

# 纤维素酶高产菌的筛选鉴定及纤维素酶基因的克隆与表达

刘海艳 白龙 赵海波 杨明明 曹斌云\*

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

**摘要** 为寻找新纤维素酶和纤维素酶基因资源,以羧甲基纤维素钠(CMC)改良的BHM培养基筛选菌株,经初筛和复筛筛选出目的菌株后,采用革兰氏染色法和16S rDNA基因片段比对法对筛选出的菌株进行鉴定;设计引物对P扩增其纤维素酶基因,连于pET-28a(+)载体构建原核表达载体并转入大肠杆菌BL21(DE3)进行表达,表达结果采用SDS-PAGE和测定表达产物活性的方法来检验。结果显示,本研究成功筛选出一株新的具有较高纤维素酶活的短小芽孢杆菌BY-1,该菌所产纤维素酶具有较好的热稳定性和酸碱稳定性,最适宜温度和pH分别为55℃和7.45,在此条件下最高酶活性为 $0.9216 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ;此外,还成功克隆出1个1851 bp的纤维素酶新基因**bgIC-BY**,具有GH9/CBM3纤维素酶结构,经IPTG诱导,SDS-PAGE图谱上于70 ku有1个明显的蛋白条带,表达产物酶活性为 $0.5413 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。本研究筛选出的短小芽孢杆菌内切纤维素酶活较高,具有一定的应用前景。

**关键词** 纤维分解菌; 筛选; 纤维素酶基因; 克隆; 表达

中图分类号 S 852.612

文章编号 1007-4333(2012)05-0092-07

文献标志码 A

## Cloning and expression of a novel cellulase gene from an isolated *Bacillus pumilus* strain

LIU Hai-yan, BAI Long, ZHAO Hai-bo, YANG Ming-ming, CAO Bin-yun\*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract** The aim of this study was to exploit new resources of cellulolytic bacteria and new cellulose genes for industrial processes. In this study, targeted bacteria were screened by CMC amended BHM medium and identified by Gram staining with 16S rDNA partial sequence alignment. After amplification of cellulase gene using primer pair P, it was ligated to pET-28a(+) in corresponding sites to construct prokaryotic expression vector. Heterogeneous expression was conducted in *E. coli* BL21(DE3) and verified by SDS-PAGE and enzyme detection. The *Bacillus pumilus* BY-1 with premium enzyme activity was successfully screened. Under the optimum condition of 55 °C in temperature and 7.45 in pH, the crude enzyme, reached the maximum enzyme activity at  $0.9216 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ . Simultaneously, a new 1851 bp cellulase gene **bgIC-BY** with the structure of GH9/CBM3 was successfully cloned from this bacterial strain. After IPTG induction, SDS-PAGE verified the successful expression of **bgIC-BY** with a mass of about 70 u and the enzyme activity was  $0.5413 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ . Thus, a potential new strain and a new endoglucanase gene with premium activity can be provided for industrial processes.

**Key words** cellulolytic microbes; screening; cellulase gene; cloning; expression

我国拥有丰富的纤维素资源,但因大量农业废弃物不能及时有效利用,造成了资源的浪费,同时也污染了环境。利用纤维素酶将其分解转化,可解决

境污染问题,有效实现农业废弃物的资源化利用。此外,合理利用纤维素资源,对开发饲料资源,生产生物能源,减轻人类对化石能源的消耗,缓解食物短

收稿日期: 2011-12-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD28B05-3); 陕西省科技统筹创新工程计划(2011KTCL02-09)

第一作者: 刘海艳,硕士研究生, E-mail: haiyanfamily@126.com

通讯作者: 曹斌云,教授,博士,主要从事草食动物产业化开发和羊分子育种研究, E-mail: caobinyun@yahoo.com.cn

缺等问题也有重大意义<sup>[1]</sup>。然而纤维素必须从聚合状态水解成葡萄糖单体状态,才会为人类所用。

纤维素降解主要有物理、化学及酶降解3种方法或几种方法综合使用。与其他2种方法相比,酶降解法具有反应条件温和,节约能源和不污染环境的特点。有研究表明<sup>[2]</sup>,纤维的降解过程至少需内切葡聚糖酶(ED,endo- $\beta$ -1,4-glucanase,EC3.2.1.4,也称Cx酶),外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(GL,exo- $\beta$ -1,4-glucanase,EC3.2.1.91,也称C1酶)和 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶3种酶的协同作用才能完成。

纤维素酶在饲料、洗涤和纺织等各个行业的广泛应用,对纤维素酶的研究热点主要集中在以下几个方面:影响酶促反应的因素,纤维素酶的分子结构,纤维分解菌生理特性,从生态学角度研究纤维降解群落组成,从自然界分离筛选具有较高酶活和酶产量的菌株。自然界中蕴含着丰富的纤维素酶资源,产纤维素酶的生物主要包括细菌、真菌及无脊椎动物如田螺<sup>[3]</sup>、天牛<sup>[2]</sup>和白蚁<sup>[4]</sup>等。大多数好氧型微生物分泌的纤维素酶具有典型的纤维素酶分子结构,即:催化结构域,纤维素结合结构域和富含Pro/Thr/Ser的连接蛋白。而由无脊椎动物(如白蚁、天牛和福寿螺等)分泌的纤维素酶主要是单体酶,缺乏连接蛋白和结合结构域。目前人们已经克隆出大量纤维素酶基因并采用基因修饰的方法来提高纤维素酶的活性和产量。在这些生物中,真菌生长周期长,但真菌纤维素酶以其种类齐全,酶活性高的特点而为广泛应用;细菌生长周期短,产酶速度快,所产生的纤维素酶主要是中性和酸性酶,且比真菌产生的纤维素酶稳定,近年来,细菌来源的纤维素酶逐渐为人类所重视,在棉纺织品水洗整理工艺及洗涤剂工业中具有良好的使用性能和巨大的经济价值。随着动物肠道生态制剂的广泛应用,寻找新的具有纤维降解能力的细菌成为近年来研究的热点。

藏猪是世界上少有的高原型草食猪种,自然选择使其具有适应高海拔恶劣气候环境,抗病、耐粗等特点,由于长期的地理交通不便因素,藏猪这种中国本土品种尚未得到全面的开发利用。本研究以单胃动物藏猪新鲜粪便为试验材料,采用改良BHM培养基筛选纤维分解菌,旨在为纤维素酶研究和微生物生态制剂新菌种的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 粪样

粪样采自陕西省添鑫藏香猪繁育厂的成年健康藏猪。

### 1.2 主要培养基

筛选培养基:改良的BHM培养基,具体参见参考文献<sup>[5]</sup>。

LB培养基:胰蛋白提取物,10 g/L;酵母提取物,10 g/L;氯化钠,5 g/L;蒸馏水,1 g/L(固体LB培养基添加琼脂15 g/L);120 °C高压灭菌20 min。

发酵培养基:液体LB培养基中加入10 g/L CMC。

### 1.3 感受态细胞和主要试剂

DH5 $\alpha$ 感受态细胞和BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技有限公司(北京)。pET-28a(+)质粒由本实验室保存。

抗生素、考马斯亮蓝G-250和细菌基因组试剂盒DP302、小型质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司(北京);IPTG、X-Gal购自Promega公司(美国);LA-Taq聚合酶、DNA Marker、各种限制性内切酶以及T载体连接试剂盒购自Takara公司(中国);胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉购自OXOID公司(英国);羧甲基纤维素钠(CMC)购自Sigma公司(美国)。

### 1.4 菌种富集、分离与纯化

取2 g样品置于100 mL改良的BHM培养基中,37 °C富集培养2~4 d。取0.1 mL富集培养物梯度稀释至 $10^{-5}$ 倍,涂布于BHM平板,刚果红染色鉴别目的菌株,根据菌落周围透明圈直径与菌落直径的比值大小对活力强的菌株进行初步筛选。

### 1.5 粗酶液制备及测定方法

#### 1.5.1 粗酶液制备及菌种复筛

将初筛菌株划线培养,挑取单克隆并于225 r/min、37 °C条件下振荡培养至对数期,制成液体菌种(约 $6 \times 10^8$  cfu/mL),按1%的量接种于50 mL发酵培养基中,取不同培养时间的培养液于10 000 r/min、4 °C条件下离心30 min,所得上清液即为粗酶液,挑选酶活性最高的菌株备用。

#### 1.5.2 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖浓度与吸光值关系的标准曲线参照文献

[6]进行。

### 1.5.3 纤维素酶活性的测定

纤维素酶活测定方法不统一,在反应时间方面参照前人测定方法<sup>[7-8]</sup>。

### 1.6 菌种鉴定

采用革兰氏染色法进行细菌形态学鉴定<sup>[9]</sup>,以27F/1492R为引物扩增16SrDNA片段,通过序列比对方法<sup>[10]</sup>对所筛选的菌株进行种属鉴定。

### 1.7 鉴定筛选菌株粗酶液的酶学特性

#### 1.7.1 酶反应的最适 pH 与酶的酸碱稳定性

将粗酶液、CMC溶液分别与不同pH的缓冲液以体积比为1:1的比例混合(pH分别为3.24、4.38、5.45、6.24、7.45、8.44、9.21和10.12)55℃水浴中测定酶活性,得出酶促反应的最适pH。

将粗酶液与不同pH的缓冲液以1:2的体积比混合(pH分别为3.17、4.10、5.15、6.17、7.21、8.26、9.08和10.21),55℃保温30min后测定纤维素酶活性。其他条件下所得酶活性与本试验所得酶活性最大值的比值即为此pH条件下的相对酶活性。

#### 1.7.2 酶反应的最适温度与酶的热稳定性

取1.5mL质量分数为1.0%CMC溶液与1.0mL适当稀释的粗酶液,均匀混合后于不同温度下反应10min,测定酶反应的最适宜温度。

在最适宜pH条件下,将粗酶液分别置于不同温度水浴保温30min,测定酶活性。计算其他条件下测得的酶活性与本试验所得酶活性最高值的比值。

### 1.8 纤维素酶基因的克隆与表达

提取筛选菌株基因组,以NCBI上所发布的种属相近菌株的纤维素酶基因为参考,利用Vector NTI Advance 10设计引物,分别添加EcoR I和Xho I酶切位点,扩增目的基因片段(引物对P为F: CCGGAATTCATGGCATCTTATAACT; R: CCCTCGAGTTATTTGTCTGGAAGTG)。扩增产物经TA克隆后挑选阳性克隆测序。

将上步所得阳性克隆质粒经EcoR I和Xho I双酶切,获得纤维素酶基因并连入pET-28a(+)载体构建原核表达载体bglC-pET。将bglC-pET质粒转入BL21(DE3)感受态细胞中构建重组菌。制备重组菌对数期制菌液种子并将其100倍稀释到含

卡那霉素的发酵培养基中,培养至对数期时加入终浓度为1mmol/L的IPTG诱导表达,测定不同时间菌液的吸光值和粗酶液酶活性。

以BL21(DE3)大肠杆菌和感受态细胞细胞内内容物为对照,SDS-PAGE电泳检测重组菌细胞内的表达产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活性测定标准曲线

用Excel软件制作散点图并得出标准曲线方程为 $Y=0.0611X+0.0033$ ,标准曲线散点图相关性系数 $R=0.9994$ ,线性良好,可用于后续酶活性测定试验。

### 2.2 菌株的分离与筛选

本试验筛选出多株具有CMCase活性的菌株,经初筛和复筛反复比较,确定了产CMCase活性最高的菌株为BY-1(图1)。

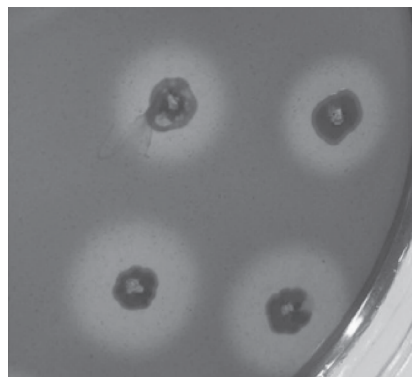


图1 纤维分解菌的筛选

Fig. 1 Screening of cellulolytic

### 2.3 分离菌株形态学和分子生物学鉴定

将BY-1涂布于LB平板上,37℃培养12h后发现菌落表面平滑,灰白色,周围呈圆锯齿状。革兰氏涂片染色结果显示为阳性有芽孢出现(图2)。

16S rDNA基因(Accession NO: JN887464)比对结果表明,该基因片段与多株短小芽孢杆菌相似性达99%,但与已见报道的短小芽孢杆菌遗传距离较远(图3),本试验所筛选出的菌株很有可能是一株新的短小芽孢杆菌。根据遗传学分类方法,经过16S rDNA鉴定,将本试验筛选的BY-1菌株命名为*Bacillus pumilus* BY-1。

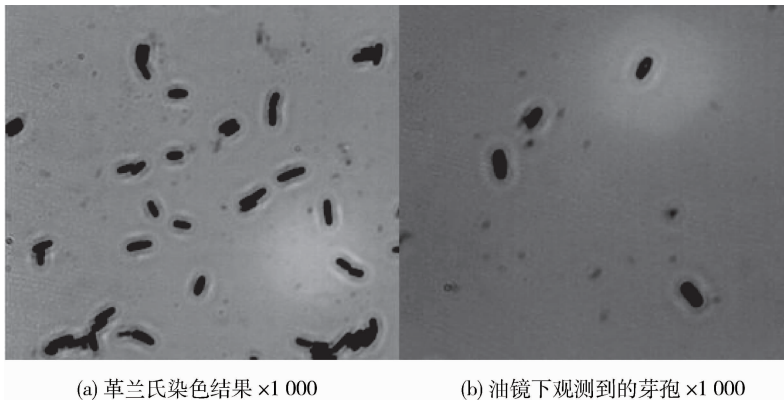
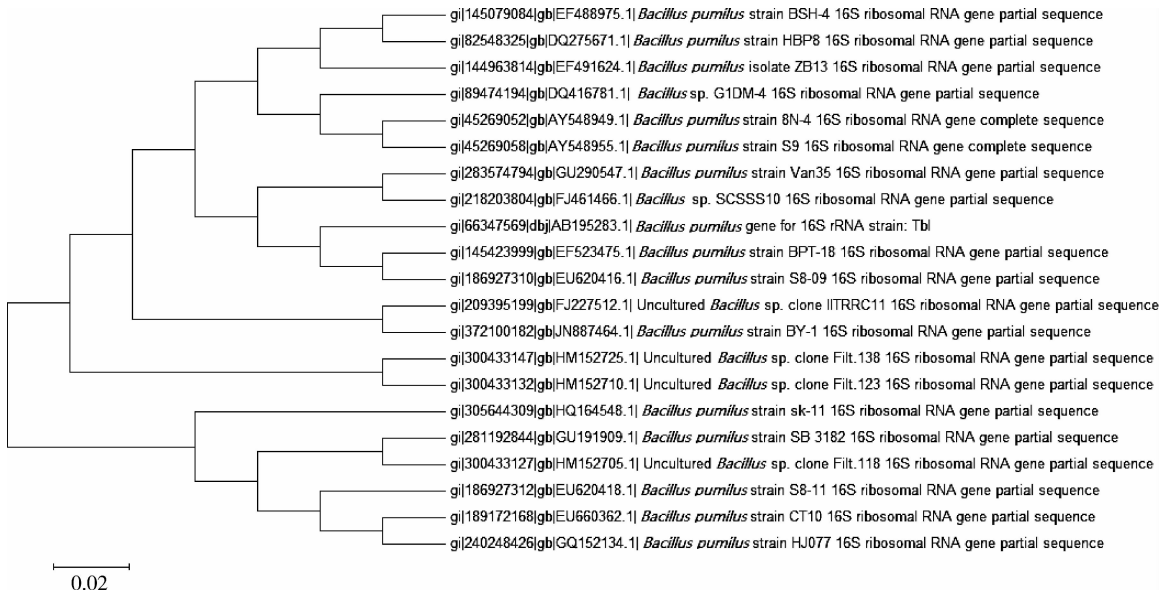


图 2 革兰氏染色鉴定

Fig. 2 Identification of Gram Stain



0.02 表示在 100 个碱基中有 2 个碱基发生替换。

图 3 基于 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence with the most related ones

### 2.4 酶学特性研究

1) 温度对酶活性的影响。酶与底物反应的速率随着温度的升高而加快,于 55 °C 时到达最高,而后随着温度升高而降低,该酶最适宜温度为 55 °C 左右(图 4)。酶对温度稳定性测定结果表明:当温度达到 60 °C 时,该纤维素酶具有 60% 的活力;当温度到达 70 °C 时,酶活性下降到 30%。随着温度上升,酶活迅速下降,表明该酶不耐受高温。

2) pH 对酶活性的影响。酶促反应速率随着 pH 的上升而升高,在 pH = 7.45 时达到最高点,而后反应速率随着 pH 的升高而降低,该酶最适合的 pH 为 7.45(图 5)。酶的酸碱稳定性研究结果表明,pH 在 5.15~8.26 时酶活性达到最大酶活性的

70% 以上;在 pH 9.08 时,酶活性达到 50%。该菌所产纤维素酶 pH 耐受性范围较广。

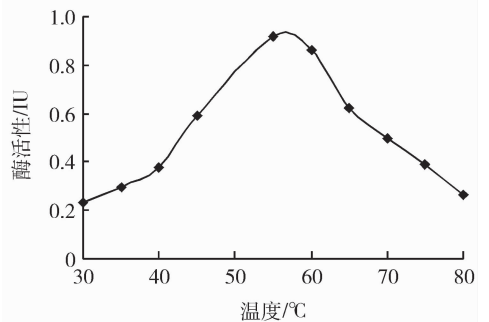
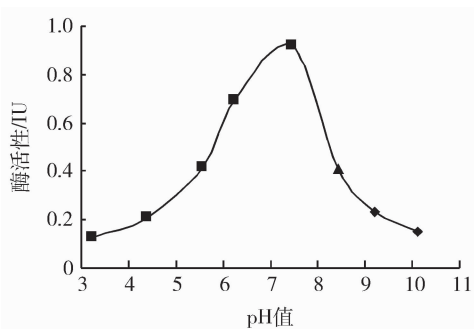


图 4 温度对酶促反应的影响

Fig. 4 Impact of temperature on the enzymatic reaction



正方形为柠檬酸-磷酸缓冲液, 三角形为磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液, 菱形为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

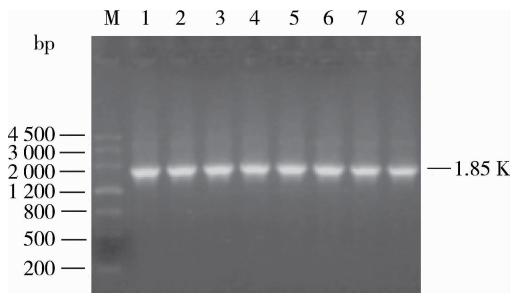
图5 pH对酶促反应的影响

Fig. 5 Impact of pH on the enzymatic reaction

3) 在最适宜温度和最适宜 pH 条件下, 测得该菌株所产纤维素酶最高酶活为 0.921 6 IU/mL。

## 2.5 纤维素酶基因的克隆与序列分析

根据 NCBI 上所公布的短小芽孢杆菌的纤维素酶基因序列, 以 *Bacillus pumilus* SAFR-032 中 *blgC* 基因 (GenBank ID: 157690798; 1612188-1614038) 为参考, 设计引物并扩增目的片段, 电泳结果显示, 本试验以 P 引物对成功扩增出大小约为 1.85 kbp 左右的片段 (图 6), 大小与预期一致, 表明该基因已被成功克隆。



M 为 Marker III; 1~8 为扩增的 *blgC* 片段。

图6 *blgC* 扩增产物电泳检测

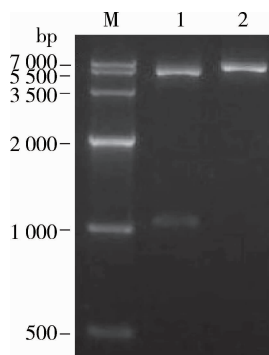
Fig. 6 Electrophoresis analysis of *blgC* amplification products

NCBI blast 结果显示, 该基因大小为 1 851 bp, 通过比对分析发现, 与 *Bacillus pumilus* endoglucanase A precursor (*EglA*) 基因相似性最高, 为 96%, 而与作为模板的 *Bacillus pumilus* SAFR-032 中 *blgC* 基因相似性为 88%, 本试验所克隆出的 *blgC* BY-1 基因是一个新基因。

将 *blgC* 蛋白序列在 Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)<sup>[11]</sup> 预测结果表明, 预测蛋

白大小为 69.29 ku, 该基因具有 GH9 催化结构域和 CBM3 纤维素结合结构域, 具有典型的细菌纤维素酶结构。

将构建好的载体用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 产生 1.85 和 5.37 kbp 的片段, 采用 *EcoR* I 单酶切产生大小为 7.2 kbp 大小的片段, 酶切结果与预期一致, 表明原核表达载体构建正确 (图 7), 可进行后期试验。



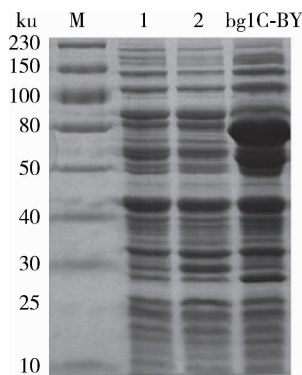
M 为 Marker IV; 1 为 *blgC*-pET 载体采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切结果; 2 为 *blgC*-pET 载体采用 *EcoR* I 单酶切结果。

图7 *blgC*-pET 酶切检测

Fig. 7 Restriction analysis of *blgC*-pET

## 2.6 纤维素酶基因的表达

SDS-PAGE 电泳结果显示, 在 60~80 ku 处 (图 8), 与对照相比, 出现了一条明显的蛋白条带, 与预测的蛋白大小相近。以终浓度为 1 mmol/mL 的 IPTG 诱导 35 h 后胞外纤维素酶活达到最大值 0.541 3 IU/mL, 而后缓慢降低, 证明外源基因成功表达且具有酶活性。



M 为蛋白分子量 marker; 1 为大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 表达的蛋白; 2 为大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态表达的蛋白; *blgC*-BY 为含有原核表达载体的重组子表达产物。

图8 SDS-PAGE 检测基因表达

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of *blgC*-BY gene expression

### 3 讨 论

1) 目前对纤维素酶的研究主要集中在真菌方面, 真菌所产的纤维素酶种类齐全并且活性较高, 但真菌生长较缓慢, 发酵时间较长。相对真菌来讲, 细菌培养简单、生长速度快、发酵周期短, 但是产酶水平较低<sup>[12]</sup>。因此开发自然界资源中产酶水平较高的纤维素分解细菌具有很强的可行性。本试验以藏猪粪便为试验材料, 经过反复比较, 筛选出一株具有较强纤维分解能力的短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* BY-1, 经测定, 该菌株最高酶活达 0.921 6 IU/mL, 高于一些已见报道的菌株<sup>[12-13]</sup>, 具有较强优越性。

2) 对纤维素酶基因的克隆始于 20 世纪 70 年代。到目前为止, 已有近百个物种 7 000 多个纤维素酶基因和相应的氨基酸序列被公布, 这些序列主要来自于细菌和真菌, 有些克隆所得到的纤维素酶基因已经通过纤维素酶基因工程进行大规模生产<sup>[14]</sup>。现在, 这些纤维素酶被广泛应用于饲料加工、食品、纺织、洗涤和酿酒等行业。但是, 由于纤维素酶活性受外界环境影响大, 使得纤维素酶活性低等因素成为限制这些行业发展的重要问题。因此, 如何提高纤维素酶的活性已经成为亟待解决的问题。

研究表明, 纤维素酶基因序列具有种属相似性<sup>[15-16]</sup>, 因此以种属关系最近的纤维素酶基因序列为参考, 理论上可成功克隆出所筛选菌株的纤维素酶基因序列。基于此, 本试验从筛选出的菌株中成功克隆出具有 GH9/CBM3 分子结构的纤维素酶基因。这种结构只在短小芽孢杆菌中有报道, 该种结构极有可能在短小芽孢杆菌内切纤维素酶中是保守的<sup>[17-18]</sup>。该基因通过 BL21 大肠杆菌 pET-28a(+) 表达系统进行表达, 在终浓度为 1 mmol/mL 的 IPTG 诱导 35 h 后, 表达产物的酶活性为 0.541 3 IU/mL, 具有较强的纤维素酶活性, 但低于野生菌株的酶活性, 其原因可能如下: 在 IPTG 诱导 pET-28a(+) 表达系统中, 纤维素酶表达速度较快。由于缺乏足够的折叠时间或者更换宿主后缺乏正常折叠所需的酶类, 导致纤维素酶不能正常运输到胞外或者无法正常折叠而导致包涵体的生成, 从而降低了上清液的酶活性。目前研究者主要通过控制条件: 比如发酵温度、摇床转速等来减少包涵体的产生。

3) 也有人通过采用更换宿主的方法优化外源蛋

白表达, 目前应用较为广泛的是芽孢杆菌表达系统。芽孢杆菌具有良好的分泌特性, 发酵工艺和产品回收工艺成熟, 具有很大的潜力。彭清忠等人将枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因转入到筛选出的野生短小芽孢杆菌体内, 其活性是出发菌酶活的 1.7 倍<sup>[19]</sup>。短小芽孢杆菌具有较强的分泌能力并且胞外蛋白酶活性很弱, 在芽孢杆菌蛋白分泌表达方面具有很大的潜力。并且其表达系统以野生菌种为宿主进行外源表达, 使得其酶活性比原有野生菌种有较大的提高。而将本试验克隆出的纤维素酶转入到本研究中所分离的短小芽孢杆菌内, 能否大大提高纤维素的酶活性, 仍需进一步研究。

4) 研究表明, 短小芽孢杆菌对碱具有很强耐受性<sup>[20]</sup>, 对其研究主要集中在木聚糖酶方面, 其分泌的木聚糖酶具有很强的温度和酸碱耐受性<sup>[12, 21]</sup>, 在农业废弃物处理、饲料原料处理和废水处理方面应用广泛。据报道, *Bacillus pumilus* EB3 能够以油棕空果为底物分泌纤维素酶<sup>[22]</sup>, 但对短小芽孢杆菌纤维素酶方面的报道甚少。本试验可为细菌中性或碱性纤维素酶和基因的研究与生产提供基础, 并对加深短小芽孢杆菌纤维素酶及其基因的了解, 为细菌纤维素酶和微生态制剂的研发与生产提供菌种来源与基础。

### 4 结 论

本试验所筛选的短小芽孢杆菌菌株产酶水平较高, 具有 pH 耐受性, 但该酶不耐受高温。纤维素酶基因原核表达产物酶活性较高, 具有进一步基因工程改造的潜力。

### 参 考 文 献

- [1] Bayer E A, Lamed R, Himmel M E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(3): 237-245
- [2] Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005, 140(4): 551-560
- [3] Li Y H, Yin Q, Ding M, et al. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- $\beta$ -1, 4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullariacrossean* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 153(2): 149-156
- [4] Zhang D, Lax A R, Bland J M, et al. Characterization of a new endogenous endo- $\beta$ -1, 4-glucanase of Formosan subterranean

- termite (*Coptotermes formosanus*) [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011, 41(4): 211-218
- [5] Lo Y C, Saratale D G, Chen W M, et al. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(6-7): 417-425
- [6] 李旺. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及纤维素酶基因的克隆与表达 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007
- [7] Wang J, Ding M, Li Y H, et al. A monovalent anion affected multi-functional cellulase EGX from the mollusca, *Ampullaria crosseana* [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 31(1): 108-114
- [8] 李旺. 纤维素酶基因重组野生型乳酸杆菌表达系统的构建 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010
- [9] Moaledj K. Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria; their application to numerical taxonomy [J]. *J Microbiol Methods*, 1986(5): 303-310
- [10] Webster G, Newberry C J, Fry J C, et al. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: A cautionary tale [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 55(1): 155-164
- [11] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385
- [12] Ariffin H, Abdullah N, Umi Kalsom M S, et al. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3 [J]. *J Biomed Eng Technol*, 2006, 3(1): 47-53
- [13] 马怀良, 郭文学, 柴军红. 常温高效纤维素分解菌的筛选 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(1): 52-55
- [14] 李旺, 张光勤. 纤维素酶基因工程研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2011(8): 51-54
- [15] Ozaki K, Shikata S, Kawai S, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene for alkaline cellulase from *Bacillus* sp. KSM-635 [J]. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(7): 1327-1334
- [16] Sumitomo N, Ozaki K, Kawai S, et al. Nucleotide sequence of the gene for an alkaline endoglucanase from an alkalophilic *Bacillus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(6): 872-877
- [17] Lima A O, Quecine M C, Fungaro M H et al. Molecular characterization of a beta-1, 4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 57-65
- [18] Meinke A, Damude HG, Tomme P, et al. Enhancement of the endo-beta-1,4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4383-4386
- [19] 彭清忠, 张惟材, 朱厚础.  $\alpha$ -淀粉酶在短短芽孢杆菌中的分泌表达 [J]. *生物技术通讯*, 2002, 13(3): 167-169
- [20] Asha Poorna C, Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(3): 485-490
- [21] Poorna C A, Prema P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues [J]. *Biochem Eng J*, 2006, 32(2): 106-112
- [22] Ariffin H, Hassan M A, Shah U K, et al. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(3): 231-236

责任编辑: 苏 燕