

枯草芽孢杆菌植酸酶的研究进展*

范继英, 何月秋**

(云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 枯草芽孢杆菌通过分泌植酸酶分解植酸, 释放磷元素, 促进动植物磷的吸收。主要综述了枯草芽孢杆菌植酸酶作用机理、酶学性质、分离纯化、分类地位和基因工程方面的研究进展, 以便为该酶的深入研究和应用提供借鉴作用。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 植酸; 植酸酶

中图分类号: S 432.42; Q 55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)06-0715-06

Brief Review of Secreted Phytases from *Bacillus subtilis*

FAN Ji-ying, HE Yue-qiu

(The Key Laboratory for Agricultural Biodiversity for Pest Management of China Education Ministry, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* can hydrolyze phytate, release phosphorus and improve phosphorus nutrition of plants and animals by secreting phytases. This review briefly summarizes the research progress on phytases from *Bacillus subtilis* in effect mechanism, property, isolation, purification and taxonomy of the enzyme and gene engineering to speed up the deep research and exploitation of the enzyme.

Key words: *Bacillus subtilis*; phytate; phytases

植酸酶是催化植酸及植酸盐水解产生肌醇和磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称^[1]。植酸酶广泛地分布于植物性饲料中。虽然研究真菌分泌植酸酶较多,但近年来的研究发现细菌也能分泌植酸酶。产生植酸酶的细菌主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)、链球菌(*Streptococcus* spp.)、肠杆菌(*Enterobacter* spp.)、克雷伯菌(*Klebsiella* spp.)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)等^[2-6]。NELSON等首次证明了微生物植酸酶能够水解饲料中的植酸磷,释放磷元素^[7]。这一发现大大推动了微生物植酸酶的研究进程。大量研究表明,不同来源的植酸酶的作用机理和酶学性质存在很大差异。由于许多枯草芽孢杆菌具有良好抑制丝状植物病原真菌和促进植物生长的作用,在农业生产中起作越

来越重要作用。它们除产生植物激素、蛋白酶、淀粉酶、脂酶外,还产生植酸酶以及其他丰富的代谢产物促进植物生长。此外,由于植酸酶在饲料业中的广泛应用价值,枯草芽孢杆菌来源的植酸酶研究也越来越深入和取得了长足进展。

1 枯草芽孢杆菌植酸酶的作用机理

植酸酶水解植酸是分步进行的。植酸酶将植酸分子上的磷酸基团逐个切下,形成肌醇五磷酸酯至肌醇一磷酸酯不同的中间产物,最终产物是肌醇三磷酸与一些无机磷^[8]。但不同来源的植酸酶其作用机理不完全相同。KEROVUO等^[9]利用高效液相色谱法(HPLC)分析了芽孢杆菌 *PhyC* 酶学反应的峰值,以植酸化学水解产物为对照,反应开始时,植酸的峰值记为 Peak I;酶学反应 10 min 后,肌醇-(1,2,4,5,6)五磷酸为主要产物,伴有少量的

收稿日期: 2006-03-31

* 基金项目: 云南省应用基金资助(2000C0052M)。

** 通讯作者

作者简介: 范继英(1979-),女,云南建水人,硕士研究生,主要从事枯草芽孢杆菌基因工程研究。

肌醇-(1,2,3,4,5)五磷酸肌醇-(1,2,3,4,6)五磷酸、肌醇-(2,4,5,6)四磷酸和肌醇-(1,2,3,5)四磷酸;反应 30 min 后,植酸(Peak I)和肌醇-(1,2,4,5,6)五磷酸的峰值降低,而肌醇-(2,4,5,6)四磷酸和肌醇-(1,2,3,5)四磷酸的峰值上升;反应 90 min 后,只有一种主要的肌醇三磷酸峰值(Peak A),Peak A 有可能是肌醇-(1,3,5)三磷酸或者肌醇-(2,4,6)三磷酸,在 Peak A 的两侧微凸表明产物中还包含有少量的肌醇-(1,4,5)三磷酸。KEROVUO 等根据这一试验结果并结合计算机模拟得到了植酸酶水解植酸的模型,他们认为植酸首先通过第 2 位和第 4 位磷酸结合在酶的浅裂缝侧翼,第 3 位磷酸因面对活性部位而被切割,释放出肌醇-(1,2,4,5,6)五磷酸中间产物;接着肌醇五磷酸再通过第 2 位和第 6 位磷酸结合至裂缝侧翼,第 1 位磷酸面对活性部位而被切割,形成肌醇-(2,4,5,6)四磷酸;同理,形成的肌醇-(2,

4,5,6)四磷酸仍然能结合到植酸酶的浅裂缝侧翼,五磷酸面对活性部位被切割后形成肌醇-2,4,6-三磷酸;而肌醇-2,4,6-三磷酸已没有磷酸可面对活性位点,因此肌醇-2,4,6-三磷酸水解植酸酶的终产物。如果植酸是通过第 1 位和第 3 位磷酸结合到植酸酶浅裂缝侧翼,植酸水解终产物将为肌醇-1,3,5-三磷酸。

2 枯草芽孢杆菌植酸酶的酶学性质

不同来源的植酸酶的酶学性质不同(表 1)。大部分植酸酶最佳活性所需的 pH 值范围在 2.0~6.0 之间,为酸性植酸酶,最适温度值在 53~70℃。因此,酸性植酸酶主要适用于 pH 值呈酸性的单胃动物,如猪、禽及少数鱼类,但不适于消化道呈中性的鲤科鱼类。植酸酶的这种适用于酸性胃动物的特点,限制了植酸酶应用范围和该行业的发展。但枯草芽孢杆菌的植酸酶呈中性^[3]。王亚茹等^[10]研

表 1 已分离克隆到的植酸酶基因

Tab. 1 Phytase genes isolated from microorganisms

来源 origin	编码 基因 gene	ORF 长度/bp length of OR	氨基酸个数 No. Amino acid	理论分子量/D molecular weight	最适 pH optimum pH value	最适温度/℃ optimum temperature	RHGXRXP 位点 Site of R HGXRXP	氨基酸序列 同源性/% aa homology
黑曲霉 <i>NRRL3135</i> , <i>ALK0243</i> ^[12-14] <i>Aspergillus niger (ficuum)</i> <i>NRRL3135</i> , AL K0243	phyA	1 506	467	51 075	2.5, 5.5	55	有	100
黑曲霉 963 ^[15] <i>A. niger</i> 963	phyA	1 506	467	51 142	1.8, 5.7	57	有	92
构巢裸孢壳 ^[16] <i>Emericella nidulans</i>	phyA	1 446	463	51 785	-	-	有	63
棉状嗜热丝孢菌 ^[17] <i>Thermomyces lanuginosus</i>	phyA	1 481	474	51 920	6.0	75	有	48
酵母菌 ^[18] <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	phyA	1 283	461	51 560	2.7, 5.0	70	有	18
黑曲霉 <i>NRRL3135</i> , <i>ALK0243</i> ^[12] <i>Aspergillus niger (ficuum)</i> <i>NRRL3135</i> , AL K0243	phyB	1 616	479	52 611	2.5	55	有	20
大肠杆菌 ^[19] <i>Escherichia coli</i>	appA	1 299	432	-	2.5 ~ 3.5	55	有	19
玉米 ^[20] <i>Zea mays</i>	PHYS11	1 167	388	41 662	4.8	55	有	5
大豆 ^[21] <i>Soybean</i>	GmPhy	1 644	547	-	4.5 ~ 5.0	58	无	-
地衣芽孢杆菌 ^[22] <i>B. licheniformis</i>	phyL	1 146	381	-	6.0	65	无	-
枯草芽孢杆菌 ^[23] <i>Bacillus subtilis</i>	phyC	1 152	383	41 802	7.0	55	无	6

注:“-”表示未报道。“-” shows no related report.

究发现,植酸酶的最适温度为 55℃,在 pH 7.0 ~ 7.5 范围以外,酶活性下降较快。胡勇等^[11]发现酶的最适 pH 为 7.0,但在 pH 6.0 ~ 8.0 范围内活性都较高,接近最大值。从稳定性来看,该酶在 pH 6.0 ~ 10.0 之间稳定。王亚茹等^[10]分析阳离子对植酸酶活性的影响发现,枯草芽孢杆菌植酸酶的生物学活性依赖 Ca^{2+} 的存在,并且 Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 等金属离子对植酸酶活性均有不同程度的抑制作用。

3 枯草芽孢杆菌植酸酶 PhyC 的分离纯化

王亚茹等^[10]报道的植酸酶 PhyC 的分离方法是:将样品稀释涂布于细菌营养肉汁平板上,在 28℃ 下培养 2 ~ 3 d 后,挑取单菌落至含植酸钙的筛选平板上,30℃ 培养 3 d,挑取产生透明消解圈的菌株即能分离得到产生植酸酶的菌株。但有些细菌可能因产生酸性代谢产物而出现消解圈,产生假阳性现象。因此,必须进一步测定菌株的植酸酶活性以确定其是否产生了植酸酶。

植酸酶活性的测定方法是:将菌株于细菌营养肉汁液体培养基上 30℃ 振荡培养过夜后,按 10% 的接种量于 1 L WBE 培养基(100 g 麸皮加到 900 mL 水中,121℃ 处理 1 h,8 层纱布过滤,滤液定容到 1 L,加入 0.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g KH_2PO_4 , 0.04 g K_2HPO_4 , 2 g CaCl_2 , 10 g Casitone, 1.5% 琼脂, pH 6.5) 30℃ 300 r/min 振荡培养 4 d,每 12 h 取 5 mL 培养液离心取上清液用于测定酶活性。取 0.2 mL 酶稀释液加入 0.8 mL 1.25 mmol/L 的植酸钠(用含 1 mmol/L CaCl_2 的 0.25 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 配制) 37℃ 保温 30 min,加入 1 mL 10% TCA 终止酶反应后,再加入 2 mL 硫酸亚铁-钼酸氨显色液,700 nm 测定无机磷含量。以每分钟释放出 1 μmol 无机磷所需的酶量定义为一个酶活性单位来计算酶的活性。

据王亚茹等^[10]报道,枯草芽孢杆菌植酸酶的纯化均在 4℃ 下进行。将培养 4 d 的培养液离心后去菌体,在上清液中加入 CaCl_2 至终浓度 1 mmol/L,再加入 3 倍体积无水乙醇,混匀后于 -20℃ 过夜。离心后的沉淀用 -20℃ 乙醇洗涤 2 次,冷冻干燥后重悬于含 100 mL 1 mmol/L CaCl_2 的 Tris-HCl(pH 7.5) 缓冲液中,加入硫酸铵至饱

和度 65%, 4℃ 过夜,离心取上清,加入硫酸铵至饱和度 85%,重悬于上一步所述缓冲液中。所得到的植酸酶蛋白进一步用 HPLC 进行纯化得到纯酶,总回收率为 18%,纯化倍数为 1 000。1998 年 KIM 等人^[5]报道,除了快速蛋白液相色谱(FPLC)外其余步骤均在 4℃ 进行, CaCl_2 终浓度为 1 mmol/L。在植酸酶粗提液中加入等体积的丙酮搅拌 30 min 后放置 1 h,吸去上清后,剩余液体离心去上清,沉淀中加入 20 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0),离心,加入硫酸铵至终浓度为 1.5 mmol/L,酶溶液经苯基琼脂糖凝胶柱处理后,再用线性梯度下降的硫酸铵进行洗脱,然后加入 MES(pH 6.0) 缓冲液的酶液进行透析处理,转至 Resource S 柱进行洗脱,洗脱后的酶液加入同样缓冲液后用 0 ~ 0.5 mol/L 线性梯度的 NaCl 再洗脱,最后通过 Superose 12 HR 10/30 进行纯化。总回收率为 10%,纯化倍数为 77 倍。

从上述两组试验来看,植酸酶的纯化条件是:(1) 纯化要求在 4℃ 低温下进行;(2) Ca^{2+} 的存在是必要的;(3) 多步洗脱和浓缩。

4 枯草芽孢杆菌植酸酶的分类地位

从 NCBI 和 USA 等数据库信息分析,水解植酸的酶可分为 3 类:组氨酸酸性磷酸酶(histidine acid phosphatase)、 β 螺旋植酸酶(β -propeller phytase)和紫酸磷酸酶(purple acid phosphatases)^[24]。许多真菌分泌的植酸酶都属于组氨酸酸性磷酸酶。来源于丝状真菌,尤其是曲霉的 phyA 基因(表 1),无论在核苷酸来源、编码的氨基酸序列等基因结构上,还是在基因产物的酶学性质上均有较高的相似性,而且都具有组氨酸酸性磷酸酶保守活性位点(RHGXRXP)^[25],都属于组氨酸酸性磷酸酶家族。而大肠杆菌植酸酶基因 appA 编码双功能酶且含有 RHGXRXP 序列,也将其归为组氨酸磷酸酶家族。大多植物具有紫酸磷酸酶,该酶为同源二聚体糖蛋白(homodimeric glycoprotein),且有一个 Fe(III)-Zn(II)活性位点^[26]。

然而,来源于芽孢杆菌的植酸酶编码基因较短,编码蛋白的分子量也较小,它的核苷酸序列及编码的氨基酸序列与 phyA 和 phyB 及已报道的酸性磷酸酶基因没有同源性,也没有普遍存在于

phyA 和 phyB 编码蛋白上的活性位点保守序列 RHGXRXP, 不属于组氨酸酸性磷酸酶家族, 而属于 β 螺旋植酸酶。

β 螺旋植酸酶具有 6 向折叠构象的结构, 每个蛋白分子具有 6 个 Ca^{2+} 绑定位点, 植酸酶的活性依赖于 Ca^{2+} 的存在。但是, 不同来源的芽孢杆菌植酸酶性质也相互区别。将不同来源的芽孢杆菌

植酸酶的 DNA 序列进行比对(表 2), 发现源于地衣芽孢杆菌的植酸酶基因 phyL 与源于枯草芽孢杆菌 VTTE - 68013 的植酸酶基因 phyC、源于解淀粉芽孢杆菌的植酸酶基因 TS - phy 在蛋白水平上的同源性分别为 67% 和 65%, 与枯草芽孢杆菌 168 的植酸酶基因 phyA 的同源性为 69%, 而 phyC 与 TS - phy 间的同源性完全一致。

表 2 已克隆到的芽孢杆菌属植酸酶基因

Tab. 2 Phytase genes isolated from *Bacillus*

来源 origin	编码基因 gene	ORF 长度/ bp length of ORF	氨基酸个数 No. Amino acid	理论分子量/ D olecular weight	最适 pH optimum pH value	最适温度/°C optimum temperature	蛋白质水平同源 性* / % Protein homology
枯草芽孢杆菌 VTTE - 68013 ^[3] <i>Bacillus subtilis</i> VTTE - 68013	phyC	1 152	383	41 802	7. 0	55	67
枯草芽孢杆菌 ^[23] <i>Bacillus subtilis</i>	nphy	1 152	383	41 802	7. 0	55	67
枯草芽孢杆菌 168 ^[22] <i>Bacillus subtilis</i> 168	168phyA	1 149	382	NR	6. 0	55	69
解淀粉芽孢杆菌 ^[6] <i>B. amyloliquefaciens</i>	TS - phy	1 152	383	41 808	NR	70	65
地衣芽孢杆菌 ^[22] <i>B. licheniformis</i>	phyL	1 146	381	NR	6. 0	65	-

* 表示与地衣芽孢杆菌编码的植酸酶蛋白相比; NR 表示未报道。

* shows the homology at protein level compared with phytase secreted by *B. licheniformis*. NR : no report.

5 枯草芽孢杆菌植酸酶基因工程

5.1 枯草芽孢杆菌植酸酶基因结构

从表 1 可以看出, 来源于丝状真菌的植酸酶编码基因比源于芽孢杆菌的基因长, 其编码的氨基酸数在 460 ~ 480 之间。枯草芽孢杆菌植酸酶基因 phyC 全长 1 290 bp, 其主要的 ORF 全长 1 152 bp, 编码 383 个氨基酸, 其 N 端的前 26 个氨基酸为信号肽, 切割位点位于 + 26 位的 Ala 之后^[23]。phyC 含有一个 - 35 序列 (TTGACA)、一个 - 10 序列 (TAACAC) 和一个核糖体结合位点。核糖体结合位点含 9 个核苷, 即 AAGGAGGAA, 其中有一保守序列 GGAGG。终止子 (TAA) 位于一个二重对称茎环结构的后面中止转录^[3]。而枯草芽孢杆菌 168 的植酸酶基因 168phyA 的 ORF 为 1 149 bp, 只编码 382 个氨基酸^[22]。

5.2 枯草芽孢杆菌植酸酶的转基因技术

近年来, 随着枯草芽孢杆菌植酸酶基因研究的

白热化, 枯草芽孢杆菌植酸酶的基因克隆也越来越引起人们的关注。

KEROVUO 等^[3] 将枯草芽孢杆菌 VTTE - 68013 植酸酶基因转入大肠杆菌, 后者表达了植酸酶的活性, 新表达的植酸酶的酶学性质与天然的植酸酶相同。YIP 等^[24] 将枯草芽孢杆菌植酸酶基因转入烟草, 在磷酸盐限制条件下, 转基因烟草植株形态学和生理学指标都得到了显著提高, 降解产生的磷酸盐足以维持植株的生长, 而且植酸酶的表达水平持续地稳定在较高水平。

王红宁等^[27] 根据枯草芽孢杆菌 WHNB02 植酸酶 phyC 基因全序列设计一对引物, 采用 PCR 技术从含有该基因的 pUC182phyC 质粒上获得不含有信号肽序列的 phyC 基因表达片段, 亚克隆到毕赤巴斯德表达载体 pPIC9K 的多克隆位点, 并电转化毕赤巴斯德酵母 GS115。经 MD 和 MM 平板筛选、酶活性测定, 获得了阳性转化子 PP9KC。首次在毕赤巴斯德酵母中实现了有生物学活性的枯

草芽孢杆菌植酸酶的分泌性表达。

6 结束语

众所周知,植酸酶是近年来出现的一种新型绿色添加剂,它催化植酸水解产生肌醇和无机磷酸盐,消除植物性饲料或食品中植酸的抗营养作用,提高机体对蛋白质及多种微量元素的利用率,促进生长发育,减少粪便或土壤中磷的残留量,从而降低磷对环境造成的污染^[6]。以黑曲霉 NRRL3135 等为代表的酸性植酸酶,仅适合于 pH 呈酸性的单胃动物,在应用上存在局限性。

枯草芽孢杆菌分泌的植酸酶在催化机理、酶学性质、分类地位及基因结构等方面都与传统的酸性植酸酶相区别,属于中性植酸酶。这一新型的植酸酶可在 pH 为中性的肠道中起作用,提高了植酸酶在动物的胃肠道的效用,从而弥补了酸性植酸酶性质上的不足,拓宽了植酸酶的应用范围。此外,植酸酶基因的克隆和转植酸酶基因植物的应用,有望提高植物的磷营养状况。

[参考文献]

- [1] NELSON T S, SHIEL T R, WEODZINSKI R J, et al. . The availability of phytate phosphorous in soybean before and after treatment with a mold phytase[J]. Poultry Science, 1968, (47): 1842 - 1848.
- [2] ASHOK P, GEORGE S, CARLOS R, et al. . Production, purification and properties of microbial phytases [J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 203 - 214.
- [3] KEROVUO J, LAURAEUS M, NURMINEN P, et al. . Isolation, Characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental. Microbiology, 1998, 64 (6): 2079 - 2085.
- [4] KEROVUO J, TYNKKYNEN S. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 325 - 329.
- [5] KIM Y O, KIM H K, BAE K S, et al. . Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 2 - 7.
- [6] KIM Y O, LEE J K, KIM H K, et al. . Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 162: 185 - 191.
- [7] NELSON T S. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chick [J]. Journal of Nutrition, 1971, 101: 1289 - 1294.
- [8] 刘梅,王林云,史挺,等. 植酸酶的研究进展[J]. 辽宁畜牧兽医, 2003, (2): 35 - 37.
- [9] KEROVUO J, ROUVINEN J, HATZACK F. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus subtilis*: indication of a novel reaction mechanism [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 2 - 7.
- [10] 王亚茹,姚斌,曾虹,等. 枯草芽孢杆菌中性植酸酶的纯化和酶学性质[J]. 微生物学报, 2001, (4): 198 - 203.
- [11] 胡勇,王红宁,吴琦,等. 枯草芽孢杆菌 WHNB02 植酸酶的酶学性质研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25 (4): 16 - 20.
- [12] PIDDINGTON C S, HOUSTON C S, PALOHEIMO M, et al. . The cloning and sequencing of the genes encoding phytase(phy) and pH 2.5 - optimum acid phosphatase(aph) from *Aspergillus niger* var. *awamori*[J]. Gene, 1993, 133: 55.
- [13] VAN H M, VAN Z C, HARTVELD G M, et al. . Cloning, characterization and over-expression of the phytase encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*[J]. Gene, 1993, 127: 87 - 94.
- [14] EHRlich K C, HELLY V R, et al. . Molecular cloning, expression and evaluation of phosphatohydrolases for phytase-degrading activity [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1995, 14: 396 - 402.
- [15] 姚斌,张春义,王建华,等. 产植酸酶的黑曲霉菌株筛选及其植酸酶基因克隆[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 1 - 6.
- [16] PASAMONTES L, HAIKER M, HENRIQUEZ H M, et al. . Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1353: 217 - 223.
- [17] BERKA R M, REY M W, BROWN K M, et al. . Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 4423 - 4427.
- [18] MOORE E, HELLY V R, CONNEELY O M, et al. . Molecular cloning, expression and evaluation of phosphatohydrolases for phytate-degrading activity [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,

- 1995, 14 (5): 396 - 402.
- [19] RODRIGUEZ E, MULLANEY E J, LEI X G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 268(2): 373 - 378.
- [20] ULLAH A H J, DISCHINGER H C. Identification of active site residues in *Aspergillus ficum extracellular* pH 2.5 optimum acid phosphatase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 192: 754 - 759.
- [21] HEGEMAN C E, GRABAU E A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1598 - 1608.
- [22] TYE A J, SIU F K, LEUNG T Y, et al. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 190 - 197.
- [23] 姚斌, 袁铁铮, 王元火, 等. 来源于 *Bacillus subtilis* 的中性植酸酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 11 - 15.
- [24] YIP W, WANG L, CHENG C, et al. The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310: 1148 - 1154.
- [25] 彭远义, 马丽苹, 李春明, 等. 植酸酶高产菌株的筛选及其基因分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(1): 108 - 113.
- [26] SCHENK G, GUDDAT L W, GE Y, et al. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants [J]. *Gene*, 2000, 250: 117 - 125.
- [27] 王红宁, 吴琦, 赵海霞, 等. 芽孢杆菌植酸酶基因在毕赤酵母中的分泌表达 [J]. *浙江大学学报*, 2005, 31(5): 621 - 627.

=====

(上接第 710 页)

- [8] 杨守仁, 张龙步, 陈温福, 等. 水稻超高产育种的理论和方法初论 [J]. *沈阳农业大学学报*, 1996, 27(1): 1 - 7.
- [9] 周开达, 马玉清, 刘太清, 等. 杂交水稻亚种间重穗型组合选育—杂交水稻超高产育种的理论与实践 [J]. *四川农业大学学报*, 1995, 13(4): 403 - 407.
- [10] 肖应辉, 余铁桥, 唐湘如. 大穗型水稻单株产量构成研究 [J]. *湖南农业大学学报*, 1998, 24(6): 428 - 431.
- [11] 梁世胡, 李传国, 伍应运, 等. 杂交水稻产量构成因素的通径分析 [J]. *广东农业科学*, 1999, (6): 4 - 6.
- [12] 彭俊华, 李有春, 水稻籼. 粳两亚种产量构成特点的剖析 [J]. *四川农业大学学报*, 1990, 8(3): 162 - 168.
- [13] 刘建丰, 袁隆平. 超高产杂交稻产量性状研究 [J]. *湖南农业大学学报*, 2002, 28(6): 453 - 456.
- [14] 袁平荣, 孙传清, 杨从党, 等. 云南籼稻每公顷 15 吨高产的产量及其结构分析 [J]. *作物学报*, 2000, 26(2): 756 - 762.