

文章编号:1673-1689(2009)02-0250-06

重组大肠杆菌 BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 诱导表达 β -葡聚糖酶的条件优化

李永仙, 郑飞云, 李崎*, 顾国贤

(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究自行构建的产 β -葡聚糖酶的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 在 LB 培养基中的生长特性, 考察种子液的菌龄、培养基起始 pH、接种量及诱导起始时发酵液菌浓度等对 β -葡聚糖酶产生水平的影响; 通过正交试验确定诱导剂 IPTG 及乳糖添加量、诱导温度及诱导剂作用时间。结果表明: 培养基起始 pH 7.0, 对数生长中期的种子液 (OD₆₀₀ 为 0.35) 以接种量 (体积分数) 10% 接入摇瓶发酵培养, 37 °C, 200 r/min 培养约 3 h, 菌液 OD 值达到 1.0 左右, 添加终浓度分别为 0.033 6 mmol/L 的 IPTG 及 10 mmol/L 乳糖, 24 °C 诱导 6 h, 发酵液清液中酶活达到最高 (336.33 U/mL), 菌体生长量为 1.12 g/L, 发酵液中总酶活达到 459.32 U/mL, 是原始菌株在相同条件下所产酶活的 6.62 倍。采用优化培养条件及诱导剂作用条件, 重组菌在 TB 培养基中酶活水平进一步提高, 诱导剂作用 10 h, 发酵清液中酶活为 1 090.31 U/mL, 总酶活 1 570.83 U/mL, 是原始菌在该条件下酶活的 19.73 倍, 显示出重组菌具有广阔的工业化应用前景。

关键词: 重组大肠杆菌; 发酵条件; 优化; 诱导; β -葡聚糖酶

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Optimization of Fermentation Conditions of Recombinant *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* Producing β -Glucanase

LI Yong-xian, ZHENG Fei-yun, LI Qi*, GU Guo-xian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, the optimum conditions for β -glucanase production from the recombinant strain *E. coli* BL21(DE3)-Pet28a(+)-*bgl* were carefully determine and lists as follows: 10% seed cultures (OD₆₀₀=0.35) was supplemented to the culture medium (initial pH 7.0) and incubated for 3h when the cell concentration reaching at OD₆₀₀ 1 under 37 °C and 200 r/min. Then 0.0336 mM IPTG and 10 mM lactose were fed as inductor to the *E. coli* BL21(DE3)-Pet28a(+)-*bgl* culture broth and the temperature was shifted to 24 °C and maintained for 6 h. the total activity of β -glucanase achieved at 459.3 U/mL, and 336.3 U/mL β -glucanase was found in supernatant liquor, was higher 6.62 times than that of the parent strain. In TB

收稿日期: 2008-05-01

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA020204)。

作者简介: 李永仙 (1964-), 女, 四川彭州人, 高级工程师, 主要从事发酵工程的研究。

* 通讯作者: 李崎 (1971-), 女, 上海人, 工学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事啤酒酿造科学与微生物的研究。

Email: liqi@jiangnan.edu.cn.

medium, the values can achieve at 19.73 (1 090.3 U/mL in supernatant and 1 570.8 U/mL in total). The results presented here indicated that the recombinant strain exhibited the potential application in industrial production.

Key words: recombinant *E. coli*, fermentation conditions, optimization, inducing, β -glucanase

β -1,3-1,4 葡聚糖酶(EC3.2.1.73),简称 β -葡聚糖酶,能够高效、专一分解植物来源的 β -葡聚糖中 β -1,3 和 β -1,4 混合的糖苷键,大分子 β -葡聚糖不断降解,因而在以大麦麦芽为原料的啤酒生产及麦类饲料加工过程中具有非常重要的应用价值及前景^[1-2]。 β -葡聚糖酶来源于植物及微生物,其中微生物来源的酶主要利用真菌或芽孢杆菌经传统通风发酵而生产。近年来,将不同来源的 β -葡聚糖酶基因(*bgl*)在大肠杆菌中克隆表达得到广泛研究和应用^[3-4]。程志敬等^[5]利用重组 *E. coli* JM109-pLF3,经产酶条件优化,培养 30 h 后 β -葡聚糖酶酶活达到 297.71 U/mL;而李青青等^[6]利用基因工程菌 EGs2 产 β -葡聚糖酶,最高酶活力为 321.56 U/mL。

作者所在研究室前期已克隆表达来自 *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001(本研究室选育保藏的产 β -葡聚糖酶酶活的专利菌株) β -葡聚糖酶基因,构建重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl*,该重组质粒含 lacI 控制的 T7 启动子,在 IPTG 诱导下实现高效表达 β -葡聚糖酶。本研究中结合乳糖进行协同诱导大肠杆菌表达 β -葡聚糖酶,不仅使含 Tac 启动子或 T7 启动子的表达系统中重组蛋白表达增加,而且产物可溶性升高^[7]。同时为了提高基因表达目的产物 β -葡聚糖酶酶活,结合该重组大肠杆菌表达蛋白的特点,采用单因素试验考察菌体生长条件及状态诸如培养基起始 pH、种子液菌龄、接种量、诱导起始时发酵液中菌体浓度等对产酶的影响,在此基础上,采用正交试验的方法确定诱导剂 IPTG 及乳糖最适添加量、最适作用温度及作用时间,为进一步工业化生产试验提供了参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种 重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl*,作者所在研究室构建。

1.1.2 试剂 大麦 β -葡聚糖标样(购自美国 Sigma 公司),IPTG(BIO BASIC INC), α -乳糖(上海恒信化学试剂有限公司提供),卡那霉素(BIO BASIC INC)。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出物 5,

NaCl 10,卡那霉素 0.03;pH 7.0,加入 20 g 琼脂粉即为固体 LB 培养基。

TB 培养基(g/L):胰蛋白胨 12,酵母提取物 24,甘油 6,NaCl 10,KH₂PO₄ 2.4,K₂HPO₄·3H₂O 12.5;培养基接种前加入卡那霉素溶液,终质量浓度为 0.03 g/L。

1.1.4 诱导剂溶液(g/L) IPTG 20, α -乳糖 180。

1.2 方法

1.2.1 种子培养方法

一级种子:斜面菌样一环接入装有 10 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 的三角瓶中,37 °C,200 r/min 振荡培养 11 h,培养液为一级种子液。

二级种子:一级种子液 1.0 mL 接入装有 25 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 的三角瓶中,37 °C,200 r/min 振荡培养 2~3 h,培养液为二级种子液。

1.2.2 诱导产酶方法 二级种子液在不同的培养时间,菌液具有不同的光密度值,根据不同的光密度值可以计算出发酵时的接种量,二级种子液接入发酵摇瓶后,37 °C,200 r/min 振荡培养至一定时间,在每 25 mL 发酵液中加入 5 μ L 的 IPTG 溶液及 250 μ L 的 α -乳糖溶液,27 °C,200 r/min 振荡诱导 5 h 后,测定发酵液清液中的酶活。

1.2.3 菌体生长量的测定(以菌体干重计) 经 IPTG 及乳糖协同诱导 5 h 的发酵液 10 000 r/min 离心 2 min,弃去清液,去离子水离心洗涤后再恢复到原体积,振荡均匀后稀释不同的倍数,以去离子水为对照,在 600 nm 波长下测定稀释菌液的 OD 值;各取不同稀释倍数的菌液 10 mL,10 000 r/min 离心 2 min,弃去清液,菌体经真空冷冻干燥后,测定其干重,以 OD 值为横坐标,菌体干重为纵坐标绘制菌体干重与菌液 OD 值的关系图。

1.2.4 菌株生长曲线的测定 分别向若干装有 25 mL LB 培养基的 250 mL 的三角瓶中接入 1.0 mL 的一级种子液,37 °C,200 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取出一瓶测定菌液在 600 nm 下的 OD 值。

1.2.5 β -葡聚糖酶活力的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法。酶活定义:1 mL 酶液在 40 °C 和 pH 值为 6.5 的条件下,每分钟水解 β -葡聚糖生成相当于 1 μ mol 的葡萄糖还原物质的量为 1 个酶活

力单位,以 U/mL 表示;发酵清液酶活力测定:发酵液经过离心后,将上清液稀释适当倍数,测定其酶活力;发酵液总酶活的测定:将含菌体的发酵液经过超声波破碎,其破碎条件为冰浴、功率 400 W,超声 1 s 停止 3 s,总超声作用时间为 60 s,超声破碎液经适当稀释后测定其酶活力。

1.2.6 诱导剂作用条件的确定方法 采用正交试验方法,确定诱导剂 IPTG、乳糖的最适添加量、最适作用温度和作用时间,因素及水平见表 1,正交试验设计表为 $L_{16}(4^4)$ 。

表 1 正交试验因素及水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	实验因素			
	A: IPTG 溶液体积/ μL	B: 乳糖 溶液体积/ μL	C: 诱导 温度/ $^{\circ}\text{C}$	D: 诱导剂 作用时间/ h
1	5.0	125	24	4
2	10.0	250	27	5
3	15.0	375	30	6
4	20.0	500	33	7

2 结果与分析

2.1 菌体生长量的测定

按照 1.2.3 的方法,测定了菌体生长量与菌液 OD 值的关系,如图 1 所示。结果表明,控制菌液的 OD 值在一定的范围内时,每毫升菌液所含菌体的干重与 OD 值具有很好的线性相关性。

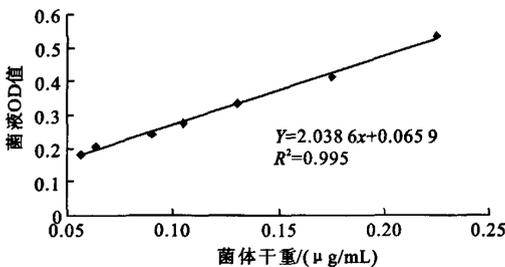


图 1 菌体干重与菌液 OD 值的关系

Fig. 1 Relationship between dry weight of cell and OD of value

2.2 菌株生长曲线的测定

菌株二级培养过程中菌液的 OD 值随时间的变化曲线如图 2 所示。重组大肠杆菌对数生长期在培养过程中的第 2—4 小时之间,第 0—1 小时为延滞期,第 1—2 小时为调整期,第 2—4 小时为对数生长期,4 h 以后达到平衡期。

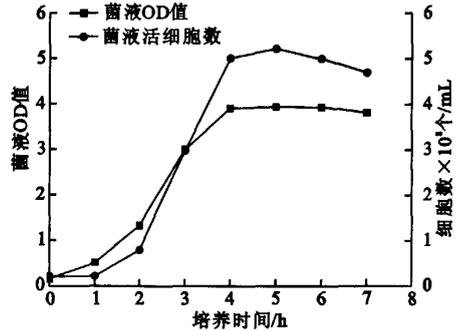


图 2 菌液 OD 值及细胞数随培养时间的变化

Fig. 2 Curve of cell quantity and OD value

2.3 菌体生长条件对产酶的影响

2.3.1 发酵培养基起始 pH 对诱导产酶的影响

调节培养基起始 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,以二级种子液的 OD 值为 0.35,按发酵培养基体积的 5% 接入二级种子液,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 振荡摇瓶 3 h,于每瓶中加入 5 μL IPTG 及 250 μL 乳糖溶液协同诱导 5 h 后,10 000 r/min 离心 2 min,测定清液中的酶活力,产酶结果如图 3 所示。可以看出,当发酵培养基起始 pH 值为 7.0 时,经诱导后发酵液中的酶活最高,表明该 pH 值有利于大肠杆菌的繁殖及诱导产酶。

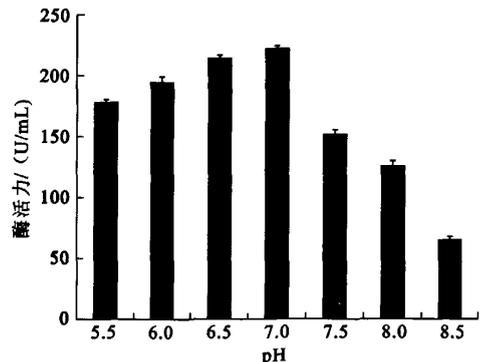


图 3 发酵培养基起始 pH 值对诱导产酶量的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on β -glucanase activity

2.3.2 二级种子接种量对诱导剂作用效果的影响

二级种子液以 0.35 的 OD 值为分值,按发酵培养基体积的 2.5%、5.0%、10%、15%、20%、25% 接入二级种子液,经发酵及诱导后其产酶结果如图 4 所示。由图 4 中的结果可知,接种量为培养基体积的 10% 时,产酶活最高。

2.4 菌体生长状态对产酶的影响

2.4.1 二级种子菌龄对诱导产酶的影响 处于对数生长期不同时间的二级种子液,控制相同的菌浓度接入三角瓶摇瓶培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 振荡摇瓶 3 h,取下在每瓶中加入 5 μL IPTG 及

250 μL 乳糖溶液协同诱导 5 h 后,10 000 r/min 离心 2 min,测定清液中的酶活力,结果见表 2。结果表明,当处于对数生长中期的二级种子按一定菌浓度接入摇瓶培养基后,经诱导后发酵液清液中酶活力最高,由此将二级种子的菌龄确定为对数生长中期的 3 h。

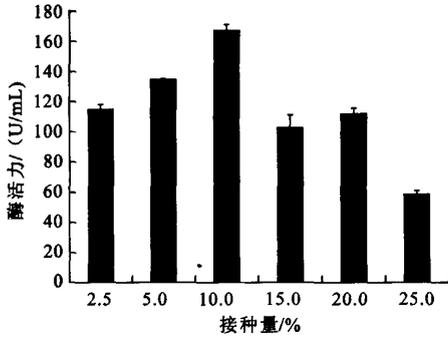


图 4 接种量对产酶水平的影响

Fig. 4 Effect of inoculation volume inoculation on β-glucanase

表 2 二级种子菌龄对产酶水平的影响

Tab. 2 Effect of secondary seed age on β-glucanase expressed

种子菌龄/h	菌液 OD 值	二级种子液接种体积/mL	补充 LB 培养基体积/mL	发酵清液酶活/(U/mL)
1	0.35	1.250	0.00	158.89±0.47
2	1.07	0.780	0.47	198.63±0.94
3	2.64	0.180	1.07	241.65±4.68
4	3.55	0.122	1.13	232.07±4.91
5	3.54	0.123	1.13	216.17±0.70

2.4.2 摇瓶过程中诱导起始时发酵液中菌浓度对产酶的影响 从二级种子液接入发酵摇瓶后第 1 小时开始,每隔 1 h 取出 3 瓶,每瓶中加入 5 μL IPTG 及 250 μL 乳糖溶液协同诱导 5 h 后,10 000 r/min 离心 2 min,测定生物生长量及发酵清液中的酶活力,结果见表 3。可以看出,诱导起始菌浓度对产酶水平具有显著的影响,菌浓度为 OD=1.266 时,产酶水平最高,菌浓度过低或过高,都大幅度减少产酶量。起始菌浓过低,说明诱导剂添加过早,会抑制菌体的增殖,生物量减少,进而影响到产酶量。起始菌浓过高,表明诱导剂添加太晚,菌体处于生长平衡期,并开始衰老,合成酶蛋白的能力降低,同时发酵液中可用于合成酶蛋白的物质减少,从而严重影响发酵液中的酶产量。

表 3 诱导起始菌浓对产酶水平的影响

Tab. 3 Effect of initial cell concentration on β-glucanase activity

诱导起始时间/h	添加诱导剂时菌液 OD 值	生物生长量/(g/L)	发酵液清液酶活/(U/mL)
1.3	0.100	0.880±0.000	98.57±0.94
2.0	0.328	1.135±0.005	168.24±1.87
3.0	1.266	1.160±0.010	240.25±7.48
4.0	2.992	1.470±0.010	110.73±0.47
5.0	3.650	2.045±0.005	35.21±0.70

2.4.3 发酵过程中诱导剂作用时间对酶活的影响

发酵过程中,菌液添加诱导剂后每隔 1 h 取出 3 瓶,离心测定清液中的酶活力,结果见表 4。可以看出:发酵过程中,酶活随诱导剂作用时间的增加而增加,但发酵液中菌体生长量到第 4 小时开始逐渐下降,而发酵清液的酶活继续增加,这可能是由于 4 h 以后菌体出现衰老、死亡及自溶,因而有更多的胞内葡聚糖酶溶解到胞外,所以清液中的酶活力增多。

表 4 诱导剂作用时间对酶活的影响

Tab. 4 Effect of addition time of melucer on β-glucanase activity

诱导剂作用时间/h	生物生长量/(g/L)	发酵清液中的酶活/(U/mL)
1	0.680±0.010	27.73±0.70
2	1.055±0.005	29.13±0.70
3	1.270±0.010	83.84±2.57
4	1.325±0.005	189.52±2.10
5	1.285±0.005	210.32±2.81
6	1.235±0.005	276.72±0.47

2.5 诱导剂最佳作用条件的确定

经研究菌株的生长条件和生长状态,取其关键因素进行正交试验,以确定诱导剂最佳作用条件。根据以上试验结果,取对数生长中期的二级种子液,以 OD 值 0.35 为分值,按体积分数 10% 的接种量接入三角瓶摇瓶培养基中,37 °C,200 r/min 摇瓶约 3 h,当发酵液的 OD 值为 1.0 时加入诱导剂,试验结果见表 5,优化前后产酶水平结果见表 6。

由表 5 中结果得出,根据极差分析,各因素对菌株产酶水平影响的排序为:诱导剂作用温度 > IPTG 添加量 > 乳糖添加量 > 诱导剂作用时间,其最佳的作用条件为:添加终浓度为 0.033 6 mmol/L 的 IPTG 及 10 mmol/L 的乳糖,作用温度 24 °C,作

用时间为 6 h。未添加诱导剂的样品,发酵液清液 中无酶活单位。

表 5 正交试验结果

Tab. 5 Results of orthogonal experiment

试验次数	IPTG 溶液		乳糖溶液/ μL		诱导温度/ $^{\circ}\text{C}$		诱导剂作用时间/h		发酵清液酶活力/(U/mL)
1	A ₁	5	B ₁	125	C ₁	24	D ₁	4	145.33±12.63
2	A ₁	5	B ₂	250	C ₂	27	D ₂	5	144.86±0.94
3	A ₁	5	B ₃	375	C ₃	30	D ₃	6	127.09±2.81
4	A ₁	5	B ₄	500	C ₄	33	D ₄	7	102.08±1.17
5	A ₂	10	B ₁	125	C ₂	27	D ₄	7	205.18±0.94
6	A ₂	10	B ₂	250	C ₃	30	D ₁	4	112.60±0.47
7	A ₂	10	B ₃	375	C ₄	33	D ₂	5	104.88±2.57
8	A ₂	10	B ₄	500	C ₁	24	D ₃	6	266.90±6.08
9	A ₃	15	B ₁	125	C ₃	30	D ₃	6	111.66±4.21
10	A ₃	15	B ₂	250	C ₄	33	D ₄	7	115.40±2.34
11	A ₃	15	B ₃	375	C ₁	24	D ₁	4	236.04±0.47
12	A ₃	15	B ₄	500	C ₂	27	D ₂	5	221.78±4.91
13	A ₄	20	B ₁	125	C ₄	33	D ₂	5	112.83±2.10
14	A ₄	20	B ₂	250	C ₁	24	D ₃	6	250.54±9.35
15	A ₄	20	B ₃	375	C ₂	27	D ₄	7	255.45±3.97
16	A ₄	20	B ₄	500	C ₃	30	D ₁	4	160.29±1.40
对照	0		0		27		5		0.00
K ₁	519.36		575.00		898.81		654.26		2 672.90
K ₂	689.56		623.39		827.26		584.35		
K ₃	684.88		723.46		511.64		756.19		
K ₄	779.10		751.05		435.19		678.10		
R	259.75		176.05		463.62		171.84		

根据正交试验的结果做验证实验,其结果如表 6 所示,诱导剂作用条件优化后,菌株经诱导后,发酵液酶活达到 336.33 U/mL,较优化前提高 44.3%,发酵液总酶活达到 459.32 U/mL,酶活是原始菌的 6.62 倍。

2.6 优化条件下菌株在 TB 培养基中的应用表达结果

采用优化的培养条件及诱导剂的作用条件,菌株在 TB 培养基中 β -葡聚糖酶的表达结果见表 7。结果表明,在 TB 培养基中重组菌具有更高的表达水平,当诱导剂作用 6 h,发酵液中的酶活及总酶活与

LB 培养基中的酶活相比,均有大幅度的提高,当诱导剂作用至 10 h,发酵液清液中酶活为 1 093.31 U/mL,总酶活最高,达到 1 570.83 U/mL,是原始菌在该条件下酶活的 19.73 倍。随着诱导剂作用时间的增加,清液酶活占总酶活的比例也在增加,总酶活在减少,这可能与菌体细胞的衰老自溶有关,细胞裂解自溶会释放出蛋白酶,从而会造成对目的酶的降解,控制合适的诱导剂作用时间,在尽可能提高清液中的酶活比例的同时减少总酶活的损失,这对简化酶的后提取工艺具有重要意义。

表 6 诱导条件优化前后产酶水平比较

Tab. 6 Comparison of β -glucanase of pro-optimization and optimization

菌样	IPTG 溶液体积/ μL	乳糖溶液体积/ μL	诱导温度/ $^{\circ}\text{C}$	诱导剂作用时间/h	菌体干重/(g/L)	发酵清液酶活/(U/mL)	总酶活/(U/mL)
重组菌(优化前)	5	250	27	5	1.25	233.00±1.169	291.25
重组菌(优化后)	10	500	24	6	1.12	336.33±2.572	459.32
原始菌	0	0	24	30		69.35±0.705	

表7 重组菌在TB培养基中的表达结果
Tab.7 Results of recombinant strain's expression in TB medium

菌样	诱导时间/h	菌体平均干重/(g/L)	清液中的酶活/(U/mL)	发酵总酶活/(U/mL)	(清液酶活/总酶活)/%
重组菌	2	2.13	128.73±0.7	666.02±9.72	19.33
	3	2.10	312.02±3.5	971.76±23.15	32.11
	4	2.25	487.89±8.84	1 068.98±6.94	45.64
	5	2.28	511.62±3.72	1 125.69±17.31	45.45
	6	2.47	551.17±4.19	1 202.08±10.41	45.85
	7	2.51	655.33±5.99	1 358.52±3.71	48.24
	8	2.75	845.15±12.2	1 411.34±9.03	59.88
	9	3.30	936.86±3.48	1 508.33±5.26	62.11
	10	3.60	1 093.31±17.63	1 570.83±2.31	69.41
	11	3.75	1 259.25±2.78	1 492.13±6.94	84.39
	原始菌			79.6±3.65	

3 结 语

综上所述,当LB培养基的起始pH为7.0,生长处于对数中期的种子液以OD值为0.35为分值,按体积分数10%的接种量接入摇瓶,37℃,200 r/min培养约3 h,当菌液的OD值达到1.0时,添加终浓度为0.033 6 mmol/L的IPTG及10 mmol/L的乳糖,在24℃诱导作用6 h后,产酶水平最高,发酵清液中酶活可达336.33 U/mL,菌体生长量为

1.12 g/L,发酵液中的总酶活达到459.32 U/mL,该酶活是原始菌淀粉液化芽孢杆菌在相同条件下所产酶活的6.62倍。

采用优化的培养条件及诱导剂作用条件,重组菌在TB培养基中表现出更高的表达水平,当诱导剂作用至10 h,发酵液清液中酶活为1 093.31 U/mL,总酶活最高达到1 570.83 U/mL,是原始菌在该条件下酶活的19.73倍,显示该重组菌具有广阔的工业化应用前景。

参考文献(References):

- [1] 李永仙,顾国贤,俞中.耐高温葡聚糖酶在啤酒糖化中的应用[J].酿酒,2002,29(2):81-83.
LI Yong-xian, GU Guo-xian, YU Zhong. The application of thermal- β -glucanases in mshing[J]. *Liquor Making*, 2002, 29(2): 81-83. (in Chinese)
- [2] Flint H J, Pherson E C, Bisset J. Molecular cloning of genes from rum inococcus flavefaciens encoding xylanase and β (1,3-1,4)-glucanase activities[J]. *J Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1230-1233.
- [3] Antoni P. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 543(1): 361-382.
- [4] 吕文平,许梓荣,李卫芬,等.淀粉液化芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶产酶基因的克隆及表达[J].中国兽医学报,2005,25(3):263-265.
LÜ Wen-ping, XU Zi-rong, LI Wei-fen, et al. Cloning and expression of (-1,3-1,4)-glucanase gene from bacillus amyloliquefaciens[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2005, 25(3): 263-265. (in Chinese)
- [5] 程志敬,邓旭,卢英华,等.重组大肠杆菌发酵生产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶培养基优化研究[J].工业微生物,2006,36(2):26-30.
CHENG Zhi-jing, DENG Xu, LU Ying-hua, et al. Optimization of recombinant escherichia coli fermentation medium affecting β -1,3,1-4-glucanase production[J]. *Industrial Microbiology*, 2006, 36(2): 26-30. (in Chinese)
- [6] 李青青,陈启和,蒋孝燕,等.基因工程菌EGs2产 β -葡聚糖酶条件优化及产酶特性[J].农业生物技术学报,2007,15(4):708-712.
LI Qing-qing, CHEN Qi-he, JIANG Xiao-yan, et al. Optimization of recombinant eschreichia coli EGs2 fermentation codition affecting β -glucanase production and its characteristics of enzyme[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(4): 708-712. (in Chinese)
- [7] 杨瑞,王淑秀,陈正跃,等.提高基因工程中重组蛋白质表达效率及可溶性产物的一种新方法[J].中国临床康复,2006,29(10):92-93.
YANG Rui, WANG Shu-xiu, CHEN Zheng-yue, et al. Enhancement of expression efficiency and solubility of recombinant protein in gene engineering by a new mthod[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2006, 29(10): 92-93. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,李春丽)