纤维素降解反应的后期, 单一酶降解半纤维素生成还原糖的总量大于复合酶是符合实验结果的。

生物加工过程中, 对样品的酶解处理常常不是单一的酶就能完成的, 尤其是对粗样品的处理。同时, 复合酶的使用有时候能够获得比单酶叠加更好的效果。Amany L. Kansoh 等^[13]已经报道了来自于菌株 *Streptomyces galbus* NR 的甘露聚糖酶和木聚糖酶用于针叶木硫酸盐纸浆的生物漂白, 发现木聚糖酶用于纸浆漂白效果更佳, 而同时加入两种酶比顺序加入效果更好。当甘露聚糖酶和木聚糖酶联合使用时, 能增加还原糖的产生和单级漂白 κ 值的降低^[14]。植物源性动物饲料含有一些反营养因子, 因此, 商业化饲料中常常添加有消化酶, 如木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、淀粉酶等^[15]。构建复合酶生产基因工程菌株能降低饲料添加剂的成本, 同时有助于生物加工过程中改进工艺, 提高效率。毕竟野生菌株存在产酶活性低、产酶种类复杂等原因, 不利于生产应用。大肠杆菌不利于饲料等方面的生产应用, 接下来可能会研究以酵母为受体的共表达菌株, 同时研究表达其它的苕麻脱胶关键酶。

在本研究中还发现, 菌株 B.pET28a-man-xyl 发酵获得的胞外粗酶液及菌体裂解酶液在 4 °C 保存半个月后, 酶活力依然没有降低, 说明其稳定性很好。

参 考 文 献

- [1] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2008, 27(4): 197–216.
- [2] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2001, 56(3/4): 326–338.
- [3] 黄生平, 汪昌丽, 张桂敏, 等. 植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的构建和产酶分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 280–284.
- [4] Roongsawang N, Promdonkoy P, Wongwanichpokhin M, et al. Coexpression of fungal phytase and xylanase utilizing the cis-acting hydrolase element in *Pichia pastoris*[J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(7): 909–916.
- [5] Je-Ruei Liu, Bi Yu, Xin Zhao, et al. Coexpression of rumen microbial β -glucanase and xylanase genes in *Lactobacillus reuteri*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 77(1): 117–124.
- [6] Liu ZC, Dai XY, Zhang JZ, et al. Screening of a xylanase high-producing strain and its rapid separation and purification[J]. Annals of Microbiology, 2011, published online 03 May.
- [7] 徐君飞, 刘正初, 张居作, 等. 木聚糖酶高产菌株 BE-91 发酵工艺的优化[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 247–251.
- [8] Minic Z, Jouanin L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(7/9): 435–449.
- [9] Ding SY, Xu Q, Crowley M, et al. A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(3): 218–227.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New

- York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [11] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [12] Preece IA. Some hemicellulose extraction methods[J]. Biochemical Journal, 1944, 38(5): 402–408.
- [13] Amany L Kansoh, Zeinat A Nagieb. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103–114.
- [14] Clarke JH, Davidson K, Rixon JE, et al. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2000, 53(6): 661–667.
- [15] Cowieson AJ. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers[J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 119(3/4): 293–230.

(上接 p.343)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>