



牛瘤胃纤维素酶 eg 基因在乳酸菌中的克隆表达及酶学性质分析

邹爱爱 魏亚琴 杨宇泽 曹磊 孙康永杰 万学瑞 王川

Expression of the eg gene of cellulase from cattle rumen in *Lactobacillus* and analysis of enzymatic properties

ZOU Aiai, WEI Yaqin, YANG Yuze, CAO Lei, SUN Kangyongjie, WAN Xuerui, WANG Chuan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

棘孢木霉葡聚糖酶基因Glu1的克隆及原核表达

Cloning and prokaryotic expression of the glucanase gene Glu1 from *Trichoderma asperellum*

草业科学. 2018, 12(7): 1685 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0463>

烟曲霉纤维二糖水解酶 cbh 基因在大肠杆菌中的表达

Expression of the cellobiohydrolase gene of *Aspergillus fumigatus* in *Escherichia coli*

草业科学. 2020, 37(12): 2457 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0107>

葡萄风信子花青素3-O-葡糖基转移酶基因的克隆及其表达分析

Cloning and expression analysis of anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase gene in Grape hyacinth

草业科学. 2017, 11(11): 2235 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0049>

纤维素分解菌与乳酸菌复合发酵条件的响应曲面优化分析

Condition of fermentation combined with cellulose decomposing and lactic acid bacteria based on the response surface method

草业科学. 2018, 12(3): 703 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0267>

盐生植物四翅滨藜Actin基因片段的克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of an Actin gene fragment from the halophyte *Atriplex canescens*

草业科学. 2017, 11(3): 515 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0157>

长叶红砂RtMYB1基因的克隆及表达

Cloning and expression analysis of RtMYB1 gene from *Reaumuria trigyna*

草业科学. 2018, 12(6): 1416 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0354>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0001

邹爱爱, 魏亚琴, 杨宇泽, 曹磊, 孙康永杰, 万学瑞, 王川. 牛瘤胃纤维素酶 *eg* 基因在乳酸菌中的克隆表达及酶学性质分析. 草业科学, 2021, 38(12): 2471-2480.

ZOU A A, WEI Y Q, YANG Y Z, CAO L, SUN K Y J, WAN X R, WANG C. Expression of the *eg* gene of cellulase from cattle rumen in *Lactobacillus* and analysis of enzymatic properties. Pratacultural Science, 2021, 38(12): 2471-2480.



牛瘤胃纤维素酶 *eg* 基因在乳酸菌中的 克隆表达及酶学性质分析

邹爱爱¹, 魏亚琴², 杨宇泽³, 曹磊¹, 孙康永杰¹, 万学瑞¹, 王川¹

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省科学院生物研究所/
甘肃省微生物资源开发利用重点实验室 / 厌氧微生物中心, 甘肃 兰州 730000; 3. 北京市畜牧总站, 北京 100107)

摘要: 为构建高效表达的内切葡聚糖酶基因工程菌, 本研究以牛瘤胃液中微生物全基因组为模板, 通过 PCR 扩增方法得到 *eg* 片段, 将其克隆至表达载体 pMG36e 中获得分泌型表达载体 pMG36e::*eg*; 将测序正确后的重组质粒电转导到乳酸菌 (*Lactococcus lactis* NZ9000) 中, 得到 *L. lactis* NZ9000/pMG36e::*eg* 重组菌株, 将发酵上清液通过 10% 三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA)/丙酮沉淀法浓缩蛋白后, 用刚果红染色法和 3, 5-二硝基水杨酸 (3, 5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 法检测该蛋白酶活性, 使用滤纸酶活力 (filter paper enzyme activity, FPA) 法检测该蛋白酶的总酶活, 并对重组内切葡聚糖酶进行酶学性质研究。结果表明: 从牛瘤胃微生物中克隆得到一个基因大小为 1 500 bp 左右的条带, 该酶分子量为 50 kDa 左右, 经刚果红染色有明显水解圈, 水解圈直径为 2.32 cm; 采用 DNS 法测定该重组蛋白的酶活为 12.401 9 U·mL⁻¹, 用 FPA 法测定总酶活为 12.246 9 U·mL⁻¹; 重组蛋白酶对羧甲基纤维素钠、滤纸、微晶纤维素、脱脂棉均有酶活性; 最适反应温度为 90 °C; 最适反应 pH 为 6; 其中 Cu²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Co²⁺ 等均可以提高重组酶的酶活力, 而 Fe²⁺ 可抑制重组内切葡聚糖酶活力。本试验纤维素酶 *eg* 基因在 *L. lactis* NZ9000 中的稳定高效表达为提高青贮饲料的营养价值和消化率提供了技术支持。

关键词: 内切葡聚糖酶; *eg* 基因; 乳酸菌; 克隆; 蛋白表达; 酶活; 酶学性质

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2021)12-2471-10

Expression of the *eg* gene of cellulase from cattle rumen in *Lactobacillus* and analysis of enzymatic properties

ZOU Aiai¹, WEI Yaqin², YANG Yuze³, CAO Lei¹, SUN Kangyongjie¹, WAN Xuerui¹, WANG Chuan¹

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China;

2. Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application of Gansu Province, Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences / Center of Anaerobic Microbes, Lanzhou 730000, Gansu, China;

3. Beijing Animal Husbandry Station, Beijing 100107, China)

Abstract: In order to construct highly expressing endoglucanase genetically engineered bacteria, the whole genome of the microorganism in bovine rumen juice was used as a template in this study, and the *eg* fragment was obtained by PCR

收稿日期: 2021-01-05 接受日期: 2021-04-07

基金项目: 甘肃省科技计划项目重点研发计划 (18YF1NA077); 甘肃农业大学动物医学院学科建设基金 (GSAU-XKJS-2018-074); 甘肃省科学院科技产业化项目“牦牛瘤胃厌氧真菌基因重组工程菌发酵生产木质纤维素降解酶的研究”; 甘肃农业大学 2020 年学生科研训练计划 (SRTP-202003018)

第一作者: 邹爱爱 (1996-), 女, 甘肃庄浪人, 在读硕士生, 研究方向为兽医微生物与免疫。E-mail: 2286410571@qq.com

通信作者: 万学瑞 (1979-), 女, 甘肃白银人, 副教授, 硕导, 博士, 研究方向为动物病原微生物分子生物学及其致病机制。E-mail: wanxr@gsau.edu.cn

共同通信作者: 王川 (1981-), 男, 甘肃甘谷人, 副教授, 硕导, 博士, 研究方向为微生物功能基因组学。E-mail: wangchuan@gasu.edu.cn

amplification In order to construct genetically engineered bacteria with high endoglucanase expression, we used the whole genomes of microorganisms in bovine rumen juice as a template. We obtained a fragment containing the *eg* gene of cellulase by PCR amplification, which was cloned into the expression vector pMG36e to yield the expression vector pMG36e::*eg*. Recombinant plasmids containing the pMG36e::*eg* construct were electrotransduced into lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* NZ9000) to obtain an *L. lactis* NZ9000/pMG36e::*eg* recombinant strain, and the fermentation supernatant of the recombinant strain was concentrated using the 10% trichloroacetic acid/acetone precipitation method. Enzyme activity of the recombinant endoglucanase was determined using the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) and Congo red staining methods, total enzyme activity was determined using the filter paper enzyme activity (FPA) method, and enzymatic properties were examined. A gene of approximately 1 500 bp was cloned from a bovine rumen microorganism and the molecular weight of the encoded enzyme was approximately 50 kDa. Congo red staining analysis revealed that the recombinant enzyme caused a clear 2.32 cm zone of hydrolysis. The enzyme activity of the recombinant protein was $12.401\ 9\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ based on the DNS method and $12.246\ 9\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the FPA method. Furthermore, the recombinant protease has enzymatic activity on CMC-Na, filter paper, microcrystalline cellulose, and absorbent cotton. Enzyme activity was found to be optimal at a temperature of 90 °C and pH 6. Metal ions, including Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , and Co^{2+} , were found to promote activity of the recombinant enzyme, whereas Fe^{2+} inhibited recombinant endoglucanase activity. In this study, we thus demonstrated the stable high-efficiency expression of the cellulase *eg* gene in *L. lactis* NZ9000, the practical utilization of which will contribute to improving the nutritional value of silage and digestibility of cattle feed.

Keywords: endoglucanase; *eg* gene; *Lactobacillus*; clone; protein expression; enzyme activity; enzymatic property

Corresponding author: WAN Xuerui E-mail: wanxr@gsau.edu.cn

WANG Chuan E-mail: wangchuan@gasu.edu.cn

纤维素 (cellulose) 是植物细胞壁的主要成分, 木质纤维素生物质包括农作物和森林残留物, 是地球上最丰富的生物质资源^[1]。随着我国畜牧业的发展, 农作物秸秆等的纤维素产量越来越多, 为缓解环境污染和促进能源循环利用, 纤维素的生物降解现在已经开始被广泛研究。相比于化学和物理方法降解纤维素, 生物降解法更加环保和高效, 纤维素酶在生物降解利用纤维素的过程中起着关键作用^[2]。牛瘤胃液中的微生物能分泌出活性较高的纤维素酶^[3]。纤维素酶是纤维素降解的基础生物酶, 主要由外切 β -葡聚糖酶 (1, 4- β -D-glucan cellobilhydrolase, EC 3.2.1.91)、 β -葡萄糖苷酶 (β -1, 4-glucosidase, EC 3.2.1.21, BG) 和内切 β -葡聚糖酶 (1, 4- β -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) 组成^[4]。由 *eg* 基因所编码的内切葡聚糖酶作为纤维素酶系的主要成分, 其结构包括纤维素结合结构域 (cellulose binding domain)、连接桥 (linker) 和催化结构域 (catalytic domain), 这 3 种结构在纤维素降解中起着至关重要的作用^[5], 该酶通过切割纤维素分子内部的非结晶随机水解 β -1, 4 糖苷键, 将长链的纤维素分子截断, 产生大量含非还原性末端的小分子纤维素, 之后在外切葡聚糖酶

(由 *cbh* 基因编码) 和 β -葡萄糖苷酶 (BG) 的共同作用下将纤维素彻底降解成葡萄糖^[6], 从而实现纤维素的彻底降解, 目前纤维素酶已被广泛用于许多工业领域^[7]。

目前, 常见内切葡聚糖酶基因的表达系统有原核和真核表达系统, 其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达系统具有价格低廉、生长速度快、培养要求简单、重组子稳定等的优势, 在科研中得到广泛的应用^[8]。但大肠杆菌表达系统存在着表达的蛋白常以包涵体的形式出现, 导致蛋白纯化困难和活性降低等一些问题^[9]。乳酸菌为一种兼性厌氧菌, 在厌氧环境下可以大量繁殖, 它们产生的乳酸会导致生存环境中的 pH 下降从而阻断有害细菌的生长, 将乳酸菌添加至饲料中可以提高饲料的营养价值, 同时也可以防止饲料腐败变质^[10]。作为食品级的菌株, 具有 GRAS (generally recognized as safe) 认证资格^[10], 可被用作表达异源基因和抗原的递送载体, 并且在蛋白表达过程中不以包涵体的形式出现^[11]。科研中常利用乳酸菌构建的基因工程菌株在活菌疫苗、活性酶、细胞因子以及各种蛋白和多肽类等生产领域中显现出独特的优势和应用价值^[12]。为获得高产重

组内切葡聚糖酶的乳酸菌, 本研究通过提取牛瘤胃液全基因组作为模板, 克隆纤维素酶 *eg* 基因, 构建原核表达载体, 在乳酸菌中表达内切葡聚糖酶, 该工程菌株的构建为重组内切葡聚糖酶乳酸菌在饲料工业上的开发及利用提供了参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料

乳酸菌 (*L. lactis* NZ9000)、大肠杆菌 (*E. coli* DH5 α)、载体 pMG36e 均为甘肃农业大学动物医学院微生物实验室保藏; 牛瘤胃液 (插管抽取) 来源于天祝县某养殖场雄性黄牛。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 加水定容至 1 L, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min; LB 固体培养基添加 16 g 琼脂粉。GM17 液体培养基: 胰蛋白胨 5 g, 大豆蛋白胨 5 g, 牛肉膏 5 g, 酵母粉 2.5 g, 葡萄糖 5 g, 蔗糖 171 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, β -磷酸甘油二钠 (索莱宝公司) 19 g, 加水至 1 L, 115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min; GM17 固体培养基加 16 g 琼脂粉。GM17-CMC-Na 固体培养基: 在 1 L 的 GM17 固体培养基中加入 10 g 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na, 来源于索莱宝公司), 边加热边搅拌, 待 CMC-Na 溶解后, 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min, 用于刚果红染色。

1.2 试验方 法

1.2.1 牛瘤胃液微生物全基因组的提取及 *eg* 基因的克隆及序列分析

采用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取牛瘤胃液微生物全基因组^[13]。根据美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库公布的芽孢杆菌属的内切纤维素酶序列设计引物, 采用 DNASTar7.1 生物学软件设计引物: F:5'-CGAGCAAGAAGGAGATATACATGCAAAAAAAAGATTATCTCAGCTAATGAAACGGTCAATCTCTAA-3' (下划线为 *Sac* I 的酶切位点, 波浪线为添加的信号肽序列), R:5'-GCTCTAGACTAATTTGGTTCTGTTCCCA-3' (下划线为 *Xba* I 的酶切位点), 将扩

增出的 *eg* 基因与 pMD-18T 质粒连接后送至天津金唯智公司测序后进行 Blast 比对并下载同源性相近的序列构建系统发育进化树。以牛瘤胃液微生物全基因组为模板用 Taq 酶 (诺唯赞有限公司) 扩增目的基因 *eg*, PCR 反应体系为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并用 DNA 纯化回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 回收。

1.2.2 重组表达质粒的构建

使用两种内切酶 *Sac* I 和 *Xba* I (TaKaRa 公司) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 同时酶切 *eg* 基因和载体 pMG36e 1 h, 用 T4 DNA 连接酶 (Thermo Fisher 公司) 22 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接后转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 和提取质粒后用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切验证, 酶切验证正确后并送至金唯智公司进行测序分析。

1.2.3 重组质粒转化乳酸菌及阳性转化子的筛选

挑取划线培养的乳酸菌 NZ9000 单菌落接种于 5 mL GM17 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 2 d, 然后参照 Holo 和 Nes^[14] 的方法制作乳酸菌的感受态细胞, 取测序正确的重组质粒 DNA 1 μL (100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 加入到 10 μL 的感受态细胞中混合均匀后转移至预冷的电击杯中, 电击条件为 2 200 V, 200 Ω , 25 μF , 菌液复苏 3~4 h 后, 涂布于 GM17 (含 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 红霉素) 的固体平板上, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 挑取 GM17 平板上的单个菌落, 将菌液煮沸 10 min 后进行 PCR 验证, 验证正确的重组乳酸菌 NZ9000 用于后续试验。

1.2.4 重组质粒在乳酸菌中的表达

取验证正确的菌液按 1:100 的比例接种在 GM17 培养液中 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 48 h 后, 将菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 取发酵上清液用预冷的 10% TCA/丙酮沉淀蛋白质, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用预冷的丙酮洗涤沉淀 2 次, 室温放置 30 min, 晾干彻底去除丙酮后加入 1 mL ddH $_2\text{O}$ 溶解沉淀, 分别将重组乳酸菌的菌液、培养液的上清液、菌体超声破碎后的沉淀及重组蛋白和空质粒重组菌的菌液、培养液的上清液、菌体超声破碎后的沉淀制样后进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 重组内切葡聚糖酶的酶活检测

采用刚果红 (索莱宝公司) 染色法检测该蛋白酶

有无活性^[15],用DNS法测出重组内切葡聚糖酶OD_{550 nm}值(分光光度计)并计算出酶活值^[16],试验组为重组乳酸菌发酵上清液浓缩蛋白,对照组为空质粒重组菌发酵上清液的浓缩蛋白,使用滤纸酶活力(FPA)法检测总酶活^[17],利用刚果红染色法观察水解圈及其直径大小。

1.2.6 重组内切葡聚糖酶酶学性质初步研究

最适反应 pH: 在 50 °C 的条件下,以 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)作为底物,溶解在磷酸盐缓冲液(购于索莱宝公司)中,在 pH 4、5、6、7、8、9、10 的条件下用 DNS 法测定重组内切葡聚糖酶酶活值并计算出相对酶活力,最高酶活值记为 100%^[16]。

最适反应温度: 在 pH 为 6 的条件下,设置 30、50、60、70、90 °C 的温度梯度,以 1% CMC-Na 为底物,溶解在磷酸盐缓冲液中,用 DNS 法在各温度下测定重组蛋白的酶活力,最高酶活力记为 100%^[16]。

底物水解能力分析: 在 pH 为 6、反应温度为 50 °C 的条件下分别以 CMC-Na、滤纸(FPA)、脱脂棉、微晶纤维素(Avicel)为底物,溶解在磷酸盐缓冲液中,用 DNS 法测定重组蛋白酶活力,分析重组 EG 蛋白对不同底物的水解能力^[16]。

不同金属离子对重组内切葡聚糖酶活性的影响: 在 pH 为 6、反应温度为 50 °C 的条件下,以 1% CMC-Na 为底物,溶解在磷酸盐缓冲液中,反应体系中添加 5 mmol·L⁻¹ 的金属离子(BaCl₂、CaCl₂、NaCl、HgCl₂、FeCl₂、MgCl₂、MnCl₂、CoCl₂、ZnCl₂、CuCl₂、KCl),用 DNS 法测定重组内切葡聚糖的酶活力,同时以未加金属离子的重组乳酸菌粗酶液作为对照组,其酶活力计为 100%,以此确定各种金属离子对重组内切葡聚糖酶酶活的影响^[16]。

1.3 数据分析

将以上数据用 SPSS 19.0 软件的 ANOVA 进行单因素方差分析,并用 Duncan 法进行多重比较后,用 Graph Prism 8.0 软件绘制折线图和柱状图。

2 结果与分析

2.1 eg 基因的克隆及表达载体构建

经 PCR 扩增和核苷酸序列测定后可知该基因大小为 1 500 bp(图 1);在 NCBI 上通过 Blast 进行同源性比对,发现该基因序列与枯草芽孢杆菌(*Bacillus*

subtilis strain SRCM102748) 的 *eg* 基因相似性达 100%;根据基因序列通过 MEGA 7.0 软件构建系统进化树(图 2),发现试验所扩增的 *eg* 序列是来自 *Bacillus subtilis* strain SRCM102748 菌株(登录号为 CP028212.1)。分别用 *Sac* I 和 *Xba* I 内切酶同时酶切重组质粒 pMG36e::*eg* 和 pMG36e 空质粒进行验证,pMG36e::*eg* 质粒切出大小为 1 500 bp 左右的条带(图 1),获得的基因片段大小与预期大小相符,表明表达载体 pMG36e::*eg* 构建成功。

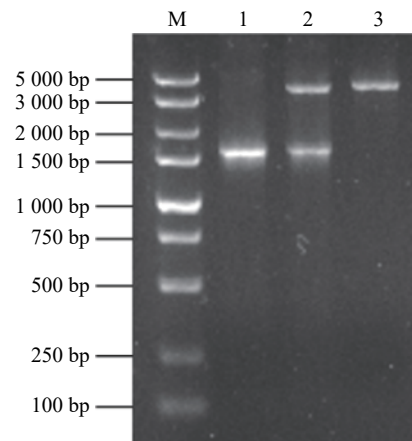


图 1 目的基因的 PCR 扩增产物及重组质粒双酶切鉴定
Figure 1 PCR amplification products of the target gene and identification of the recombinant plasmid by double enzyme digestion

M: DNA 分子质量标准; 1: *eg* 基因 PCR 产物; 2: pMG36e::*eg* 重组质粒双酶切; 3: pMG36e 空质粒双酶切。

M: DL5 000 DNA marker; 1: PCR products of the *eg* gene; 2: Double digestion of pMG36e::*eg* recombinant plasmid; 3: Double digestion of pMG36e empty plasmid.

2.2 eg 基因在乳酸菌中表达的 SDS-PAGE 分析

通过 10% TCA/丙酮沉淀法浓缩重组乳酸菌发酵上清液中的蛋白后,将重组乳酸菌的菌液、培养液的上清液、菌体超声破碎后的沉淀及空质粒重组菌的菌液、培养液的上清液和菌体超声破碎后的沉淀分别制样进行 SDS-PAGE 分析,结果表明:空质粒重组菌的菌液、上清液和沉淀均无目的蛋白出现,而重组乳酸菌培养液的上清液浓缩蛋白在 50 kDa 附近有明显的条带(图 3),表明有目的蛋白表达。

2.3 重组内切葡聚糖酶酶活力的测定

2.3.1 DNS 法和滤纸法测定重组内切葡聚糖酶的酶活力

用 DNS 法测得内切葡聚糖酶酶活为 12.401 9

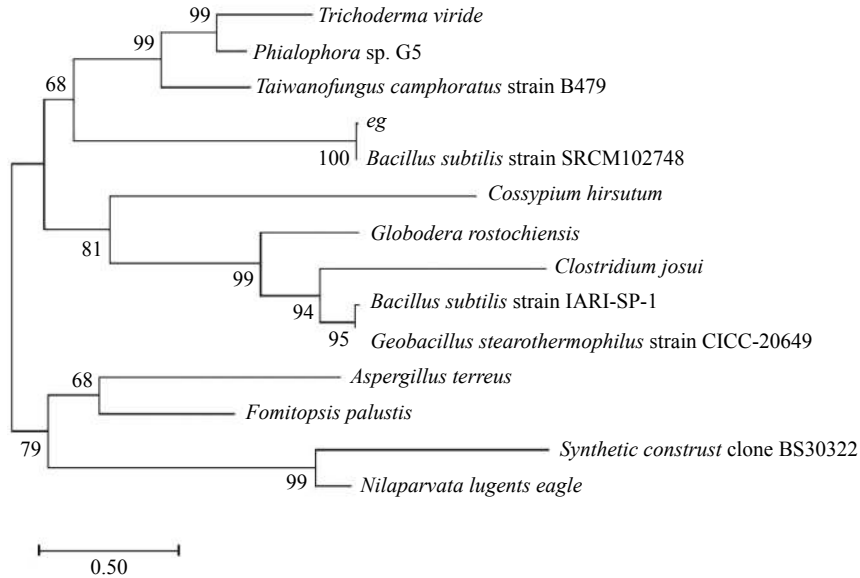


图 2 *eg* 序列系统发育树

Figure 2 A phylogenetic tree of the *eg* gene in different microbial species

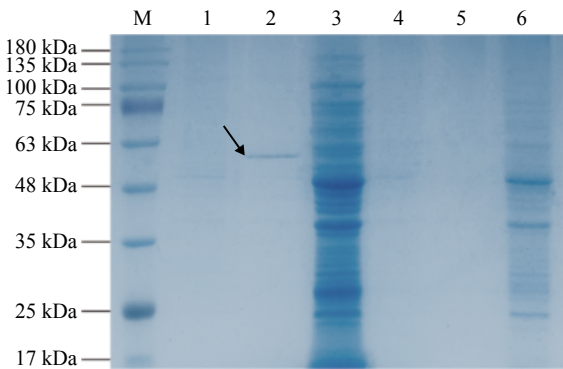


图 3 SDS-PAGE 电泳

Figure 3 SDS-PAGE electrophoresis

M: 蛋白质分子质量标准; 1、2、3 分别为 NZ9000/pMG36e::*eg* 重组菌的菌液、培养上清液的浓缩蛋白、菌体超声破碎后的沉淀; 4、5、6 分别为 NZ9000/pMG36e 空质粒重组菌的菌液、培养液的上清液、菌体超声破碎后的沉淀。

M: Protein markers; 1, 2, and 3 are NZ9000/pMG36e::*eg* recombinant bacterial suspension, protein concentrate in culture supernatant, and bacterial suspension after ultrasonic disruption, respectively; 4, 5, and 6 are NZ9000/pMG36e empty plasmid recombinant bacterial suspension, supernatant of the culture medium, and sediment after ultrasonic disruption, respectively.

$\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 滤纸法测得总酶活为 $12.2469\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 通过 SPSS 19.0 软件分析比较重组内切葡聚糖酶和对照组酶活力值发现, 试验组显著高于对照组酶活 ($P < 0.05$) (表 1), 说明该酶具有良好的酶活性。

2.3.2 重组内切葡聚糖酶刚果红染色

分别将经 SDS-PAGE 分析的样品和 ddH_2O 作

表 1 二硝基水杨酸法和滤纸法测定酶活力值
Table 1 Determination of enzyme activity using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and filter paper methods

方法 Method	酶活力 Enzyme activity/($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	试验组酶活值 Enzyme activities in the test group	对照组酶活值 Enzyme activity in the control group
DNS法 DNS method	$12.4019 \pm 0.0445a$	$0.5734 \pm 0.1402b$
滤纸酶活力法 Enzyme activity of filter paper	$12.2469 \pm 0.4475a$	$0.5790 \pm 0.1180b$

同行不同小写字母表示试验组与对照组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters within the same row indicate significant difference between the test and control groups at the 0.05 level.

为空白对照加入 GM17-CMC-Na 固体培养基中 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育反应 12 h 后, 发现空质粒 pMG36e 重组菌的菌液、培养液的上清液、菌体破碎后的沉淀和 ddH_2O 空白对照均无水解圈, 但重组菌培养液的上清液和重组蛋白酶出现明显的水解圈, 直径分别为 1.98 和 2.32 cm (图 4), 说明该蛋白为分泌型表达且具有酶活力。

2.3.3 重组内切葡聚糖酶的酶学性质分析

以 CMC-Na 为底物测定重组内切葡聚糖酶在不同 pH 下的酶活, 结果显示最适反应 pH 为 6; 在 pH 为 5~7 时耐受性良好; 在反应 pH 低于 5 时, 酶活性降到很低 (图 5A)。因此在研究重组蛋白酶的最适

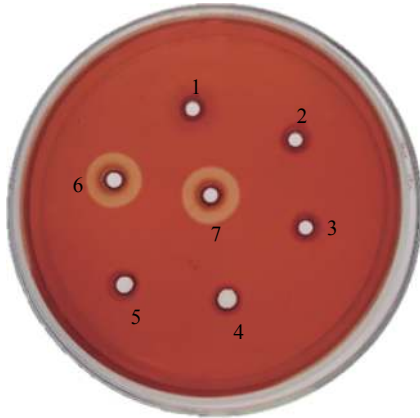


图4 刚果红染色水解圈

Figure 4 Congo red stain zones of hydrolysis

1、2、3分别为NZ9000/pMG36e空质粒重组菌的菌液、培养液的上清液、菌体超声破碎后的沉淀；4: ddH₂O；5、6、7分别为NZ9000/pMG36e::eg重组菌超声破碎后的沉淀、培养液的上清液、重组蛋白。

1, 2, and 3 are NZ9000/pMG36e empty plasmid recombinant bacteria suspension, culture medium supernatant, and cell sediment after ultrasonic disruption, respectively; 4: ddH₂O; 5, 6, and 7 are NZ9000/pMG36e::eg recombinant bacteria sediment after ultrasonic disruption, culture medium supernatant, and recombinant protein, respectively.

反应温度、不同底物的水解能力、不同金属离子对重组蛋白影响的试验中反应pH均为6。

重组内切葡聚糖酶以CMC-Na为底物，在反应pH为6的条件下，当反应温度低于70℃时，相对酶活力均低于60%，之后随着温度不断升高，酶活力也不断升高，当温度达90℃时重组内切葡聚糖酶的酶活值达到最高，最适反应温度为90℃(图5B)。

重组内切葡聚糖酶以CMC-Na、微晶纤维素、滤纸、脱脂棉为底物时均有一定酶活力，但以脱脂棉为底物时酶活力利用能力最低(图5C)。

重组内切葡聚糖酶以CMC-Na为底物，在反应pH为6、温度为50℃的条件下，Cu²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Hg²⁺、K⁺等均可以提高重组酶的酶活力，而Fe²⁺抑制重组内切葡聚糖酶的酶活力(表2)。

3 讨论

研究表明补充酶制剂可提高反刍动物的饲料利用效率，减轻环境污染并控制某些疾病^[18]。据报道瘤胃微生物产生的纤维素酶是迄今为止最活跃的酶之一^[19]，其中瘤胃中的芽孢杆菌(*Bacillus*)可分泌多种纤维素酶和淀粉酶，本研究成功地克隆到*Bacillus*

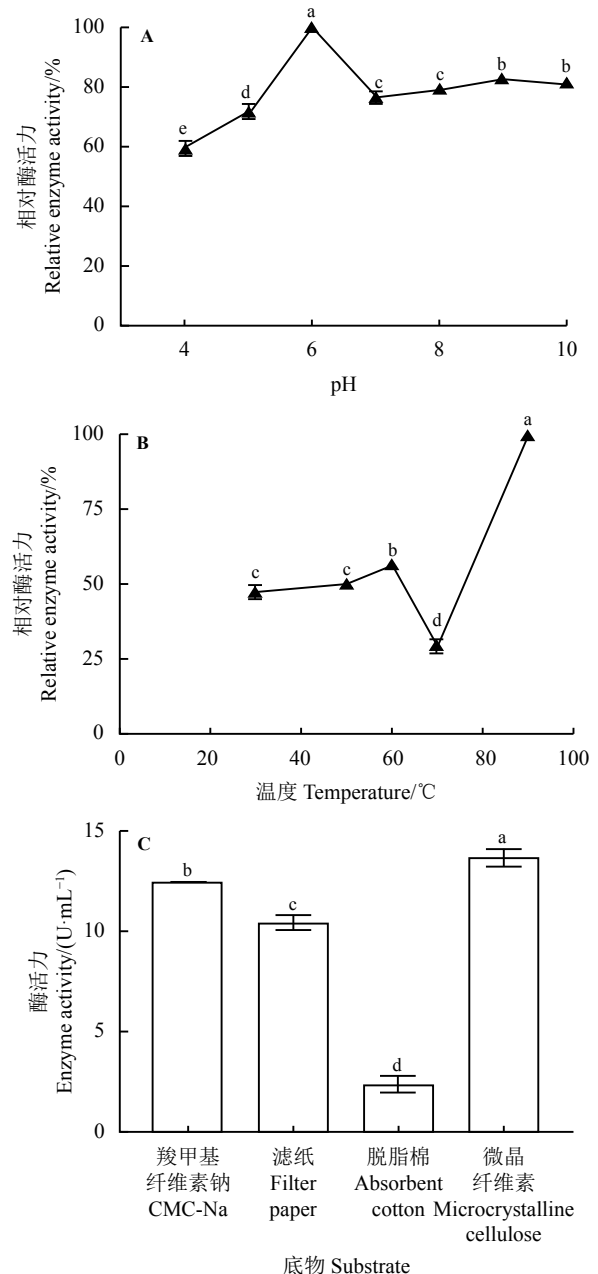


图5 重组内切葡聚糖酶酶学性质分析

Figure 5 Analysis of the enzymatic properties of the recombinant endoglucanase

A: 重组内切葡聚糖酶在不同pH下的相对酶活力；B: 重组内切葡聚糖酶在不同温度下的相对酶活力；C: 重组内切葡聚糖酶对不同底物的水解能力。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

A: Relative enzyme activity of recombinant endoglucanase at different pH values; B: Relative enzyme activity of the recombinant endoglucanase at different reaction temperatures; C: Hydrolysis capacity of the recombinant endoglucanase on different substrates. Different lowercase letters indicate significant difference between the different treatments at the 0.05 level.

的纤维素酶eg基因并在乳酸菌中完成了表达。但因自然来源*Bacillus*所产内切葡聚糖酶产量低、活

表 2 各种金属离子对重组内切葡聚糖酶相对酶活力的影响
Table 2 Effects of different metal ions on the relative enzyme activity of the recombinant endoglucanase

金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative enzyme activity/%
Cu ²⁺	151.54 ± 0.82
Mn ²⁺	138.06 ± 0.47
Ba ²⁺	127.86 ± 0.43
Mg ²⁺	117.30 ± 0.98
Fe ²⁺	90.35 ± 0.50
Hg ²⁺	118.76 ± 0.13
K ⁺	109.83 ± 0.20
Zn ²⁺	129.32 ± 0.08
Co ²⁺	135.15 ± 0.26
对照 Control	100.00 ± 0.03

性低、难回收等问题,可将内切葡聚糖酶基因在外源宿主中表达来解决这一问题。大肠杆菌表达系统因细胞快速生长、廉价的培养基和相对简单的培养方法等优点在科研中得到广泛应用。汤斌等^[20]在大肠杆菌系统中表达了 *eg2* 基因,酶活值为 1.321 U·mL⁻¹,但蛋白不能分泌至胞外;宝力德等^[21]通过在大肠杆菌中克隆表达枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 *eg* 基因,酶活力值达 683 U·L⁻¹,大多蛋白为包涵体表达。刘原子等^[22]扩增出多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) *eg* 基因,并在大肠杆菌中表达,测得酶活值为 2.427 U·mL⁻¹。虽然在该系统中可表达出重组内切葡聚糖酶,然而一些报告描述了重组蛋白在大肠杆菌表达系统中不能正确折叠且纯化困难,可能会产生非功能性蛋白质^[23],且大肠杆菌易引起动物机体损伤(如腹泻等),不易达到食品级的标准而难以满足工业生产需求。乳酸菌作为食品级的菌株,在蛋白表达过程中不以包涵体的形式出现,科研中常利用乳酸菌作为宿主细胞已成功表达出各种外源蛋白。Ozkose 等^[24]克隆了来源于牛瘤胃厌氧真菌的 *Neocallimastix sp.* 的纤维素酶基因并在乳酸菌中完成表达,并将该重组蛋白酶添加至青贮饲料发现可提高纤维素的降解率。乳酸菌表达系统 *L. lactis* NZ9000 是食品级安全表达系统且已被广泛应用,本研究所用质粒 pMG36e 来源于 pWV01 载体,该载体的强启动子 p32 具有可供多种细菌识别的核糖体位点可供表达蛋白,该质粒大小约为 3 600 bp,方便宿

主菌携带^[25]已在细菌表达系统中成功表达出各种酶^[26-28]。王翠艳等^[29]通过克隆绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 纤维二糖水解酶基因 *cbh II* 并利用质粒 pMG36e 完成在乳酸菌中的表达,测得重组蛋白酶活值达 16.7 U·mL⁻¹。本研究设计引物时在引物上游添加了一段信号肽序列,该段序列在基因表达过程中可引导蛋白向胞外持续分泌,实现高表达,将已克隆得到的 *eg* 基因序列连接表达质粒 pMG36e 后电转至乳酸菌中,成功分泌表达出内切葡聚糖酶,蛋白分子大小为 50 kDa 左右,与预期大小相符,1% 羟甲基纤维素钠 GM17 培养基验证时产生明显的水解圈,说明成功构建了分泌型表达载体,该内切葡聚糖酶活力值为 12.401 9 U·mL⁻¹。而王瑾等^[30]扩增出 *eg* 基因,并在乳酸菌中表达,但测得蛋白酶无活性。本研究获得的内切葡聚糖酶的酶活与 Nakazawa 等^[31]测定的酶活相比,提高了 24 倍,具有良好的酶活力。野生型的乳酸菌作为一类益生菌,是动物肠道的正常菌群,将其添加至饲料中可促进动物消化,提高动物免疫力,但无降解纤维素的能力^[32]。谢馨李畅等^[33]通过构建重组乳酸菌并将其添加至饲料中进行发酵,结果表明重组乳酸菌可对秸秆植物性饲料均发挥一定的降解作用。本研究所获得的重组内切葡聚糖酶的最适反应 pH 为 6,在 pH 为 5~7 时耐受性良好,pH 稳定性的结果高于在枯草芽孢杆菌 IARI-SP-1 (*Bacillus subtilis* IARI-SP-1)、地衣芽孢杆菌 AU01 (*B. licheniformis* AU01)、解淀粉芽孢杆菌 DL-3 (*B. amyloliquefaciens* DL-3) 等细菌上的报道^[34-36];各种金属离子对该重组内切葡聚糖酶的影响结果与朱泾等^[37]试验结果相一致;该重组蛋白酶对不同底物的水解能力结果与 Hakamada 等^[38]报道的在 *Bacillus sp.* KSM-S237 上的试验结果相似;该重组内切葡聚糖酶的最适反应温度可达 90 °C,是一种耐高温酶,市场潜力巨大,可广泛应用于多种耐高温的工业生产中。

4 结论

本研究成功将来源于牛瘤胃微生物的内切葡聚糖酶在乳酸菌系统中进行了克隆和表达,成功构建了分泌型重组内切葡聚糖酶的乳酸菌,并进行了酶学性质分析。重组内切葡聚糖酶的分子量约为 50 kDa,所用表达载体 pMG36e 不需要添加诱导剂诱导,只

需正常培养重组乳酸菌就可在培养基上清液中获得持续分泌的内切葡聚糖酶,检测到内切葡聚糖酶活力为 $12.4019\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;重组内切葡聚糖酶对CMC-Na、滤纸、微晶纤维素和脱脂棉均具有酶活力;最适反应温度为 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$;最适反应pH为6,在pH $5\sim 7$ 内具有较好的pH耐受性; Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、

Co^{2+} 等均可以提高重组蛋白的酶活力,而 Fe^{2+} 抑制重组内切葡聚糖酶活力。甘肃农业大学动物医学院微生物实验室正在将该重组内切葡聚糖酶作为纤维素酶制剂进行青贮发酵试验,将其添加至饲料中是否达到提高动物免疫力和饲料消化率的双重效果,还需要进一步验证。

参考文献 References:

- [1] SINGHANIA R R, PATEL A K, SUKUMARAN R K, LARROCHE C, PANDEY A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 500-507.
- [2] HAO F, LI M X. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. *Fuel Guildford*, 2015, 143: 211-216.
- [3] 杨天龙, 王淑玲, 顾招兵, 朱仁俊, 刘旭川, 张春勇, 杨舒黎, 毛华明, 冷静. 独龙牛瘤胃细菌纤维素酶基因克隆. *南方农业学报*, 2017, 48(5): 901-906.
YANG T L, WANG S L, GU Z B, ZHU R J, LIU X C, ZHANG C Y, YANG S L, MAO H M, LENG J. Cloning of cellulase gene from rumen bacteria of Dulong cattle. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(5): 901-906.
- [4] WANG H, SQUINA F, SEGATO F, MORT A, LEE D, PAPPAN K, PRADE R. High-temperature enzymatic breakdown of cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 5199-5206.
- [5] 赵士萍, 周敏, 蒋林树. 青贮饲料添加剂的研究进展. *中国农学通报*, 2016, 32(20): 6-10.
ZHAO S P, ZHOU M, JIANG L S. Research progress of silage additives. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(20): 6-10.
- [6] YU Y, YUAN J, WANG Q, FAN X, WANG P, CUI L. Noncovalent immobilization of cellulases using the reversibly soluble polymers for biopolishing of cotton fabric. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(4): 494-501.
- [7] GOMES D, DOMINGUES L, GAMA M. Valorizing recycled paper sludge by a bioethanol production process with cellulase recycling. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 637-644.
- [8] 黄国昌, 熊大维, 顾斌涛. 内切葡聚糖酶基因克隆和表达研究进展. *江西科学*, 2016, 34(1): 24-28, 51.
HUANG G C, XIONG D W, GU B T. Progress in cloning and expression of endoglucanase gene. *Jiangxi Science*, 2016, 34(1): 24-28, 51.
- [9] LIU Z L, LI H N, SONG H T, XIAO W J, XIA W C, LIU X P, JIANG Z B. Construction of a trifunctional cellulose and expression in *Saccharomyces cerevisiae* using a fusion protein. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 43.
- [10] 郝凤奇, 杨桂连, 叶丽萍, 王春风. “食品级”乳酸菌表达载体系统的研究进展. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(10): 824-830.
HAO F Q, YANG G L, YE L P, WANG C F. Research progress of “food grade” *Lactobacillus* expression vector system. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(10): 824-830.
- [11] 黄佳明, 姜宁, 张爱忠. 乳酸菌作为基因工程菌的研究进展. *中国饲料*, 2019(13): 16-20.
HUANG J M, JIANG N, ZHANG A Z. Research progress of lactic acid bacteria as genetic engineering bacteria. *China Feed*, 2019(13): 16-20.
- [12] 李争明, 张娟, 邓中洋, 卢凡, 秦文胜. 纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及发酵产酶条件优化. *生物技术通报*, 2015, 31(5): 146-152.
LI Z M, ZHANG J, DENG Z Y, LU F, QIN W S. Screening and identification of cellulase producing strains and optimization of fermentation conditions. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(5): 146-152.
- [13] WANG B, XIA L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4568-4572.
- [14] HOLO H, NES I F. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(12): 3119-3123.

- [15] NUC P, NUC K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochemii*, 2006, 52(4): 448-456.
- [16] 丁轲, 罗伟光, 丁盼盼, 李旺, 李元晓, 余祖华, 恒子铃, 贾艳艳, 程相朝. 双纤维素酶基因在乳酸杆菌中的融合分泌表达. *食品科学*, 2014, 35(15): 127-131.
DING K, LUO W G, DING P P, LI W, LI Y X, YU Z H, HENG Z Q, JIA Y Y, CHENG X C. Expression of the fusion and secretion of the double cellulase gene in *Lactobacillus*. *Food Science*, 2014, 35(15): 127-131.
- [17] 王婷婷. 饲用纤维素酶活力的测定方法. *养殖技术顾问*, 2014(10): 233-234.
WANG T T. Determination method of feed cellulase activity. *Technical Advisor for Animal Husbandry*, 2014(10): 233-234.
- [18] BEDFORD M R, SCHULZE H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 1998, 11(1): 91-114.
- [19] SELINGER L B, FORSBERG C W, CHENG K J. The rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 1996, 2(5): 263-284.
- [20] 汤斌, 张莹莹, 杨亚平. 葡枝根霉 TP-02 内切葡聚糖酶基因 *eg2* 的克隆表达及功能分析. *食品与发酵工业*, 2013, 39(7): 13-17.
TANG B, ZHANG Y Y, YANG Y P. Cloning, expression and functional analysis of endoglucanase gene *eg2* from *Rhizopus stolonifera* TP-02. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(7): 13-17.
- [21] 宝力德, 秦伟, 杨嘉萌, 邵影. *Bacillus*. sp. *bs-1* 的内切葡聚糖酶在大肠杆菌中表达条件的优化及其活性分析. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(5): 77-82.
BAO L D, QIN W, YANG J M, SHAO Y. *Bacillus*. sp. *bs-1* optimization of expression conditions and activity analysis of endoglucanase. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2013, 34(5): 77-82.
- [22] 刘原子, 王艳, 万学瑞, 王川, 吴润, 刘岗, 吴自祥. 多粘类芽孢杆菌纤维素酶基因 *bglA*、*bglB* 和 *eg* 在乳酸菌中的分泌表达. *草原与草坪*, 2017, 37(1): 8-13.
LIU Y Z, WANG Y, WAN X R, WANG C, WU R, LIU G, WU Z X. Secretory expression of cellulase genes *bglA*, *bglB* and *eg* of *Bacillus polymyxa* in lactic acid bacteria. *Grassland and Turf*, 2017, 37(1): 8-13.
- [23] ZUTZ A, NIELSEN L H, PEDERSEN L E, KASSEM M M, NIELSEN A T. A dual-reporter system for investigating and optimizing protein translation and folding in *E. coli*. *Nature Communications*, 2020, 12: 6093.
- [24] OZKOSE E, AKYOL I, KAR B, COMLEKCIOGLU U, EKINCI M S. Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia Microbiologica*, 2009, 54(4): 335-342.
- [25] 丁寅寅, 马会勤, 左芳雷, 郝彦玲, 陈尚武. 乳酸菌载体 pMG36e 的应用现状. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(11): 106-111.
DING Y Y, MA H Q, ZUO F L, HAO Y L, CHEN S W. Application status of pMG36e carrier for lactic acid bacteria. *Chinese Biotechnology*, 2009, 29(11): 106-111.
- [26] 向华, 刘敬忠. 欧芹苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 在乳酸乳球菌中的表达研究. *微生物学报*, 1999, 39(3): 196-204.
XIANG H, LIU J Z. Expression of phenylalanine deaminase cDNA from parsley in *Lactococcus lactis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(3): 196-204.
- [27] VAN DE GUCHTE M, KODDE J, VAN DER VOSSEN J M, KOK J, VENEMA G. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(9): 2606-2611.
- [28] 向华, 郭顺星. 人铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆和在乳酸乳球菌中的表达. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 6-9.
XIANG H, GUO S X. Cloning and expression of human copper zinc superoxide dismutase gene in *Lactococcus lactis*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(1): 6-9.
- [29] 王翠艳, 王玉华, 朴春红, 刘俊梅, 胡耀辉, 任大勇, 于寒松. 绿色木霉纤维二糖水解酶基因的克隆及其在乳酸菌中的表达与鉴定. *食品科学*, 2016, 37(19): 141-146.
WANG C Y, WANG Y H, PIAO C H, LIU J M, HU Y H, REN D Y, YU H S. Cloning of *Trichoderma viride* cellobiohydrolase gene and its expression and identification in lactic acid bacteria. *Food Science*, 2016, 37(19): 141-146.
- [30] 王瑾, 郭敏辰, 周晨妍. 内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌与毕赤酵母中的表达. *生物技术通报*, 2008(3): 110-114.
WANG J, WU M C, ZHOU C Y. Expression of endoglucanase gene in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 110-114.

- [31] NAKAZAWA H, OKADA K, KOBAYASHI R, KUBOTA T, ONODERA T, OCHIAI N, OMATA N, OGASAWARA W, OKADA H, MORIKAWA Y. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(4): 681-689.
- [32] 岳林芳, 成立新, 李蕴华, 凤英, 高爱武, 乔健敏, 王志铭, 于朝晖, 宝华. 益生菌在反刍动物生产中应用的研究进展. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40(9): 54-62.
YUE L F, CHENG L X, LI Y H, FENG Y, GAO A W, QIAO J M, WANG Z M, YU C H, BAO H. Research progress of probiotics in ruminant production. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2019, 40(9): 54-62.
- [33] 谢骛李畅, 杨雨鑫, 王小龙, 陈玉林. 桑天牛肠道微生物内切葡聚糖酶基因的克隆及在乳酸杆菌中的表达. *动物营养学报*, 2020, 32(3): 1344-1352.
XIE A L C, YANG Y X, WANG X L, CHEN Y L. Cloning and expression of endoglucanase gene from intestinal microorganism of *Apriona germari* in *Lactobacillus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(3): 1344-1352.
- [34] PANDEY S, KUSHWAH J, TIWARI R, KUMAR R, SOMVANSHI V S, NAINA L, SAXENA K A. Cloning and expression of β -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiological Research*, 2014, 169(9/10): 693-698.
- [35] ANNAMALAI N, RAJESWARI M V, ELAYARAJA S, BALASUBRAMANIAN T. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(1): 409-415.
- [36] LEE Y J, KIM B K, LEE B H, JO K I, LEE N K, CHUNG C H, LEE Y C, LEE J W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 2008, 99(2): 378-386.
- [37] 朱泾, 赵述淼, 彭楠, 梁运祥. 冰岛硫化叶菌 β -1, 4-内切葡聚糖酶的同源表达、纯化与性质. *华中农业大学学报*, 2011, 30(6): 674-679.
ZHU J, ZHAO S M, PENG N, LIANG Y X. Homologous expression, purification and characterization of β -1, 4-endoglucanase from *Sulfurophyllum icelandicum*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(6): 674-679.
- [38] HAKAMADA Y, KOIKE K, YOSHIMATSU T, MORI H, KOBAYASHI H, ITO S. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1997, 1(3): 151-156.

(责任编辑 张瑾)

如有印装质量问题, 请将原杂志寄回本刊编辑部, 由本部负责调换。