

Flavobacterium johnsoniae 昆布多糖酶的分 纯化及其催化性质

周亮 朱永涛 陈冠军 刘巍峰*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要: 约氏黄杆菌 *Flavobacterium johnsoniae* 具有分泌裂解酵母细胞壁酶系的能力, 经初步分析发现其发酵液中具有葡聚糖酶、几丁质酶和蛋白酶等活性。通过离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析, 从该菌发酵液中分离纯化到一种昆布多糖酶。该酶分子量为 35 kD 左右, 其最适反应温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 5.0。以昆布多糖和昆布寡糖为底物的反应表明, 该酶以内切酶作用模式进行催化水解。

关键词: 约氏黄杆菌, 葡聚糖, 酵母细胞壁, 昆布多糖酶, 纯化

Purification and catalytic properties of a laminarinase from *Flavobacterium johnsoniae*

ZHOU Liang ZHU Yong-Tao CHEN Guan-Jun LIU Wei-Feng*

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: *Flavobacterium johnsoniae* is capable of secreting enzymes which can efficiently hydrolyze yeast cell wall. Preliminary analysis revealed the presence of glucanase, chitinase and protease activities in its culture supernatant. A laminarinase was purified from the extracellular components of *F. johnsoniae* through several isolation steps including ion exchange, hydrophobic interaction and gel exclusion chromatography. The molecular weight of the purified laminarinase is about 35 kD. The optimum temperature and pH of its catalyzed hydrolysis are 50 °C and 5.0, respectively. Laminarin and laminari-oligosaccharide were hydrolyzed by this laminarinase in an endoglucanase mode with laminaritriose as the main product.

Keywords: *Flavobacterium johnsoniae*, Glucan, Cell wall of yeast, Laminarinase, Purification

约氏黄杆菌 *Flavobacterium johnsoniae* 是一种好氧革兰氏阴性细菌, 广泛存在于土壤和淡水中^[1]。

该菌可以有效地降解几丁质、葡聚糖和蛋白质等生物大分子^[1-4], 在自然界物质循环过程中发挥着重

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z342)

* 通讯作者: Tel: 86-531-88364324; ✉ weifliu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-01; 接受日期: 2011-02-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

要作用^[5]。*F. johnsoniae* 还具有沿基质表面滑行运动的特性^[6], 近年来对于其滑动机制研究较多^[7-11], 并推测其滑动特性与多糖降解能力也可能存在一定联系^[8,12]。

早期研究发现, *F. johnsoniae* 胞外酶系具有降解酵母细胞壁的能力^[2-3,13]。酵母细胞壁主要成分包括 β -葡聚糖、几丁质和甘露聚糖, 其中 β -1,3-葡聚糖所占比例最大, 这是造成酵母细胞壁结构坚固的主要因素^[14]。另外, 这些多糖和蛋白质构成特殊的层状结构^[15], 使得酵母细胞壁更加难以被降解。最早发现的可以降解酵母细胞壁的微生物是环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans*^[16], 随后发现某些链霉菌^[13]和青铜小单孢菌 *Micromonospora chalcea*^[14]等也具有降解酵母细胞壁的能力。Bacon 等于上世纪 70 年代发现 *F. johnsoniae* 可以降解酵母细胞壁, 并从该菌培养液中分离到几种具有葡聚糖酶活性的组分, 但没有得到纯酶; 研究还发现该菌只能攻击经过高压灭菌或巯基乙醇处理过的酵母细胞, 对活细胞没有作用^[2,13]。 β -葡聚糖酶自身具有很高的应用价值, 已经广泛应用于食品和饲料等行业。因此, 对 β -葡聚糖酶及其生产菌株的研究具有广阔的应用前景。

本实验从 *F. johnsoniae* 发酵液中分离纯化到了一种内切昆布多糖酶, 经质谱鉴定其属于糖苷水解酶第 16 家族, 并对其部分生化性质进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基: 菌种: 约氏黄杆菌 ATCC17061 (*Flavobacterium johnsoniae*, UW101), 由美国威斯康星大学 McBride 教授惠送。生长培养基(CYE): Casitone 1%, 酵母提取物 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, Tris 0.12%, pH 7.5; 产酶培养基: 在 Stanier 无机盐培养基中, 加入干酵母至 0.5% (W/V), 调节 pH 至 7.5, 高压蒸汽灭菌。Stanier 培养基: KNO_3 0.1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, CaCl_2 0.01%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, pH 7.5。

1.1.2 主要试剂与仪器: 试剂: 昆布多糖(Laminarin)、几丁质(Chitin)、羧甲基纤维素钠(CMC)、木聚糖(Xylan)、甘露聚糖(Mannan)和除离子树脂(Bed resin)

TMD-8)均购自 Sigma 公司; 地衣多糖(Lichenan)和茯苓聚糖(Pachyman)均购自 Megazyme 公司; 不溶性酵母葡聚糖(Glucan from yeast)、昆布二糖(Laminaribiose)、昆布三糖(Laminaritriose)、昆布四糖(Laminaritetraose)、昆布五糖(Laminaripentaose)和昆布六糖(Laminarihexaose)均为自制, 见国家专利 200810238547.X; 层析树脂 CM Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, Sephacryl S-100HR 均购自 GE Healthcare 公司; 酵母购自济南趵突泉啤酒厂, 经离心、过滤和水洗除去杂质后, 冷冻干燥制成。仪器: 相差显微镜(Olympus), 微分干涉差显微镜(Nikon), 超滤管和超滤系统(Millipore), 蛋白纯化系统和电泳系统(Bio-Rad), 预装疏水柱 TSK-GEL Phenyl-5PW (Tosoh), LC-10AD 高效液相系统(Shimadzu), Aminex HPX-42A 色谱柱(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养: 将实验室-80 °C 保藏的 *F. johnsoniae* 菌种接入生长培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养活化 20 h。将活化菌液转接到产酶培养基中, 在上述条件下培养 24 h。

1.2.2 酵母细胞壁裂解观察: 取产酶培养基培养 24 h 的 *F. johnsoniae* 培养液, 用微分干涉相差显微镜观察菌液中酵母细胞壁裂解情况, 以相同条件培养、但不接种 *F. johnsoniae* 的产酶培养基为对照。进一步将菌液离心得到发酵液, 冷冻干燥处理过的酵母细胞加入发酵液, 30 °C 温浴 36 h, 用相差显微镜观察酵母细胞壁裂解情况。

1.2.3 酶活力测定: 分离纯化过程中昆布多糖酶活力测定: 配制 5 g/L 昆布多糖底物于 50 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中。底物与酶液在 50 °C 反应一定时间, 还原糖产量用 DNS 法检测^[17]。1 min 内产生 1 μmol 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位。酶液中蛋白质含量采用 Bradford 法测定^[18]。

1.2.4 SDS-PAGE: 见蛋白质技术手册^[19]。

1.2.5 昆布多糖酶分离纯化: 将产酶培养基培养 24 h 的菌液(2 L)离心收集粗酶液, 分别经过超滤浓缩(膜包截留分子量为 5 kD)和 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀。用透析袋(截留分子量为 5 kD)将浓缩酶液透析

至 10 mmol/L、pH 4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 采用 CM Sepharose Fast Flow 树脂进行离子交换层析, 0–0.5 mol/L NaCl 线性洗脱, 流速 1 mL/min; 混合洗脱峰中的活性组分, 透析至 10 mmol/L、pH 7.5 的 PB 缓冲液中, 采用 Q Sepharose Fast Flow 树脂进行离子交换层析, 0–0.5 mol/L NaCl 线性洗脱, 流速 1 mL/min; 混合洗脱峰中的活性组分, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 1.1 mol/L, 上样至 10 mmol/L PB、1.1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、pH 7.0 缓冲液平衡过的预装疏水柱上进行疏水层析, 1.1–0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 线性洗脱, 流速 0.5 mL/min; 收集洗脱峰中的活性组分, 经超滤管(截留分子量为 5 kD)浓缩后, 采用 Sephacryl S-100HR 树脂进行凝胶过滤层析, 流速 0.25 mL/min。

1.2.6 酶最适反应温度和 pH 测定: 最适 pH 测定时, 采用 50 mmol/L pH 3.0–8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 50 °C 反应 10 min; 最适温度测定时, 采用 50 mmol/L pH 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 在 30 °C–70 °C 温度梯度中反应 10 min。

1.2.7 底物特异性分析: 本实验用到的底物见表 1。昆布寡糖(DP2–6)降解能力用高效液相色谱分析, 对其他底物均采用 DNS 法分析。

表 1 昆布多糖酶底物特异性

Table 1 Substrate specificity of the purified laminarinase

底物 Substrate	可溶性 Solubility	糖苷键 Glycosidic bond style	降解能力 Ability of degradation
Laminarin	+	1,3- β -D glucan	+
Laminaribiose	+	1,3- β -D glucan	–
Laminaritriose	+	1,3- β -D glucan	–
Laminaritetraose	+	1,3- β -D glucan	+
Laminaripentaose	+	1,3- β -D glucan	+
Laminarihexaose	+	1,3- β -D glucan	+
Pachyman	–	1,3- β -D glucan	–
Glucan from yeast	–	1,3- β -D glucan	–
Yeast cell	–	---	–
Lichenan	+	1,3:1,4- β -D glucan	–
CMC	+	1,4- β -D glucan	–
Chintin	–	1,4- β -GlcNAc	–
Xylan	+	1,4- β -D xylan	–
Mannan	+	1,6- α -D mannan	–

1.2.8 酶解产物分析: 昆布多糖和昆布寡糖酶解产物采用高效液相色谱分析^[20]。酶解后的样品煮沸离心后, 用除离子树脂 TMD-8 进行脱盐处理。采用配有 RID-10A 示差检测器和 Aminex HPX-42A 色谱柱的 LC-10AD HPLC 系统对样品中寡糖成分进行分析。柱温 75 °C, 流速 0.4 mL/min, 流动相为超纯水。

1.2.9 质谱鉴定: 电泳纯蛋白条带切胶后, 由北京华大蛋白质研发中心有限公司以 LCQ Deca XP 质谱仪进行二级质谱鉴定。

2 结果与分析

2.1 *F. johnsoniae* 裂解酵母细胞壁的观察

F. johnsoniae 具有较强的分泌裂解酵母细胞壁酶系的能力。在 Stanier 无机盐培养基中加入经过高压蒸汽灭菌处理后的酵母细胞可以诱导 *F. johnsoniae* 裂解酵母细胞壁的能力^[2]。显微镜观察显示, 不接种 *F. johnsoniae* 的产酶培养基培养 24 h 后, 酵母细胞仍保持完整(图 1A), 而 *F. johnsoniae* 在产酶培养基中培养 24 h 后, 培养基中经过高压蒸汽灭菌处理的酵母细胞发生明显裂解(图 1B)。此外, *F. johnsoniae* 发酵液对冷冻干燥处理过的酵母细胞也具有明显的破壁作用(图 1C 和 1D)。因此, 高压蒸汽灭菌处理的酵母细胞可以有效地诱导 *F. johnsoniae* 分泌产生酵母细胞壁裂解酶(系)。

2.2 *F. johnsoniae* 昆布多糖酶的分离纯化

由产酶培养基所得的 *F. johnsoniae* 发酵液进行如图 2 所示的分离纯化。粗酶液经超滤浓缩后, 进一步通过离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析分离, 最终得到一个电泳纯的昆布多糖酶组分, 该酶分子量为 35 kD 左右(图 3)。在对纯化的蛋白质进行一级质谱分析获得肽指纹图谱信息的基础上, 进一步进行二级质谱分析, 依据肽碎片离子质量信息共获得 3 段多肽片段序列, 数据库检索结果表明, 这些肽段序列与 *F. johnsoniae* 基因组相应编号为 *fjoh_4177* 基因编码的第 16 家族糖苷水解酶 N 端催化结构域部分高度匹配(图 4)。由于该基因的编码蛋白理论分子量为 143 kD, 远高于本实验纯化到的蛋白分子量, 因此, 产生此差异的原因还有待进一步深入研究。

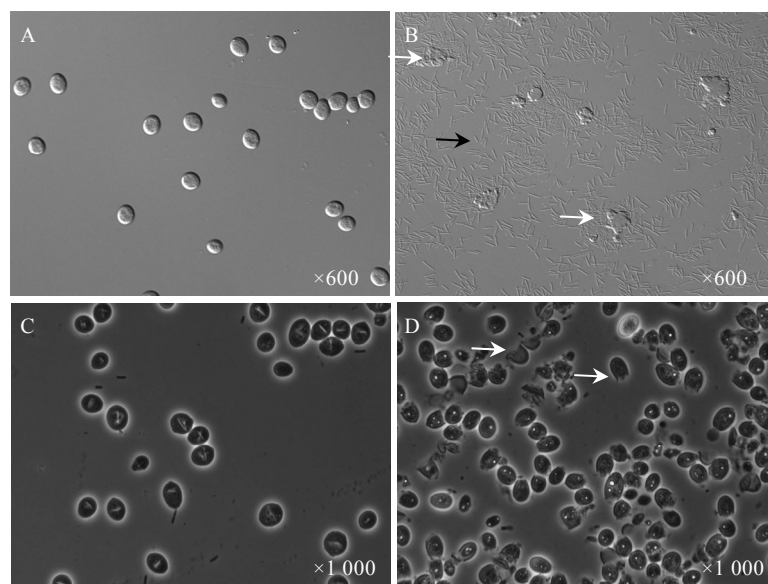


图1 产酶培养基中裂解酵母形态与发酵液酶解冷冻干燥酵母形态

Fig. 1 Morphology of yeast cells in enzyme-producing medium inoculated with *F. johnsoniae* (B) or frozen-dried yeast cells treated with culture supernatant of *F. johnsoniae* (D)

Note: A is control of B, with no inoculation of *F. johnsoniae*; C is control of D, treated with heat-inactivated culture supernatant of *F. johnsoniae*. White arrow: Yeast; Black arrow: *F. johnsoniae*. Photos A and B were taken under a differential interference contrast microscope; photos C and D were taken under a phase contrast microscope.

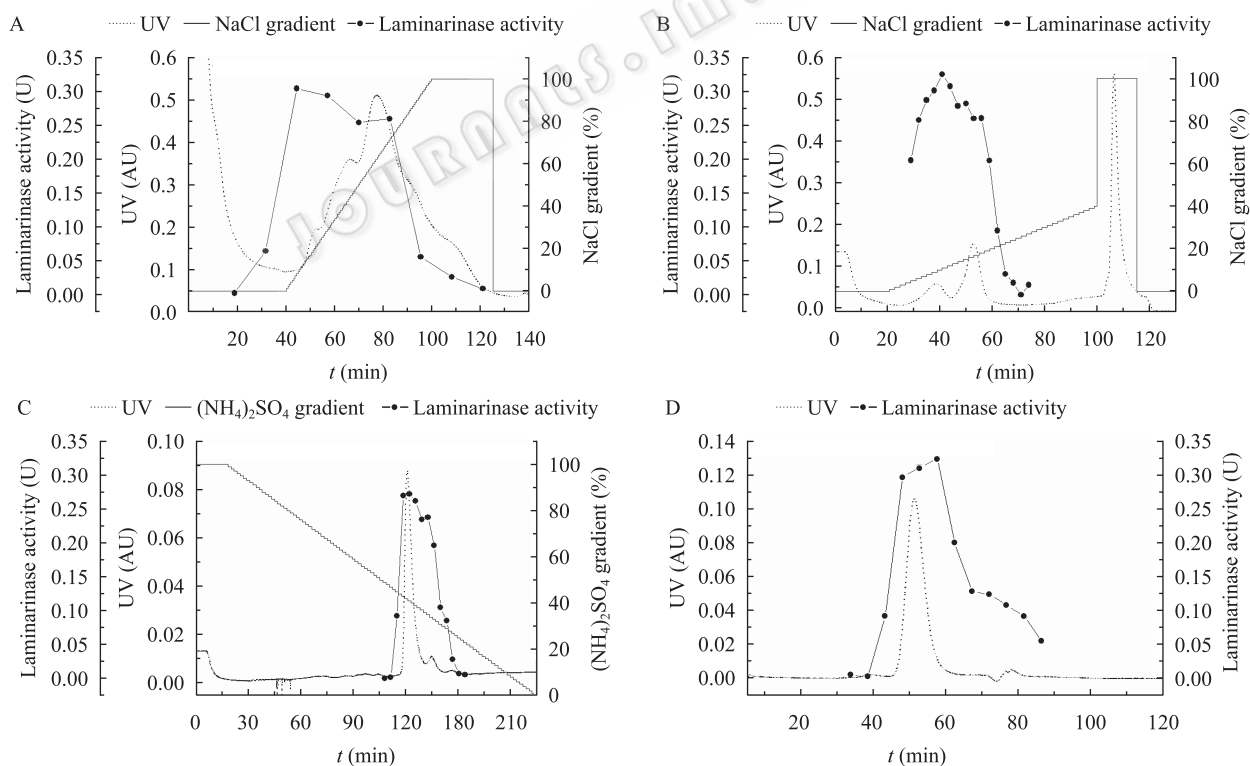


图2 昆布多糖酶的分离纯化

Fig. 2 Separation and purification of laminarinase

Note: A: CM Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography; B: Q Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography; C: TSK-GEL Phenyl-5PW hydrophobic interaction chromatography; D: Sephacryl S-100HR gel exclusion chromatography.

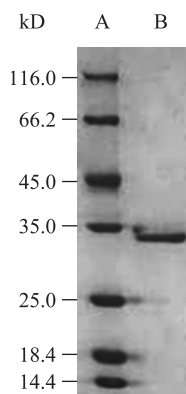


图3 纯化昆布多糖酶 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified laminarinase

Note: A: Protein marker; B: Laminarinase.

```

1  MGFITVINFTNKKLKMNQNSFFGRPPKNNFSYFKFLAVAVFVLLPFLKVQAQCKTLVW
61  SDFNNGTIVDLTKWQSISGNGCPSLCGFGNAAEQRYDPNQATIVKEGINSYLNIEAKYQP
121  SGSFDPQPYASSKLTTEGKYSLKYGRVEARMKLSNGQGAPAFWMLPVNGNMPYTGELDI
181  MEAKHRNPQSVDGTIHYDGNGYHFTGRSYSSPTDLSTDFHUYAVEKGPNEIKKEVDVLF
241  HEATPNTTVNGGMPFNDSQFYIILNLAVGSAGTPYTSVNGAGVPPVPGDFPAKLQVDYVR
301  VYDGSYKYGVAGDAKVYQNETSKTYSISAIAGAAYNWTVPAGASITSGQGTNSITVNWGT
361  AGDVSVTATTSGCTANTYKLAVTTEPAIPVEKIHEDFQSNRNNVLYPVVRTGVLTEAVANP
421  SATGINTSALVGRYVRNSSELYDVLNIRNVTITNANDYVYGRKRLSFDIYTSAPVGTKIS
481  MQLENSNVTTATNYPSGRHSGFKATTTVQNKWETIEFEFEKIIDPNTSALTINNVLLFE
541  SNSNSGATYYFDNLLTKAAPEKPIVATDVLQNYDGINKIKGTTTGTYSVVANPGSNSVN
601  SSANVAKYVRNVTEQYDVLFFNTQTSIEDAGLFKNQTNKILIDVYTTAPVGTVSMNFEN
661  SAASLPANYPTGRNSNYVAITTKQNQWETLTFYYNSSPDAGTSNLAVNQMVLLFNSGSYT
721  NDYYFDNIRIASTKLPDFTTPGVVYEDYQNTHNITFRDAIGTYTANVANPSAGGINTSS
781  NVGRYVRKSTELYDNFSFNTLLNIGDFKAGTKKFAMDVYTSAPVGSIIISWQAESSASIP
841  SNYPVGRHSIYQGVVQTNTWHTITFTYVSTPDASTADNDVNRVFLFEPGTNSGNTYFYF
901  DNLRALNLVSTETPAGLPSPISTDLGAVTPAGEATHSNGTFTIKGSGTDIWETSDFQY
961  VNQPITGDAEIIAKVNSLTNINTYAKAGVMFRETLTPTSKHVMTDASAAAGIEFLSRNNT
1021  SGVTTAEVVTGAAPKWVRLVRSGNFTTSYSSDNGTTWTQVGPTKTITMANTIIYAGMAVTS
1081  HANGTLATGVFSDVIVRNITSNPNVNLALGKTATASTEENPTLSAGKATDGDGTVSRWAS
1141  SFANATEWIVVDLGSNYNLRVVLKWEAAYAAQYKQLSTDNVFTENETINTQTASDGGT
1201  DDLTVSGTGRYLRILCTTKALAPYGSLYEIEAYGSASTAKKANIVEETQAENTAFAVYP
1261  NPAGNYIQVSLPENLNNKIIITIDNSGTMLMLQNKPEANASESVIDLSRLTKGIYILNFKS
1321  DQKSWTKKLIKQ

```

图4 Fjoh_4177 蛋白全序列与纯化昆布多糖酶二级质谱肽段序列

Fig. 4 Amino acid sequence of Fjoh_4177 and peptide sequences of the purified laminarinase identified by MS/MS

Note: The MS/MS identified sequences are underlined; The catalytic domain annotated by NCBI is in italic bold.

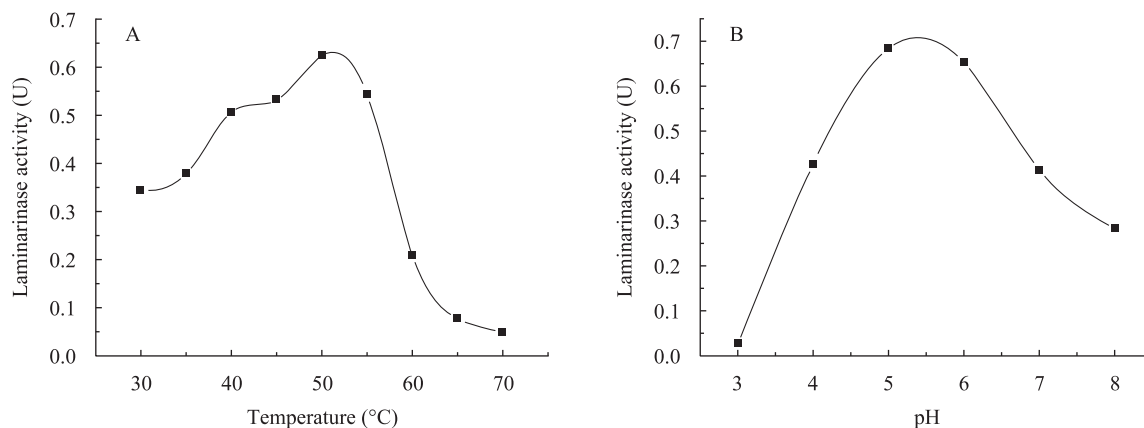


图5 昆布多糖酶温度和 pH-活力曲线

Fig. 5 Effects of temperature and pH on activities of the purified laminarinase

力(表 1)。从表 1 可以看出,除昆布多糖外,该酶只能降解聚合度在 4 以上的可溶性 β -1,3-葡聚糖。另外,该酶对不溶性酵母葡聚糖和酵母细胞没有作用,也不具有催化断裂 β -1,4-糖苷键的能力。

2.5 酶解产物分析

为进一步研究昆布多糖酶的催化水解模式,将酶与昆布多糖反应 5、15、30 min 后,采用 HPLC 进行产物分析。由图 6A 可以看出,随着反应时间

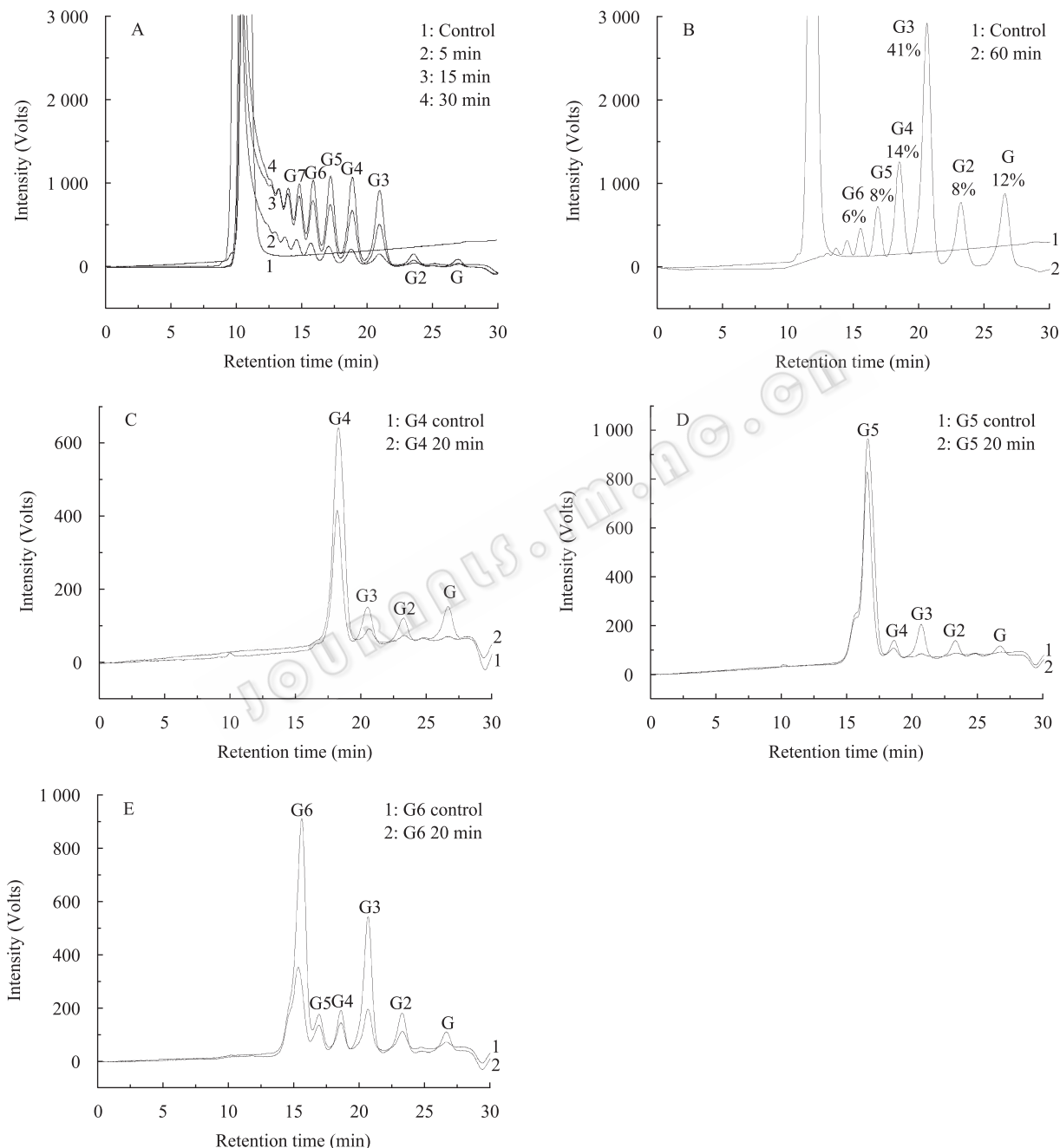


图 6 昆布多糖及昆布寡糖酶解产物 HPLC 分析

Fig. 6 HPLC analysis of products from laminarin and laminari-oligosaccharides treated with the purified laminarinase

Note: Controls in A and B: Laminarin treated with heat-inactivated laminarinase; Controls in C, D and E: Laminaritetraose, laminaripentaose and laminarihexaose treated with heat-inactivated laminarinase, respectively.

延长, 昆布多糖逐渐被降解, 随机切割产生连续分子量的寡糖, 产物浓度随反应时间延长而增加, 但产物中葡萄糖和昆布二糖的量很低。当增加酶量和延长反应时间至 60 min 时, 昆布三糖积累明显并成为主要产物, 占有产物总量的 41% (图 6B)。同时以昆布寡糖为底物进行产物分析的结果表明, 该酶对昆布二糖和昆布三糖没有降解能力, 对昆布四糖的降解产物为葡萄糖、昆布二糖和昆布三糖(图 6C); 昆布五糖的降解产物为葡萄糖、昆布二糖、昆布三糖和昆布四糖(图 6D), 而昆布六糖则可被降解为葡萄糖、昆布二糖、昆布三糖、昆布四糖和昆布五糖(图 6E)。其中, 昆布五糖和昆布六糖酶解产物中昆布三糖占比例较大。以上结果说明, 该昆布多糖酶表现为典型的内切酶水解模式, 可随机攻击一定聚合度的昆布多糖中的糖苷键而产生不同大小分子量的寡糖。

3 讨论

本研究从 *F. johnsoniae* 发酵液中分离纯化到一种昆布多糖酶, 研究结果表明其以内切酶方式作用于可溶性葡聚糖底物的 β -1,3-糖苷键。该酶对完整酵母细胞壁没有作用, 可能是因为酵母细胞壁的高分子量葡聚糖多为不溶性聚糖, 其完全裂解破坏需要多种酶系的共同作用才可以完成。试验中我们也确实发现, 除昆布多糖酶外, 还可在 *F. johnsoniae* 发酵液中检测到不溶性葡聚糖降解酶、几丁质酶、蛋白酶等活性, 并同时对其中的部分酶系进行了分离纯化和性质研究。不溶性葡聚糖降解酶很可能在酵母细胞壁的初始降解过程中发挥着关键作用, 而本研究所分离获得的昆布多糖酶更可能是作用于不溶性酵母细胞壁多糖水解之后所形成的可溶性产物, 并最终导致细胞壁的完全裂解。*F. johnsoniae* 基因组已经测序, 通过对其基因组信息进行分析, 发现其含有大量与生物大分子降解相关的酶编码基因, 其中包括 125 个蛋白酶、138 个糖苷水解酶、9 个聚糖裂解酶和 17 个糖酯酶的编码基因^[4]。基因组中大量生物大分子降解酶基因的存在, 不仅可解释该菌对酵母细胞壁进行有效裂解的原因, 同时也为

我们开发利用这些基因资源提供了一个很好的材料。对 *F. johnsoniae* 胞外酶系的系统深入研究, 可促进其在提高酵母等真菌细胞壁裂解中的应用, 从而获得高附加值的酵母细胞内含物和免疫活性胞壁多糖, 产生一定的社会经济利益。

参 考 文 献

- [1] Stanier RY. Studies on nonfruiting myxobacteria: I. *Cytophaga johnsonae*, n. sp., a chitin decomposing myxobacterium[J]. J Bacteriol, 1947, 53(3): 297-315.
- [2] Bacon JS, Gordon AH, Jones D, et al. The separation of beta-glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls[J]. Biochem J, 1970, 120(1): 67-78.
- [3] Bacon JS, Gordon AH, Webley DM. Fractionation of the beta-glucanases in a *Cytophaga johnsonii* culture filtrate lysing yeast cell walls[J]. Biochem J, 1970, 117(2): 42-43.
- [4] McBride MJ, Xie G, Martens EC, et al. Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(21): 6864-6875.
- [5] Kirchman DL. The ecology of cytophaga-flavobacteria in aquatic environments[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 39(2): 91-100.
- [6] McBride MJ. *Cytophaga-flavobacterium* gliding motility[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004, 7(1/2): 63-71.
- [7] Braun TF, Khubbar MK, Saffarini DA, et al. *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes identified by mariner mutagenesis[J]. J Bacteriol, 2005, 187(20): 6943-6952.
- [8] McBride MJ, Braun TF, Brust JL. *Flavobacterium johnsoniae* GldH is a lipoprotein that is required for gliding motility and chitin utilization[J]. J Bacteriol, 2003, 185(22): 6648-6657.
- [9] Rhodes RG, Samarasam MN, Shrivastava A, et al. *Flavobacterium johnsoniae* gldN and gldO are partially redundant genes required for gliding motility and surface localization of SprB[J]. J Bacteriol, 2010, 192(5): 1201-1211.
- [10] Nelson SS, Bollampalli S, McBride MJ. SprB is a cell surface component of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility machinery[J]. J Bacteriol, 2008, 190(8): 2851-2857.
- [11] Nelson SS, Glocka PP, Agarwal S, et al. *Flavobacterium johnsoniae* SprA is a cell surface protein involved in gliding motility[J]. J Bacteriol, 2007, 189(19): 7145-7150.
- [12] McBride MJ, Braun TF. GldI is a lipoprotein that is re-

- quired for *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility and chitin utilization[J]. J Bacteriol, 2004, 186(8): 2295-2302.
- [13] Bacon JSD, Milne BD, Taylor IF, et al. Features of the cell-wall structure of yeast revealed by the action of enzymes from a non-fruiting myxobacterium (*Cytophaga Johnsonii*)[J]. Biochem J, 1965, 95: 28C-30C.
- [14] Gacto M, Vicente-Soler J, Cansado J, et al. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(6): 961-967.
- [15] Cid VJ, Duran A, del Rey F, et al. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol Rev, 1995, 59(3): 345-386.
- [16] Tanaka H, Phaff HJ. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. I. Isolation of wall-decomposing organisms and separation and purification of lytic enzymes[J]. J Bacteriol, 1965, 89: 1570-1580.
- [17] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-427.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [19] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-100.
- [20] Zhu Y, Li H, Zhou H, et al. Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(16): 6432-6437.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2011 年的每册定价为 48 元,全年 576 元,我们将按期免费邮寄。

另,本编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511

E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817

国外发行代号: BM413