

赵联正, 谢占玲, 赵 朋. 一种新的镰刀菌 Q7-31 木聚糖酶 Xyn9 的分离纯化鉴定及酶学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 42-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.012

一种新的镰刀菌 Q7-31 木聚糖酶 Xyn9 的分离纯化鉴定及酶学特性

赵联正¹, 谢占玲^{1,2}, 赵 朋¹

(1. 青海大学生态环境工程学院, 青海西宁 810016; 2. 青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要: 为对植物病原菌镰刀菌 (*Fusarium* sp.) Q7-31 所产木聚糖酶进行鉴定及酶学特性分析, 在发酵产酶培养基上对 Q7-31 进行发酵培养, 获得能够高效降解植物细胞壁的粗酶液。然后, 采用 Sephacry S-100 凝胶柱层析和 DEAE 弱阴离子交换柱层析对粗酶液进行分离纯化后得到木聚糖酶 Xyn9, 并对其开展蛋白质组学研究和酶学特性分析。结果表明: 粗酶液中木聚糖酶比活为 16.58 U/mg, 纤维素酶比活为 0.428 U/mg, 细胞壁降解酶比活为 0.019 8 U/mg, 蛋白含量为 2.17 mg/mL。Xyn9 的蛋白质组学研究结果显示, 其分子量为 21 ku、等电点为 6.86, 接近 GH10 家族。纯化后 Xyn9 的酶学特性表明, 最适反应温度为 47 ℃, 最适 pH 值为 5.6, 该酶在 33 ℃ 以下和在 pH 值 5~6 的范围内较稳定; 金属离子 K⁺ 对该酶有激活作用, Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 抑制该酶活性, Cu²⁺、Hg⁺ 使该酶完全失活。综合 Xyn9 的分子量、蛋白质组学结果以及酶学特性, 最终将其鉴定为一种新的介于 GH10 家族与 GH11 家族之间的内切木聚糖酶。

关键词: 镰刀菌; 木聚糖酶; 分离纯化; 串联质谱鉴定; 酶学特性

中图分类号: Q55; Q814.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0042-04

植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素等物质组成^[1]。半纤维素的主要成分是木聚糖, 约占植物细胞干质量的 30%~35%, 是继纤维素之后含量第二丰富的可再生物质资源。其中, 木聚糖酶(1,4- β -D-xylanase, EC 3.2.1.8)是一种重要的工业用酶, 在造纸工业、能源、饲料及环境等领域中具有很好的应用前景, 特别是在纸浆的生物漂白方面的应用^[2-4]。生物降解木质素, 就是利用微生物产生的胞外酶使木质素逐步分解转化, 从而实现其资源转化。所以, 木质素酶作为废弃秸秆回收利用过程中的关键角色, 已引起人们的高度重视^[5-6]。我国是农业生产大国, 每年秸秆产量大约 5.7 亿 t, 占世界秸秆总产量的 20%~30%。其中绝大部分因为难以利用, 仅作为农家燃料或肥料^[7]。如果能够将这些秸秆通过转化成为低聚糖, 就可以用作基本碳源, 生产各种发酵产品, 包括各种氨基酸、有机酸、单细胞蛋白、糖醇类、工业酶类、溶剂或燃料等^[8-9]。因此, 对木聚糖酶的研究具有十分可观的经济效益和社会效益。

根据疏水性聚类分析方法^[10], 将木聚糖酶分为 GH10 和 GH11 等 2 个家族。GH10 家族木聚糖酶多为高分子量, 通常大于 30 ku, 等电点较低, 不仅有催化结构域, 还常有碳水化合物

物结合结构域; GH11 家族木聚糖酶多为单结构域蛋白, 相对分子量一般小于 30 ku, 等电点较高^[11]。而且 2 个家族的木聚糖酶在空间结构上的折叠类型不同, 即 GH10 家族木聚糖酶主要由重复出现的 α -螺旋和 β -折叠片构成, 整体结构像碗状, 上面略大下面较小; 而 GH11 家族木聚糖酶具有的典型折叠结构是由 β -折叠片为主所构成的单个结构域, 这个结构域由 2 个 β -折叠片层扭曲成将近 90°角, 构成 1 个深且狭长的沟缝状结构^[12]。

近 10 年来, 基因重组、基因定位突变、细胞融合等技术在纤维素酶菌株的构建上取得了巨大的成果。对于木聚糖酶而言, 酶活力偏低是研究开发中遇到的普遍问题, 低酶含量造成发酵成本过高, 限制了该酶制剂的工业化生产和应用。一般来说, 真菌木聚糖酶比细菌的木聚糖酶产量大^[13], 例如木霉、曲霉等真菌所产木聚糖酶的酶活力较高^[14-15], 对木聚糖酶的研究也主要集中在这些方面。镰刀菌是一种世界性的土生丝状真菌, 其中有一些可以产生多种酶, 其能够降解细胞壁中的果胶与纤维素^[16]。由于镰刀菌属于病原菌, 对镰刀菌的研究多集中在对致病性镰刀菌的检测鉴定、多样性与致病基因等方面^[17], 对利用其产酶的研究鲜有报道。本研究对镰刀菌 (*Fusarium* sp.) Q7-31 产细胞壁降解酶进行分离纯化, 并对纯化后的木聚糖酶进行蛋白鉴定与酶学特性分析, 鉴定出介于 GH10 家族与 GH11 家族的内切木聚糖酶 Xyn9, 为后续研究细胞壁降解酶降解细胞壁的协同反应机制、反应条件及酶系的结构组成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 镰刀菌 Q7-31 菌株, 由青海大学生态环境工程学院微生物实验室于 2007 年从青海省大通县宝库乡所采

收稿日期: 2014-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31260021); 青海省科技项目(编号: 2014-Z-903); 青海省科技厅重点基础研究(编号: 2011-Z-14); 国家重点实验室培育基地青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室开放课题(编号: 2011-05); 青海大学高层次人才项目(编号: 2012-QGC-4)。

作者简介: 赵联正, 男, 研究方向为植物细胞壁降解酶。E-mail: zhaolianzheng114@163.com。

通信作者: 谢占玲, 博士, 教授, 研究方向为真菌及酶学。E-mail: XieZhanLing2012@126.com。

土壤中自行分离纯化获得,并保存。

1.1.2 培养基 固体活化培养基:PDA 培养基粉末 39 g, 1 000 mL 水,121 ℃ 灭菌 20 min;液体种子培养基:葡萄糖 2%,蛋白胨 0.3%,Mendels 营养盐,121 ℃ 高压灭菌 20 min;发酵产酶培养基:燕麦秸秆粉 0.3%,蛋白胨 0.3%,Mendels 营养盐,121 ℃ 高压灭菌 20 min;Mendels 营养盐^[18]: (NH₄)₂SO₄ 1.4 g/L、KH₂PO₄ 2.0 g/L、尿素 0.3 g/L、CaCl₂ 0.3 g/L、MgSO₄ 0.3 g/L、FeSO₄ 5.0 mg/L、MnSO₄ 1.6 mg/L、ZnSO₄ 1.4 mg/L、CoCl₂ 2.0 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与发酵 将保存在 4 ℃ 下液体石蜡封存的斜面菌种 Q7-31 转接至固体活化培养基上,于 25 ℃ 恒温培养箱中培养,传代 2~3 次,使菌种充分活化。液体种子制备:在 1 000 mL 三角瓶中装入 200 mL 液体种子培养基,从固体活化培养基上接种直径为 1.0 cm 的菌块至液体种子培养基中,于 25 ℃ 恒温培养箱中静止培养 2 d 后制成液体种子备用。液体发酵培养:在 1 000 mL 三角瓶中装入 350 mL 发酵产酶培养基,将制备好的液体种子按 10% 接入发酵产酶培养基中,25 ℃ 120 r/min 条件下摇床培养。

1.2.2 酶活力的测定 采用 3',5'-二硝基水杨酸(DNS)测定还原糖的方法^[19],测定分别以 1% 木聚糖、0.5% 羧甲基纤维素(CMC)及 5 mg/mL 燕麦秸秆粉为底物时酶液中木聚糖酶、纤维素酶和植物细胞壁降解酶的活力。将 1 min 产生 1 μg 还原糖所需的酶液量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.3 蛋白含量的测定 蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[20],以牛血清白蛋白(BSA)为标准绘制标准曲线。在 2 mL 离心管中加入稀释 3 倍的酶液样品 200 μL,加入 1 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液,充分振荡混匀反应 5 min,60 min 内在 595 nm 下测定吸光度。将测得的吸光度代入蛋白标准曲线方程,计算样品中的蛋白含量。

1.2.4 酶的分离纯化 用 50%~80% 饱和度的硫酸铵对蛋白含量较高的酶液进行分级沉淀,后将 6 mL 沉淀后的样品上样到 Sephacry S-100 葡聚糖凝胶层析柱(26 mm×700 mm),层析柱预先用 pH 值为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡,并以相同缓冲液进行洗脱,速度为 1.3 mL/min,用核酸蛋白检测仪在 280 nm 波长下检测蛋白分布,对每个收集管进行标号;将初步分离的蛋白样品上样到 DEAE 弱阴离子交换柱(5×5 mL),柱子预先用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.5)平衡,以 0~1 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱,速度为 0.5 mL/min,每 4 min 收集 1 管,用核酸蛋白检测仪在 280 nm 波长下检测蛋白分布。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将制好的分离胶和浓缩胶灌入电泳槽后,把蛋白 Loading Buffer 与待测收集管中的样品混合,于 100 ℃ 沸水浴中加热 5 min,取出后冷却至室温。每个点样孔上样 10 μL,并使用标准蛋白分子量作为参照。当溴酚蓝前沿到达距凝胶下沿约 0.5 cm 时,停止电泳。使用小刀将凝胶轻轻撬离玻璃板,然后将凝胶剥离到装有染色液(考马斯亮蓝 R-250 染色液 1%,甲醇 40%,冰醋酸 10%,混匀并过滤)的培养皿中,染色 3~4 h。染色完毕后,倒出染色液,加入脱色液(甲醇 10%,冰醋酸 10%,混匀),脱色 3~10 h,定时更换脱色液,直至凝胶背景

变得清晰可见。

1.2.6 酶的质谱鉴定 酶的质谱鉴定由华大基因(北京)完成。切下的目的蛋白凝胶位点,加入 50 mmol/L NH₄HCO₃ 振荡至无色;加入乙腈 100 μL 约放置 30 min,通过 1 μg/mL 胰蛋白酶酶解 37 ℃ 水浴 16 h,加入 100 μL 提取液(50% 乙腈,5% TFA),40 ℃ 水浴 1 h,真空干燥除去乙腈,加入 5 μL 0.1% 三氟乙酸。取 2 μg 的样品用 Agilent 1100 液相系统 Finnigan 线性离子阱(LTQ)质谱仪系统进行检测,质谱结果经 MASCOT 软件检索,结合 NCBI 数据库信息以及酶学特性确定酶的种类^[21]。

1.2.7 酶的最适温度、pH 值及稳定性测定 最适温度的测定:将底物处于 pH 值 6.8 的缓冲液中,在 4~90 ℃ 范围中进行酶促反应,确定酶的最适反应温度;在上述不同温度下温浴处理 1 h 测定酶的稳定性。最适 pH 值的测定:将底物处于不同 pH 值的缓冲液中,pH 值范围为 3~8,在 45 ℃ 条件下反应并测定酶活力,确定最适反应 pH 值。稳定性测定:将样品分别在 pH 值为 3.0~11.0 的条件下处理 1 h,测定酶的 pH 值稳定性。

1.2.8 金属离子对酶活力的影响 分别在酶液中加入金属离子化合物 Na⁺、K⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Hg²⁺,各种金属离子在反应体系中的终浓度分别达到 4、8 mmol/L。40 ℃ 处理 30 min 后测定残余木聚糖酶活力,未加金属离子的酶活力为 100%。

2 结果与分析

2.1 Q7-31 发酵液的酶活力和蛋白含量

2.1.1 酶活力 Q7-31 发酵液的酶的木聚糖酶活力最强,在酶液稀释 100 倍情况下其木聚糖酶活力高达 35.96 U/mL;其次具有一定的纤维素酶活力,在酶液稀释 10 倍的情况下,纤维素酶活力为 0.929 U/mL;而酶液在没有稀释的情况下,细胞壁降解酶活力只有 0.043 U/mL(表 1)。以上结果表明,Q7-31 发酵液的酶主要具有木聚糖酶活力。

表 1 发酵液的酶活和酶比活

酶种类	平均吸光度	酶活力 (U/mL)	比活 (U/mg)
木聚糖酶(稀释 100 倍)	0.992±0.006	35.96	16.58
纤维素酶(稀释 10 倍)	0.720±0.028	0.929	0.428
细胞壁降解酶	0.222±0.027	0.043	0.019 8

注:底物分别采用 1% 木聚糖、0.5% 羧甲基纤维素(CMC)及 5 mg/L 燕麦秸秆粉。

2.1.2 蛋白含量 过滤后的酶液总体积为 1 400 mL,595 nm 下的吸光度为 0.840,代入标准曲线公式($y=0.8609x, r^2=0.9994$),得到酶液总蛋白含量为 3 037.26 mg。

2.2 酶的分离纯化及 SDS-PAGE

1 400 mL 粗酶液经过 50%~80% 硫酸铵分级沉淀后,得到 12 mL 酶液,蛋白含量为 1 248.99 mg,蛋白回收率为 41.12%。将酶液上样到 Sephacry S-100 葡聚糖凝胶层析柱中进行初步分离纯化,得到只具有木聚糖酶活性的蛋白,将其命名为 Xyn9,其酶活力为 47.26 U/mL,蛋白含量为 5.824 mg,比活为 24.34 U/mg,SDS-PAGE 检测结果证明其为单一蛋白,分子量为 21 ku(图 1)。再将初步分离纯化的 Xyn9 上样到

EzFast DEAE 弱阴离子交换柱中进一步分离纯化,柱子预先用 pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡,以 0~1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,速度为 0.5 mL/min,得到纯化过的 Xyn9。

2.3 Xyn9 的质谱鉴定

选取双向电泳为 1 个点的 Xyn9 蛋白进行串联质谱鉴定,

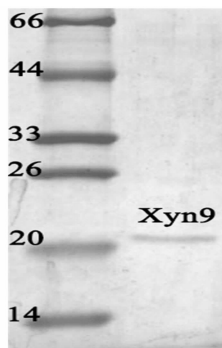


图1 凝胶过滤层析后 Xyn9 蛋白的 SDS-PAGE 图示

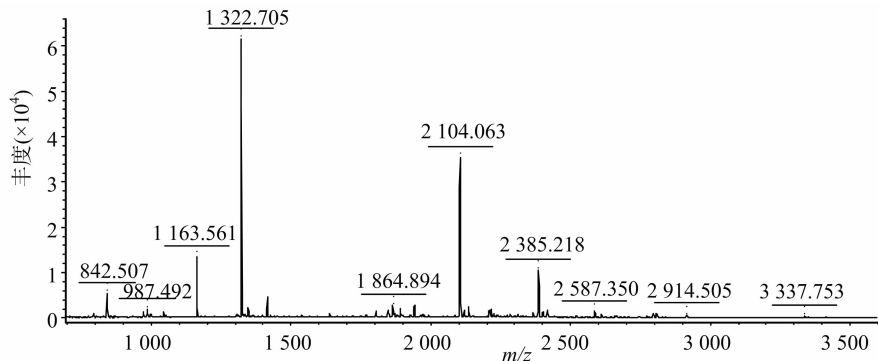


图2 双向电泳后 Xyn9 蛋白的质谱鉴定结果

2.4 Xyn9 的酶学特性

2.4.1 Xyn9 的最适温度及温度稳定性 Xyn9 的最适反应温度为 47 ℃,在 37~52 ℃ 范围内都有较高的酶活力,温度过低或过高都不利于酶促反应;Xyn9 在 33 ℃ 以下稳定性高,当温度高于 33 ℃ 酶活力迅速降低直至为 0 (图 3)。

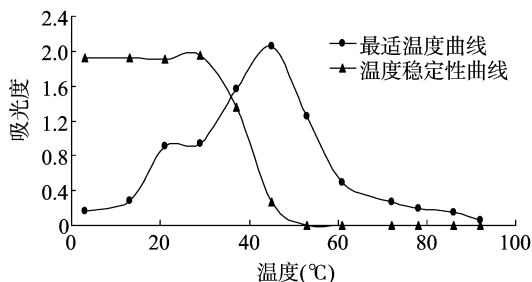


图3 温度对木聚糖酶Xyn9酶活力及稳定性的影响

2.4.2 Xyn9 的最适 pH 值及 pH 值稳定性 纯化的低分子量木聚糖酶 Xyn9 的最适反应 pH 值为 5.6;Xyn9 在 pH 值为 5~6 的范围内具很好的稳定性 (图 4)。

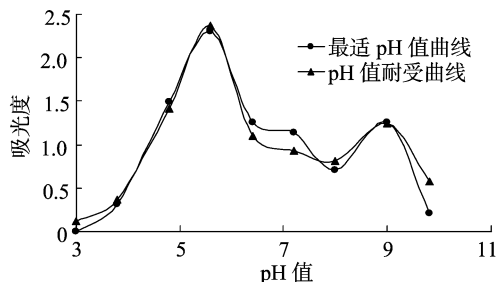


图4 pH 值对木聚糖酶 Xyn9 酶活力及稳定性的影响

2.4.3 金属离子对 Xyn9 酶活力的影响 金属离子对木聚糖酶 Xyn9 酶活力具有明显的影响。 K^+ 在 4、8 mmol/L 离子强度条件下对该木聚糖酶活力都有一定的激活作用,且离子浓度越大,激活效果越好; Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用; Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 则完全抑制该木聚糖酶的活力 (图 5)。

2.5 Xyn9 的鉴定

由于 Xyn9 的质谱鉴定结果表明其接近但不属于 GH10

结果表明:由于 Mascot Score 为 37 分,不足证明其为 GH10 家族内切木聚糖酶的 47 分 ($P < 0.05$),因此 Xyn9 接近但并不属于 GH10 家族内切木聚糖酶 (NCBI 注册号:gi|1170139)。理论等电点 (PI) 为 6.86,质谱鉴定结果如图 2 所示,匹配的肽段序列为 VLGEDFVGIAFR,覆盖范围为 3%。

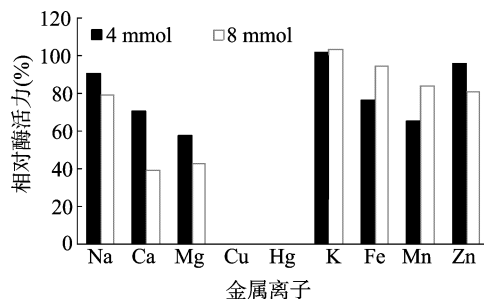


图5 金属离子对木聚糖酶 Xyn9 活力的影响

家族内切木聚糖酶,而低分子量以及酶学特性表明其接近 GH11 家族内切木聚糖酶^[22]。因此,最终将其鉴定为一种新的介于 GH10 与 GH11 家族之间的内切木聚糖酶。

3 结论与讨论

对镰刀菌 Q7-31 发酵液进行酶活力测定,结果表明,发酵液具有木聚糖酶、纤维素酶与植物细胞壁降解酶活力,并且植物细胞壁降解酶活力较强,这种多种酶的组合在真菌中并不常见^[23-24]。这可能是其生活方式与环境相适应而长期进化的结果,作为植物病原菌,多种酶的协同作用可能有助于其高效感染植物,完成其生活过程。此外,病原菌木聚糖酶可能作为激发子,诱发植物的抗病防御反应,在植物与病原菌互作机制研究和植物抗病防病领域中备受关注^[25],病原菌木聚糖酶由于能分解植物细胞壁而可能促进病原菌的侵染,且病原菌木聚糖酶还可能同时诱发植物的抗病防御系统,病原菌木聚糖酶的这种双重作用已成为近年来植物-病原菌互作关系研究中的一个热点^[26],因此侵染过程需要一系列酶的协同作用。植物半纤维素的完全水解需要一系列酶协同完成,并且这些酶共同作用致使粗酶液具有较高的比活力。其中的小分子木聚糖酶更容易穿透植物纤维壁结构,发挥高效的降解作用^[27]。而一些木聚糖酶具有一些特殊结构区域,有利于和底物结合,热稳定区域和糖基化结构使其稳定性在不同环境中更好。

笔者在之前的研究中,已经克隆出编码 Xyn8 蛋白 (同样从 Q7-31 中分离出) 的 Xyn8 基因,并且实现了其在大肠杆

菌中的原核表达,发现其为 25.7 ku 的 GH11 家族内切木聚糖酶,其最适温度、pH 值分别为 40 °C、6.0^[16]。将本研究所得到的 Xyn9 与 Xyn8 对比后发现,Xyn9 的分子量以及酶学特性与 Xyn8 类似,即接近 GH11 家族内切木聚糖酶^[22],但两者基因序列的对比结果(57%)证明其不属于 GH11 家族。此外,双向电泳后的串联质谱鉴定结果表明其接近但不属于 GH10 家族内切木聚糖酶。因此,根据 Xyn9 的分子量、质谱鉴定结果以及其酶学特性,将其最终鉴定为一种新的介于 GH10 与 GH11 家族之间的内切木聚糖酶。但由于其作为病原菌所产酶的特殊性,后续着重解决其归属问题。

Xyn9 的酶学特性研究表明其最适反应 pH 值为 5.6,低于 33 °C 时酶活力较稳定,最适反应温度为 47 °C。多数真菌木聚糖酶^[28]的最适反应 pH 值在 5 左右,pH 值稳定范围为 5~6,最适反应温度为 40~70 °C,低于 50 °C 较稳定。但也有些报道认为最适 pH 值在更酸或偏中性环境中,如 Iefuji 等从酵母菌 *Cryptococcus* sp. S-2 中分离得到一种小分子量内切木聚糖酶,其最适反应 pH 值为 2.0,且当 pH 值为 1.0 时仍能保持 75% 的酶活力^[29]。另外一些木聚糖酶在极端 pH 值和温度条件下酶活力不但高而且稳定,在工业应用方面有很好的前景。如木聚糖酶应用于造纸业中需要其能够受耐高温(55~70 °C)和碱性环境,在生物转化方面甚至需要一些嗜热嗜碱和嗜热嗜酸性的木聚糖酶。这就需要通过菌株筛选、诱变、基因工程或者蛋白工程等方法来提高木聚糖酶的水解效率和稳定性,这也是目前木聚糖酶研究的一个主要方向。金属离子 K⁺ 对木聚糖酶 Xyn9 具有很强的激活作用,在一定范围内,其浓度越大作用越强,而 Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 对该酶有不同程度的抑制作用很少有报道。重金属离子 Hg²⁺、Cu²⁺ 对木聚糖酶具有完全的抑制作用,这与许多报道结果一致,可能由于 Hg²⁺、Cu²⁺ 能够改变酶的构象从而使酶失活。

参考文献:

- [1] Blely P. Microbial xylanolytic systems[J]. Trends in Biotechnology, 1985,3(11):286-290.
- [2] 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.
- [3] Ouyang J, Wang S, Wang Y, et al. Production of a trichoderma reesei QM9414 xylanase in *Pichia pastoris* and its application in biobleaching of wheat straw pulp[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011,27(4):751-758.
- [4] Polizeli M L, Rizzatti A C, Monti R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005,67(5):577-591.
- [5] 李海涛,姚开,贾冬英,等. 我国秸秆资源利用及其木质素降解特性[J]. 安徽农业科学, 2010,38(29):16377-16378,16394.
- [6] 彭晓光,杨林娥,张磊. 生物法降解秸秆木质素研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(1):18-20.
- [7] 刘亮伟. 木聚糖酶蛋白序列分析,分子进化和分子模拟[D]. 无锡:江南大学, 2005:1-22.
- [8] 怀文辉,何秀萍,郭文洁,等. 微生物木聚糖降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2000,27(2):137-139.
- [9] 毕瑞明,孙迅,任少亭. 黑曲霉产木聚糖酶发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2000,30(1):53-55.
- [10] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1993,293(Pt 3):781-788.
- [11] Subramaniam S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002,22:33-46.
- [12] Gilkes N R, Henrissat B, Kilbmu D G, et al. Domains in microbial beta-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families[J]. Microbiological Reviews, 1991,55:303-315.
- [13] 田永,侯运华,于同立. 酸性木聚糖酶的应用研究进展[J]. 粮油加工, 2008(5):110-113.
- [14] 蔡少丽,杨章萍,黄建忠. 里氏木霉木聚糖酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2013,39(8):113-118.
- [15] 郑丽丽,盛占武,韩冰莹,等. 不同诱变方法对黑曲霉产木聚糖酶能力的影响[J]. 生物技术通报, 2013(12):146-150.
- [16] Xie Z L, Gao H Y, Zhang Q, et al. cloning of a novel xylanase gene from a newly isolated *Fusarium* sp. Q7-31 and its expression in *Escherichia coli* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012,43(1):405-417.
- [17] 林镇颀,阙友雄,刘平武,等. 植物致病镰刀菌的研究进展[J]. 中国糖料, 2014(1):58-64,78.
- [18] Eveleigh D, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009,2:21-23.
- [19] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959,31(3):426-428.
- [20] Nicholas J K. The Bradford method for protein quantitation[M]//Walker J M. The protein protocols handbook. New York: Humana Press, 1996:15-20.
- [21] Teroza G, Pisanu S, Roggio T, et al. Proteomic profiling of sea bass muscle by two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014,40(1):311-322.
- [22] 刘亮伟,秦天苍,王宝,等. 木聚糖酶的分子进化[J]. 食品与生物技术学报, 2007,26(6):110-116.
- [23] 刘爽,范丙全. 秸秆纤维素降解真菌 QSH3-3 的筛选及其特性研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012,18(1):218-226.
- [24] 顾方媛,陈朝银,石家骥,等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008,28(1):83-87.
- [25] 陈红歌,刘艳芳,刘亮伟,等. 木聚糖酶和木聚糖酶抑制蛋白在植物-病原菌互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2009,45(2):176-182.
- [26] Belien T, van Campenhout S, van Acker M, et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005,327(2):407-414.
- [27] 李宝聚,周长力,赵奎华,等. 黄瓜黑星病菌致病机理的研究 II. 细胞壁降解酶及其在致病中的作用[J]. 植物病理学报, 2000,30(1):13-18.
- [28] 朱会芳,江正强,赵兰英,等. 一株产木聚糖酶的耐冷皮壳青霉菌鉴定与酶谱分析[J]. 应用与环境生物学报, 2009,15(3):376-379.
- [29] Iefuji H, Chino M, Kato M, et al. Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996,60:1331-1338.