

向亚萍, 罗楚平, 周华飞, 等. 枯草芽孢杆菌分泌表达极耐热木聚糖酶及其酶学性质[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1037-1042.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.013

## 枯草芽孢杆菌分泌表达极耐热木聚糖酶及其酶学性质

向亚萍<sup>1,2</sup>, 罗楚平<sup>3</sup>, 周华飞<sup>1,2</sup>, 刘永锋<sup>2</sup>, 陈志谊<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院 江苏 南京 210095; 3. 淮阴工学院生化学院 江苏 淮安 223001)

**摘要:** 为将海栖热袍菌极耐热木聚糖酶基因 *xynB* (GenBank 登录号 AY340789) 在枯草芽孢杆菌 Bs916 中进行异源分泌表达, 并阐明工程菌分泌重组木聚糖酶的酶学性质。克隆极耐热木聚糖酶基因 *xynB*, 将其与罗克霉素启动子融合, 构建融合质粒载体 pXYNB2, 将其转化到枯草芽孢杆菌 Bs916 中, 获得重组枯草芽孢杆菌 (Bs916/pXYNB2), 并对重组芽孢杆菌分泌表达的极耐热木聚糖酶的酶学性质进行了研究。SDS-PAGE 法测定重组枯草芽孢杆菌分泌的蛋白在相对分子质量 43 000 处有明显的蛋白表达条带。重组木聚糖酶的最适反应 pH 值为 5.0~5.8, 重组木聚糖酶的最适反应温度大于或等于 100 °C, 重组极耐热木聚糖酶在 pH 值 4.6~7.8 比较稳定, 重组木聚糖酶的温度稳定性在 90 °C 下保温 2 h 后残存酶活 83%。可见, 生防枯草芽孢杆菌 Bs916 能有效分泌表达极耐热木聚糖酶, 为以后构建多种纤维素和半纤维素在其中的协同表达, 拓宽其碳源利用范围奠定基础。

**关键词:** 重组枯草芽孢杆菌; 海栖热袍菌; 极耐热木聚糖酶; 基因融合; 分泌表达

**中图分类号:** S936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1037-06

## Expression of xylanase *B* gene of *Thermotoga maritima* in *Bacillus subtilis* and the properties of recombinase

XIANG Ya-ping<sup>1,2</sup>, LUO Chu-ping<sup>3</sup>, ZHOU Hua-fei<sup>1,2</sup>, LIU Yong-feng<sup>1</sup>, CHEN Zhi-yi<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. College of Chemical Technology, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** To heterogeneously express the gene *xynB* encoding extremely thermostable xylanase from *Thermotoga maritima* in *Bacillus subtilis* 916 (Bs916) and characterize the properties of recombinant enzymes, the *xynB* gene with the promoter of a novel gene cluster for locillomycin were fused and resulted in a recombinant expression plasmid pXYNB2 which was then transformed into Bs916 and achieved the genetically engineered strain *B. subtilis* (Bs916/pXYNB2). SDS-PAGE revealed a protein with 43 000 molecular mass yielded by Bs916/pXYNB2, and the protein showed thermostable xylanase activity. The recombinant xylanase exerted activity at pH 5.0~5.8 above 100 °C, and kept 84% of its activity after incubated at 90 °C for 2 h. The strain *B. subtilis* 916 is able to heterologously express *xynB*, which lays a foundation for co-expressing cellulose and semi-cellulose.

**Key words:** recombinant *Bacillus subtilis*; *Thermotoga maritima*; thermostable xylanase; gene fusion; secretory expression

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570061); 国家“863”计划项目 (2011AA10A201); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(12)5001]

作者简介: 向亚萍 (1990-), 女, 湖北钟祥人, 硕士研究生, 主要从事枯草芽孢杆菌生物防治研究。(E-mail) xiangyaping393@163.com

通讯作者: 陈志谊, (Tel) 025-84390393; (E-mail) chzy84390393@163.com

$\beta$ -1,4-木聚糖内切酶 (1,4- $\beta$ -木聚糖木糖水解酶 EC3.2.1.8), 简称木聚糖酶, 是木聚糖降解过程中最关键的一个酶<sup>[1]</sup>。在纸浆造纸工业中, 木聚糖酶应用广泛<sup>[2-4]</sup>。热袍菌属的海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 是生长在海底火山口的极端嗜热专性厌氧微生物。它能产生 2 种木聚糖酶, 分别是由基因

TM0061 和 TM0070 编码的产物 1,4- $\beta$ -xylanase A (Mr 120×103) 和 1,4- $\beta$ -xylanase B (Mr 40 × 103) [5]。

枯草芽孢杆菌 Bs916 (*Bacillus subtilis* 916) 是一种商品化的生防菌株 [6-9], 且已全基因组测序 [10]。此菌株分泌多种脂肽类抗生素 [11], 研究发现含有新型脂肽类抗生素罗克霉素 (Locillomycin), *loc* 基因簇负责罗克霉素的合成, 其属于非核糖体肽合成酶 (NRPS) 途径基因簇, 罗克霉素启动子 *ploc* 负责调控 *loc* 基因簇的表达 [12]。枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 自身可以分泌木聚糖酶, 但其分泌量较低及热稳定性不高, 而热孢菌属的海栖热孢菌 (*T. maritima*) 所产生的极耐热木聚糖酶 B 的热稳定性高, 其最适反应温度高达 105 °C [13], 它的耐高温及热稳定性是工业化应用中的理想特征。目前耐热木聚糖酶的异源表达大部分以大肠杆菌为宿主细胞, 如江正强等 [14] 克隆海栖热孢菌中的木聚糖酶基因 *xynB*, 并在大肠杆菌中表达, 该酶在 90 °C 下保温 2 h 酶活性仍残留 90% 以上 [15-16]。郑志强 [17] 将来源于极端嗜热细菌海栖热孢菌 MSB8 的耐热性重组木聚糖酶 *xynB* 和来源于嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) HB27 的耐热性重组漆酶 *Tth-laccase* 结合, 在大肠杆菌中表达, 将表达产物对麦草浆进行协同生物漂白, 发现采用双酶协同预处理可节省约 50% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消耗量。将枯草芽孢杆菌作为极耐热木聚糖酶异源表达宿主的研究报道较少, Kim 等 [18] 用枯草芽孢杆菌基因组上的强启动子替换热纤维梭菌木聚糖酶基因的启动子, 把该基因转化到枯草芽孢杆菌中进行表达。将菌株 *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27 的耐热木聚糖酶基因截短, 得到 *xynAΔSLH*, 将其整合到枯草芽孢杆菌基因组中, 发现其木聚糖活性与截短前在大肠杆菌中的酶活性相比提高了 4.1 倍 [19]。Verma 等 [20] 通过穿梭质粒载体 pWH1520, 首次将宏基因组耐热木聚糖酶在枯草芽孢杆菌中分泌表达。

枯草芽孢杆菌具有强大的蛋白质分泌能力, 目前还没有将海栖热孢菌极耐热木聚糖酶基因 *xynB* 在枯草芽孢杆菌中成功表达的报道。枯草芽孢杆菌表达体系是一种较为理想的异源蛋白表达体系 [21], 其优点在于可以高效地表达具有生物学活性的异源蛋白并将其分泌至胞外 [22], 而且枯草芽孢杆菌也具有较高的生物安全性。目前枯草芽孢杆菌 Bs916 的生产主要以大豆粉、玉米粉作为碳源, 为进一步拓宽其碳源利用度, 特别是用秸秆作为碳源, 本研究尝试

采用枯草芽孢杆菌 Bs916 表达半纤维素降解中的关键酶木聚糖酶。将枯草芽孢杆菌 Bs916NRPS 基因簇罗克霉素启动子 *ploc* 与 *T. maritima* 极耐热木聚糖酶基因 *xynB* 融合, 以实现极耐热木聚糖酶基因 *xynB* 在枯草芽孢杆菌中的表达, 并对重组菌的木聚糖酶酶学性质进行研究, 为以后应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 海栖热孢菌基因组 DNA 由淮阴工学院生化学院惠赠。具有氯霉素抗性标记的穿梭质粒载体 pRP22 与菌株 Bs916 均为本实验室保存。LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L。

1.1.2 主要试剂和设备 所用硫酸铵、Tris 等试剂为国产分析纯, 木聚糖 (Xylan, from beechwood)、P-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAH-BAH)、氯霉素购于 SIGMA 公司, *Ppyorbest* 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac*I 购于 TaKaRa 公司, DNA marker、T4 DNA 连接酶、DNA 试剂盒和胶回收试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司, 蛋白透析袋 [BS-QF-018] 36 mm (MD44) [MW: 14000] 购自 Biosharp 生物科技公司, 高速冷冻离心机 Avanti™-J25I 购自美国 BECKMAN 公司, MyCycler™ 梯度 PCR 仪购自美国 BioRad 公司, UV-2000 分光光度计购自上海龙尼柯仪器有限公司。

### 1.2 引物设计

按照已知的 Bs916 罗克霉素启动子序列 *ploc* 和 Genbank 报道的海栖热孢菌木聚糖酶基因 *xynB* 设计引物 (表 1), 下划线表示酶切位点, 引物由上海生物工程技术公司合成。

### 1.3 融合基因和整合载体的构建

罗克霉素启动子 *ploc* 由引物 *ploc*F 和 *ploc*R 扩增获得, 扩增条件 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 扩增得到 967 bp 的 *ploc* 片段。木聚糖酶基因 *xynB* 由引物 *xyn*BF 和 *xyn*BR 扩增获得, 扩增条件同上, 扩增得到 1 044 bp 的 *xynB* 片段。融合基因 *ploc-xynB* 以亲本基因 PCR 产物为模板, 由引物 *ploc*F 和 *Xyn*BR 扩增获得, 扩增条件同上, 扩增得到 2 kb 的 *ploc* 片段。融合基因 *ploc-xynB* 片段经过凝胶回收以及 *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切后, 插入到 pUC19 质粒载体上, 构建为质粒载体 pXYNB1 (*ploc-xynB*-pUC19), 测序由上

海生工生物工程技术服务有限公司完成。将测序完成的 pXYNB1 经过 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后,插入到 pRP22 质粒载体上,构建为表达质粒载体 pXYNB2(*ploc-xynB*- pRP22)。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primers and sequences

引物	引物长度 (bp)	引物序列 (5'→3')
plocF	30	TTTGAGCTCTCTAATTAG- GAAGAATACTTT
plocR	39	CACAGAAGGTAATATTTTCATTGAT- GAAGTCCTCATTAT
xynBF	39	ATAATGAGGACTTCATCAAT- GAAAATATTACCTTCTGTG
xynBR	31	TTTGGATCCTCATTTTCTTTCTTC- TATCTTT

#### 1.4 整合载体转化、突变株筛选及鉴定

通过化学转化的方法<sup>[16]</sup>将 pXYNB2 转化至 Bs916,涂布在含有 5 μg/ml 氯霉素的 LB 平板上,37 ℃ 培养,筛选转化子。提取转化子质粒作为模板,利用表 1 中引物 plocF 和 xynBR 进行 PCR 鉴定,确定转化子质粒中是否含有融合基因 *ploc-xynB*。用同样的方法将原始质粒 pRP22 转化至 Bs916,得到的空载重组菌 (Bs916/pRP22) 作为测定极耐热木聚糖酶活性的对照菌株。

#### 1.5 木聚糖酶粗酶的制备

将重组菌 (Bs916/pXYNB2) 接种于含有 5 μg/ml 氯霉素的 LB 培养基中,28 ℃ 过夜培养,再转入含 50 ml LB 培养基的 250 ml 三角瓶 28 ℃ 培养 72 h,离心除去菌体,上清液中加入硫酸铵至饱和度为 75%,沉淀 12 h。10 000 r/min、30 min 离心收集沉淀,加入 2 ml 25 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 溶解,75 ℃ 保温处理酶液 30 min,11 000 r/min、2 min 离心,上清液即为粗制备的木聚糖酶,放 4 ℃ 冰箱备用。将粗酶液转入透析袋,收集透析后的粗酶液进行浓缩,测定蛋白质表达,蛋白浓度测定采用 Bradford 方法。

#### 1.6 木聚糖酶活性的测定

质量分数 0.5% 的木聚糖 100 μl、粗酶液 20 μl 和 100 mmol/L pH 5.4 的磷酸缓冲液 80 μl 反应 5 min 后,加 600 μl 终止剂。显色剂 PAHBAH [0.5 mol/L NaOH 与溶于 0.5 mol/L HCl 的质量分数为 5% PAH-BAH 体积比 4:1] 煮沸 10 min,冷却后用分光光度计测 410 nm 处光吸收值。酶单位 (U) 的定义:在该反应条件下,1 min 内催化产生 1 μmol 木糖

所需的酶量。

#### 1.7 重组菌 (Bs916/pXYNB2) 生长曲线及生长不同时期中酶活力的测定

用 LB 培养基 28 ℃,180 r/min 振荡培养,从接种开始每隔 4 h 取菌液,粗酶制备方法同方法 1.5,测定重组菌 (Bs916/pXYNB2) 在不同生长时期的木聚糖酶活力,以菌株 (Bs916/pRP22) 木聚糖酶活力为对照。

#### 1.8 重组菌 (Bs916/pXYNB2) 酶性质的测定

1.8.1 最适反应温度 在 65~100 ℃,每隔 5 ℃,分别测定酶活性。以酶活性最高为 100% 计算相对酶活性。

1.8.2 最适反应 pH 值 pH 值 4.6~7.8,每隔 0.4 pH 单位,分别测定酶活性,以酶活性最高为 100% 计算相对活性。反应所用的缓冲液是 0.1 mol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液。

1.8.3 温度稳定性 在相对稳定的 pH 值下,使酶分别在 80 ℃、90 ℃ 和 100 ℃ 温度下保温不同的时间,再测定相对酶活性,以未保温 (4 ℃ 保存) 的酶样活性为 100%,由此确定酶的稳定性。

1.8.4 pH 值稳定性 酶在不同的 pH 值条件下 80 ℃ 保温相同的时间,再分别测定残留酶活性与不保温的酶活比。所用缓冲液参见方法 1.8.2。

## 2 结果

#### 2.1 融合基因及重组质粒的构建

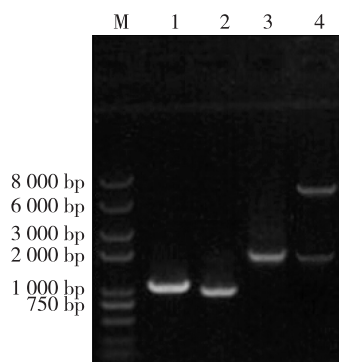
罗克霉素启动子 *ploc* 为非核糖体肽合成酶 (*NRPS*) 途径基因簇,我们尝试用 *T. maritima* 的木聚糖酶 *xynB* 的连接区和 *ploc* 启动子融合,构建融合基因。琼脂糖凝胶电泳结果显示融合基因构建成功,扩增的 *xynB* 片段 (1 044 bp)、*ploc* 片段 (967 bp) 以及 *ploc-xynB* (2 008 bp) 均与预期大小相同且经测序验证序列无误,重组质粒双酶切结果见图 1。

#### 2.2 融合基因在 Bs916 中的表达

重组质粒 pXYNB2 转化至枯草芽孢杆菌 Bs916 振荡摇培 72 h 后,制备粗酶液,热处理后取上清液透析,浓缩后进行 SDS-PAGE。从电泳图谱上可以看出,与菌株 (Bs916/pRP22) 相比重组菌 (Bs916/pXYNB2) 的蛋白在相对分子质量 43 000 处有明显的蛋白表达条带 (图 2)。

#### 2.3 重组菌 (Bs916/pXYNB2) 的生长曲线及木聚糖酶活力

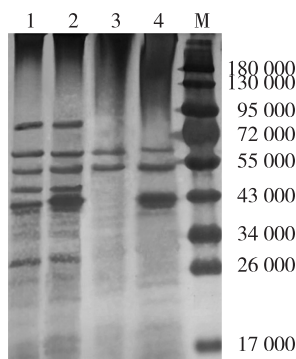
重组菌 (Bs916/pXYNB2) 和对照菌株 (Bs916/



M: DNA maker; 1: *ploc* 基因; 2: *xynB* 基因; 3: *ploc-xynB* 融合基因; 4: pXYNB2 (*Bam*H I and *Sac* I)。

图 1 木聚糖酶融合基因及重组质粒酶切 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of fusion gene fragment and the recombinant plasmid



M: 蛋白 marker; 1: Bs916/pRP22 粗酶液; 2: Bs916/pXYNB2 粗酶液; 3: 加热处理后的 Bs916/pRP22 粗酶液; 4: 加热处理后的 Bs916/pXYNB2 粗酶液。

图 2 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the fusion protein

pRP22) 生长条件定为 250 ml 三角瓶装液 100 ml, 28 °C、180 r/min 振荡培养, 分不同时间点取样测定重组菌发酵液  $OD_{600}$  及木聚糖酶活性(图 3)。由图 3 可以看出, 在 0~36 h, 随着菌体密度的增高, 菌体酶活性也随着提高, 在 36 h 达到最高; 36~48 h 重组菌生长达到稳定期, 菌体密度及酶活性均趋于稳定; 超过 48 h 后, 菌体生长进入衰亡期, 菌体密度开始降低, 而酶活性却保持不变。

## 2.4 重组木聚糖酶的最适反应温度

从图 4 可以看出, 重组木聚糖酶的酶活性在 65~100 °C 一直升高, 重组木聚糖的最适反应温度大于或等于 100 °C。

## 2.5 重组木聚糖酶的最适反应 pH 值

从图 5 可以看出, 重组木聚糖酶的最适反应 pH

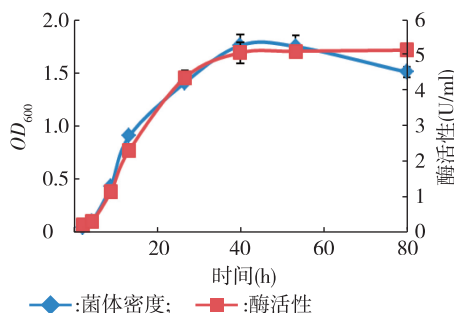


图 3 重组菌的生长和木聚糖酶活性变化曲线

Fig. 3 Growth curve and xylanase-producing activity of recombinant *B. subtilis* (Bs916/pXYNB2)

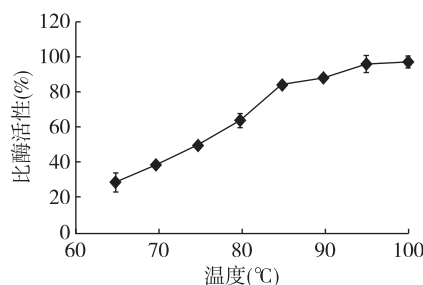


图 4 温度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on xylanase activity

值为 5.0~5.8, 海栖热孢菌的木聚糖酶 B 的最适反应 pH 值是 5.4, 两者基本一致。

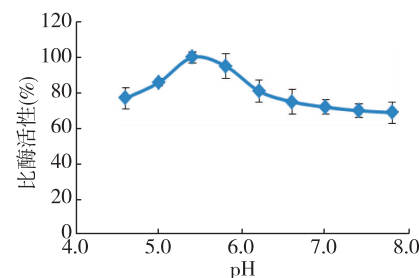


图 5 pH 对酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on xylanase activity

## 2.6 重组菌木聚糖酶温度的稳定性

从图 6 可以看出, 重组木聚糖酶的温度稳定性很好。在 80 °C 下保温 2 h 后, 残存酶活性和没保温酶的酶活性相比还有 94%; 在 90 °C 下保温 2 h 后, 残存酶活性和没保温酶的酶活性相比还有 83%; 然而在 100 °C 下保温 2 h 后, 酶活性几乎丧失。

## 2.7 重组菌木聚糖酶 pH 值的稳定性

从图 7 可以看出, 重组木聚糖酶在 pH 值 4.6~



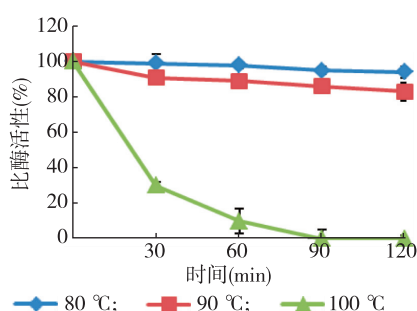


图6 温度对酶稳定性的影响

Fig.6 Effect of temperature on xylanase stability

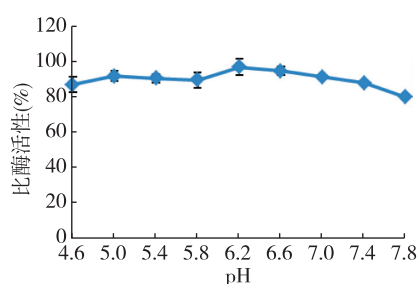


图7 pH 值对酶稳定性的影响

Fig.7 Effect of pH on xylanase stability

7.8 都比较稳定,相对酶活性都在 80%以上。

### 3 讨论

重组枯草芽孢杆菌生产基因工程产品具有极大的应用价值,相比大肠杆菌,重组枯草芽孢杆菌具有高效的蛋白分泌能力。然而,进行枯草芽孢杆菌的重组必须克服许多困难,其中主要包括其质粒稳定性较差、能形成感受态的菌株不多且转化效率有限以及大量胞外蛋白酶的分泌易造成外源蛋白的降解等<sup>[23-24]</sup>,这些因素使得利用重组芽孢杆菌生产基因工程产品困难较大。本研究利用 *T.maritima* 基因组 DNA 为材料,通过 PCR 克隆出编码高热稳定性木聚糖酶基因 *xynB*,与 *NRPS* 基因簇的启动子 *ploc* 融合表达,不需要诱导,在商品化芽孢杆菌 Bs916 中成功获得表达。

在本试验过程中,利用在常温菌 Bs916 表达的耐热木聚糖酶对温度的高稳定性,将重组菌上清液经硫酸铵沉淀提取的粗酶通过 75 °C、30 min 的热处理后,可去除大量首体蛋白,为后续纯化工作提供便利。

对重组菌(Bs916/pXYNB2)72 h 的生长曲线及木聚糖酶活性分析发现,重组菌的生长曲线和酶活性变化曲线走势相似,表明木聚糖酶活力与重组菌

的生长密度相关。因为在对数生长期菌体代谢旺盛,随着菌体数量的增加,重组菌分泌的蛋白含量也随着增加。但在 48 h 后重组菌生长进入衰亡期,菌体密度开始降低,而重组菌分泌的木聚糖酶一直存在于发酵液中,活性保持不变。

裴建军等<sup>[16]</sup>构建重组菌(JM109/pTrc-99A-xyl IV)作为极耐热木聚糖酶的生产菌株,发现在 100 °C 下保温 2 h 后木聚糖酶活性还有 60%。而本试验中的重组菌在 100 °C 下保温 2 h 后酶活性几乎丧失。这可能是由于宿主细胞及启动子的不同造成表达的木聚糖酶对温度稳定性差异较大。黄春晓等<sup>[25]</sup>对来自野油菜黄单胞菌的  $\alpha$ -淀粉酶基因的启动子进行定点诱变,发现含点突变的截短基因启动子的菌株的  $\alpha$ -淀粉酶活性比对照提高 100%。另外,研究发现影响木聚糖酶热稳定性的因素主要有疏水作用、氢键、离子键、二硫键、包装效应及螺旋结构等<sup>[26]</sup>。启动子的改变会影响木聚糖酶的转录和翻译,从而影响木聚糖酶活性。孙军亭等<sup>[27]</sup>在宇佐美曲霉木聚糖酶(*Xyn II*)中引入了一个二硫键,酶热稳定性大大提高。叶延欣等<sup>[28]</sup>用 SAS(version 8.1)回归分析 F/10 家族的木聚糖酶晶体结构,推测  $\alpha$ -螺旋含量越高,则酶热稳定性越强,无规则卷曲含量越多,酶的热稳定性越弱。

利用大肠杆菌表达极耐热木聚糖酶在国内研究较多,如薛业敏等<sup>[15]</sup>利用对重组大肠杆菌的诱导条件的优化,极耐热木聚糖酶酶活性达到 25.69 U/mg,比常规基因工程菌株提高 12.5 倍。裴建军等<sup>[16]</sup>通过定向改造和定点突变,显著提高了海栖热袍菌 *xynB* 在大肠杆菌中的表达量,并结合优化诱导条件使单位体积产生的重组木聚糖酶最多达到 243 U/ml。目前本试验重组枯草芽孢杆菌分泌的极耐热木聚糖酶活性与已报道的重组大肠杆菌产生的极耐热木聚糖酶活性相比较低,还达不到工业生产上的要求。可以通过基因工程手段提高启动子 *ploc* 强度,添加诱导剂及优化培养条件等手段提高重组菌木聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的表达,以期获得极耐热木聚糖酶高产菌株。

枯草芽孢杆菌本身分泌多种糖基水解酶,如  $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、 $\beta$ -1-4-内切木聚糖酶、 $\beta$ -1-4-内切甘露聚糖酶、果胶酶、 $\beta$ -1-4-内切葡聚糖酶等,它们能够降解多糖,但是不能降解纤维素<sup>[29-30]</sup>。构建能够降解纤维素的枯草芽孢杆菌往往需要胞外分泌表

达多种纤维素酶的基因,包括系列纤维素和半纤维素基因。王远等<sup>[31]</sup>成功将耐热内切葡聚糖酶 *celA* 基因分别与  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 和 *bglB* 在枯草芽孢杆菌 WB800 中进行共表达。

## 参考文献:

- [1] 郗卫那,张兰英,何健,等.微生物产木聚糖酶研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(7):387-391.
- [2] BAJPAI P. Application of enzymes in the pulp and paper industry [J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(2): 147-157.
- [3] BEG Q K, KAPOOR M, MAHAJAN L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(3/4): 326-338.
- [4] SONI H, KANGO N. Hemicellulases in lignocellulose biotechnology: recent patents[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2013, 7(3): 207-218.
- [5] NELSON K E, CLYTON R A, GILL S R, et al. Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* [J]. Nature, 1999, 399(6734): 323-329.
- [6] 陈志谊,高太东,严大富,等.枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验[J].中国生物防治,1997,13(2):75-78.
- [7] 陈志谊,许志刚,高泰东,等.水稻纹枯病拮抗细菌的评价与利用[J].中国水稻科学,2000,14(2):98-102.
- [8] 关一鸣,潘晓曦,王莹,等.哈茨木霉菌、枯草芽孢杆菌对人参灰霉病和根腐病病原菌的拮抗作用[J].江苏农业科学,2014,42(5):123-125.
- [9] 林志伟,肖亚静,郭春兰,等.枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆菹镰孢菌的抑菌机制[J].江苏农业科学,2015,43(11):175-177.
- [10] WANG X Y, LUO C P, CHEN Z Y. Genome sequence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. strain 916 [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(19): 5467-5468.
- [11] 向亚萍,陈志谊,罗楚平,等.芽孢杆菌的抑菌活性与其产脂肽类抗生素的相关性[J].中国农业科学,2015,48(20):4064-4076.
- [12] LUO C P, LIU X H, ZHOU H F, et al. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 422-431.
- [13] WINTERHALTER C, LIEBL W. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8 [J]. Applied and Environment Microbiology, 1995, 61(5): 1810-1815.
- [14] 江正强,李里特,林清,等.极端嗜热菌海栖热袍菌木聚糖酶 B 的克隆和表达[J].应用与环境生物学报,2002,8(3):280-284.
- [15] 薛业敏,毛忠贵,邵蔚蓝.极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达[J].食品与发酵工业,2003,29(11):20-25.
- [16] 裴建军,李迅,李相前,等.大肠杆菌生产重组极耐热木聚糖酶的诱导条件及其酶学性质[J].无锡轻工大学学报,2004,23(4):94-97.
- [17] 郑志强.耐热性细菌漆酶的高效表达及其在纸浆生物漂白中的应用[D].无锡:江南大学,2015.
- [18] KIM H, JUNK K H, PSCK M Y. Molecular characterization of *xynX*, a gene encoding a multidomain xylanase with a thermostabilizing domain from *Clostridium thermocellum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(4): 521-527.
- [19] HUANG X L, LI Z, DU C Y, et al. Improved expression and characterization of a multidomain xylanase from *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27 in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(28): 6430-6439.
- [20] VERMA D, SATYANARAYANA T. Production of cellulase-free xylanase by the recombinant *Bacillus subtilis* and its applicability in paper pulp bleaching [J]. Biotechnology Progress, 2013, 29(6): 1441-1447.
- [21] DOI R H, WONG S L, KAWAMURA F. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins [J]. Trends in Biotechnology, 1986, 4(9): 232-235.
- [22] GOEDDEL D V. Systems for heterologous gene expression [J]. Methods Enzymol, 1990, 185(185): 3-7.
- [23] 罗楚平,陈志谊,刘永锋,等.杀虫晶体蛋白基因 *CryIAc* 在生防菌 B-916 中的表达[J].江苏农业学报,2007,23(4):306-311.
- [24] 张欢.少根霉菌脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达研究[D].北京:北京化工大学,2009.
- [25] 黄春晓,崔锦,马向东. $\alpha$ -淀粉酶基因启动子-35 区的诱变及其对大肠杆菌内表达量的影响[J].河南农业科学,2006(5):24-27.
- [26] 李同彪,周晨妍,王丹丹.木聚糖酶热稳定性分子改造的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2014,27(11):1493-1496.
- [27] 孙军亭,李文静,郭敏辰. S179C 突变提高宇佐木曲霉木聚糖酶(*Xyn II*)热稳定性的研究[J].食品与发酵工业,2008,34(7):55-58.
- [28] 叶延欣,闫鹏飞,胡渝,等. F/10 木聚糖酶二级结构含量对热稳定性的影响[J].河南农业大学学报,2013,47(4):446-450.
- [29] PRIEST F G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* [J]. Bacteriological Reviews, 1977, 41(3): 711-753.
- [30] SIMONEN M, PALVA I. Protein secretion in *Bacillus* species [J]. Microbiological Reviews, 1993, 57(1): 109-137.
- [31] 王远,高秋强,辛秀娟,等. $\beta$ -葡萄糖苷酶基因和内切葡聚糖酶基因在其在枯草杆菌中的表达[J].应用与环境生物学报,2013,19(6):990-996.

(责任编辑:陈海霞)