

融合疏水蛋白在银耳中的异源表达

陈少敏, 朱涵予, 刘冬梅, 许丹云, 马爱民*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘要:为改善疏水蛋白的性质, 充分利用疏水蛋白和银耳的可食性优势, 将平菇疏水蛋白基因 *hyd* 与去除终止密码子的 *hyd* 拼接, 形成融合疏水蛋白 H-H, 并构建其表达载体 pEGH-H-H。通过电击法将 pEGH-H-H 导入到根癌农杆菌 EHA105 中, 并转化到银耳芽孢。转化子经潮霉素抗性筛选, PCR 检测后, 随机挑取 10 个转化子进行 Southern blot, 筛选获得高拷贝且能稳定遗传的转化子。实时荧光定量 PCR 分析显示 5 号转化子的疏水蛋白相对表达量是野生型的 11.4 倍。最后提取 5 号转化子中的融合疏水蛋白, 经 SDS-PAGE 检测, 证明融合疏水蛋白在银耳中成功异源表达。起泡性和乳化性实验表明, 转化子融合疏水蛋白较平菇疏水蛋白有一定的提升。

关键词:融合疏水蛋白, 根癌农杆菌介导转化, 银耳, 起泡性, 乳化性

Heterologous Expression of Fusion Hydrophobin in *Tremella fuciformis*

CHEN Shao-min, ZHU Han-yu, LIU Dong-mei, XU Dan-yun, MA Ai-min*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to improve the properties of hydrophobin, and to expand the potential application of hydrophobin and the edibility of *Tremella fuciformis*, the *Pleurotus ostreatus* hydrophobin gene (*hyd*) was ligated with *hyd* without the termination codon, which was the fusion hydrophobin, named H-H, and then the expression vector pEGH-H-H was constructed. The vector was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 by electroporation, and then transformed to the yeast-like cells of *T. fuciformis*. After hygromycin selection and PCR detection, 10 transformants were randomly selected and analyzed by Southern blot to screen multi-copy and stable genetic transformants. The quantitative real-time PCR analyzed showed that the relative expression level of transformant No.5 was 11.40-fold higher than that of the wild. Finally, we extracted the fusion hydrophobin from the transformant No.5, which proved the fusion hydrophobin can be expressed in the *T. fuciformis* successfully. The properties of foamability and emulsibility showed that fusion hydrophobin was better than *P. ostreatus* hydrophobin.

Key words: fusion hydrophobin; *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation; *Tremella fuciformis*; foamability; emulsibility

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)14-0115-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.021

引文格式: 陈少敏, 朱涵予, 刘冬梅, 等. 融合疏水蛋白在银耳中的异源表达[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 115-119.

疏水蛋白 (Hydrophobins) 是目前已知的一类表面活性极强的小分子量两性蛋白, 约含有 100 个氨基酸, 分子量约为 10 kDa, 广泛存在于各种丝状真菌中。根据氨基酸排列方式和性质的不同, 疏水蛋白分为 I 型和 II 型两种^[1]。I 型疏水蛋白自我装配形成的蛋白膜具有高度的不溶解性, 即使在 100 °C 水浴时也难溶解于 2% SDS, 只有在强酸如甲酸和三氟乙酸中才可以被解离^[2-3]。疏水蛋白一个非常重要的特性就是当它们遇到亲水-疏水界面时就会发生自组装, 形成一层两亲性的薄膜, 厚度约为 10 nm, 性质十分稳定, 且能改变界面的亲水性和疏水性^[4-5]。因此, 疏水蛋白在食品、医学、工业等领域具有强大的应用前景, 如疏水蛋白的乳化性可以作为许多食

品的稳定剂、疏水性可用于食品的保鲜^[6-7]以及用作生物材料^[8-9]、疏水蛋白 SC3 在小鼠模型也表现出较强的抗肿瘤作用^[10]。

银耳 (*Tremella fuciformis*), 又称白木耳、雪耳等, 在分类学上隶属于真菌门, 担子菌纲, 异隔担子菌亚纲, 银耳目, 银耳科, 银耳属^[11]。银耳被誉为“菌中之冠”, 是一种珍贵的食用药用两用菌。银耳能产生酵母状的单核体芽孢, 是一种良好的生物反应器^[12-13]。

本实验室前期从平菇菌丝中克隆到 I 型疏水蛋白基因 *Po.hyd*^[14], 并在银耳芽孢中成功实现了异源表达^[15]。为进一步改善疏水蛋白的性质, 充分利用疏水蛋白的潜在应用和银耳的可食性优势, 本实验试图用分子生物学的方法对疏水蛋白进行改造, 将

收稿日期: 2017-10-08

作者简介: 陈少敏 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: chenshaomin18@qq.com。

* 通讯作者: 马爱民 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: aiminma@mail.hazu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金 (31572182, 30972072)。

表1 所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	说明
H ₁ -F	CG GGATCCATGTTCTCCAAGG	完整 <i>hyd</i> 基因
H ₁ -R	TTCGAATTAAAGACTGACGTTGGTGC	
H ₂ -F	C GAGCTCACGCGTATGTTCTCC	去密码子 TAA 的 <i>hyd</i> 基因
H ₂ -R	CG GGATCCAAGACTGACGTTGG	
EH-F	GCAGAAGAACGGCATCAAGGTG	潮霉素-绿色荧光蛋白
EH-R	CAGGCTCTCGCTAAACTCCCC	
β -tub-F	GATGACCATTCTTGCTTC	内参基因 qRT-PCR 检测
β -tub-R	GTTCTGACATTTGCTACCG	
Real-F	CCAGCCAACCACCAATCA	<i>hyd</i> 基因 qRT-PCR 检测
Real-R	CCGAAGGCAACAAGACCATT	

注:下划线部分表示酶切位点。

平菇疏水蛋白基因 *hyd* 与去除终止密码子的 *hyd* 拼接,形成融合疏水蛋白 H-H,并导入到银耳芽孢中表达,希望改善疏水蛋白的性质,同时也为其他蛋白质的改性研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

银耳芽孢 32Y、平菇菌丝 P739、根癌农杆菌 EHA105 本实验室保存;质粒 pEGH 由本实验室朱涵予改造 pCAMBIA1302 质粒并保存^[16];大肠杆菌 DH5 α 、pMD18-T 克隆载体、限制性内切酶 *Sac* I、*Mlu* I、*Bam*H I、*Asu* II、*Xho* I 大连 TaKaRa;T4 DNA Ligase 美国 Promega;凝胶纯化试剂盒、回收试剂盒和质粒提取试剂盒 美国 Axygen;Southern 杂交试剂盒 美国 GE;PDA 培养基、LB 培养基;YEB 培养基、IM 培养基、Co-CM 培养基、三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) Sigma 公司;低分子量蛋白标准 TaKaRa 公司;其他试剂 均为分析纯。

PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司;冷冻干燥机 德国 Christ 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 PDA 培养基:称取 46 g PDA 粉末,用蒸馏水定容至 1 L,添加 1.5% 琼脂粉,121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 30 min。

YEB 培养基:蛋白胨 5 g/L,酵母提取物 1 g/L,营养肉汤 5 g/L,蔗糖 5 g/L,七水硫酸镁 0.5 g/L,NaOH 调节 pH 至 7.2,用蒸馏水定容至 1 L,添加 1.5% 琼脂粉,121 $^{\circ}$ C,30 min 高温高压灭菌。

MM 培养基:葡萄糖 20 g,硫酸铵 1.32 g(含 N 20 mmol/L),MgSO₄·7H₂O 0.25 g,KH₂PO₄·3H₂O 0.5 g,VB1 0.2 mg,ZnSO₄·7H₂O 2 mg,CaCl₂·2H₂O 0.5 g,钼酸铵 0.02 mg,补足 ddH₂O 定容至 1 L,121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 20 min。

IM 培养基:20 $\times$ 磷酸缓冲溶液 5 mL,20 $\times$ 盐溶液 5 mL,50% 甘油 1 mL,1 mol/L 葡萄糖溶液 1 mL,1 mol/L MES 溶液 4 mL,200 mmol/L AS 溶液 0.1 mL,补足 ddH₂O 定容至 100 mL。

Co-CM 培养基:20 $\times$ 磷酸缓冲溶液 5 mL,20 $\times$ 盐溶液 5 mL,50% 甘油 1 mL,1 mol/L 葡萄糖溶液

0.5 mL,1 mol/L MES 溶液 4 mL,200 mmol/L AS 溶液 0.1 mL,补足 ddH₂O 定容至 100 mL。

1.2.2 基因的克隆及载体的构建 根据 NCBI 上发表的 *Po.hyd*(GenBank 登录号为 No.AF331452.1),利用软件 Primer 5.0 进行引物设计,如表 1 所示。

收集 PDA 平板上 P739 平菇菌丝并提取总 RNA。以提取的 RNA 为模板,用 Anchored Oligo (dT)18 体系反转录 RNA 得到 cDNA(具体操作步骤参照 TransScript[®] One-Stepg DNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 说明书)。以 cDNA 为模板,H₁-F/R 和 H₂-F/R 引物,分别扩增平菇疏水蛋白基因 *hyd* 与去除终止密码子的 *hyd*。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环数为 34 个,72 $^{\circ}$ C 7 min。分别用 *Bam*H I、*Asu* II 和 *Mlu* I、*Bam*H I 双酶切 PCR 纯化产物,并用 *Mlu* I、*Asu* II 双酶切 pGEH 质粒,胶回收双酶切的产物,并通过酶连反应构建 H-H 的表达载体 pEGH-H-H。将 pEGH-H-H 转化 DH5 α 大肠感受态,用 H₁-F/R 引物进行菌落 PCR 验证,并对菌落质粒进行 *Mlu* I、*Asu* II 双酶切验证。pEGH-H-H 载体图如图 1 所示。提取阳性转化子的质粒,将其电击转化 *A.tumefaciens* EHA105,用 H₁-F/R 引物进行菌落 PCR 检测。

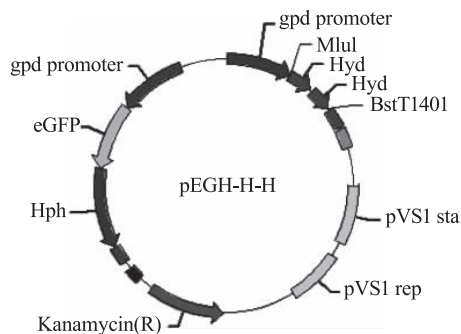


图1 pEGH-H-H 载体图

Fig.1 pEGH-H-H vector

1.2.3 转化子的筛选及鉴定 通过根癌农杆菌介导转化方法将 pEGH-H-H 载体质粒导入到银耳的基因组中^[17]。将含有 pEGH-H-H 的根癌农杆菌接种到含 50 μ g/mL 卡那和 50 μ g/mL 利福平的 YEB,

28 ℃ 150 r/min 振荡培养 24 h, 吸取 120 μ L 菌液, 接种到 12 mL 上述液体培养基中, 28 ℃ 150 r/min 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8, 4 ℃ 5000 r/min 离心 10 min, 弃滤液, 用新鲜配制的含有 200 μ mol/L AS 的 IM 培养基重悬菌体至 OD₆₀₀ 值约为 0.1~0.15, 于 28 ℃ 150 r/min 振荡培养诱导根癌农杆菌毒性, 直至菌悬液 OD₆₀₀ 值为 0.6。将银耳芽孢接种于液体 MM 培养基中 7 d, 用 IM 培养基调节孢子浓度为 10⁶ 个/mL。将已诱导根瘤农杆菌菌悬液与银耳芽孢悬液混合后, 涂布于铺有无菌滤膜的共培养培养基中, 25 ℃ 培养 3 d, 将滤膜转接到含有 50 μ g/mL 潮霉素和 200 μ g/mL 头孢平板上筛选转化子, 连续筛选 3 代。将所获得的转化子于无抗 PDA 培养基中, 25 ℃ 培养 7 d, 提取 DNA, 并用 H₁-F/R 和 EH-F/R 检测。

扩大培养拟转化子, 提取其基因组 DNA 经 Xho I 酶切过夜, 以 *hyd* 基因作为杂交探针进行 Southern blot 检测^[18]。并提取阳性转化子和野生型银耳 32Y 的 mRNA 交由武汉巴菲尔生物技术有限公司进行实时荧光定量 PCR 分析, 检测引物如表 1 所示。

1.2.4 目标蛋白的提取 按照马爱民等^[19]报道的方法提取目标蛋白。将拟转化子接种于 PDA 培养基中, 25 ℃ 培养 20 d 后冷冻干燥, 并以野生型平菇 P739 菌丝作为对照组, 按照料液比 1:10 (m/v) 溶解于抽提液 I (2% SDS, 0.05 mol/L Tris pH6.8) 中, 100 ℃ 保持 10 min, 4000 r/min 离心 15 min。所得沉淀溶解于抽提液 II (氯仿: 甲醇 = 2:1), 65 ℃ 保持 10 min, 并过滤收集沉淀。向沉淀中加入三氟乙酸溶解, 置于冰上放置 6 h。所得的样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 并采用硝酸银染色检测^[20]。

1.2.5 疏水蛋白的起泡性和乳化性分析 将银耳芽孢转化子 5 号以及平菇 P739 的疏水蛋白配制成分终浓度为 50 μ g/mL 的样品, 分别取 600 μ L 蛋白溶液, 用振荡混匀仪处理 30 s, 并在 1、3 h 和 7 d 后取样进行起泡性和乳化性分析^[21]。

1.3 数据处理

每组实验做平行实验三次, 数值取平均值表示。数据采用 Oligo 8.0 软件处理。

2 结果分析

2.1 基因的克隆与序列分析

平菇菌丝总 RNA 的电泳胶图如图 2A 所示, 条带亮度比表明 RNA 比较完整, 符合要求。疏水蛋白 cDNA 序列扩增结果如图 2B 所示, 条带大小符合预期且无杂带, 结合测序结果表明成功扩增平菇疏水蛋白的两个片段。

2.2 表达载体 pEGH-H-H 的构建

将双酶切产物和 pEGH 进行连接, 转化, 用 H₂-F/R 进行菌落 PCR 检测, 如图 3A 所示, 在 330 bp 和 660 bp 的位置都有带, 分别为单一的疏水蛋白基因和融合疏水蛋白基因, 与预期相符。对 pEGH-H-H 进行 *Mlu* I、*Asu* II 双酶切, 如图 3B 所示, 在大约 660 bp 处有一条明显的带, 结果表明, pEGH-H-H 载

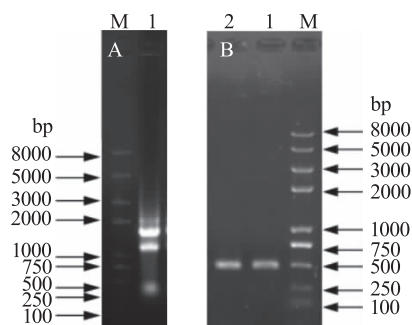


图2 平菇总 RNA 与 PCR 扩增产物

Fig.2 Total RNA of *P.ostreatus* and PCR products

注: A: 平菇菌丝总 RNA; B: 平菇疏水蛋白基因两个片段

PCR 结果, 其中 1 泳道为去除 TAA 的 *hyd* 基因,

2 泳道为完整的 *hyd* 基因; M: Trans 2K DNA marker。

体构建成功。

提取 pEGH-H-H 质粒, 并电转化到根癌农杆菌 EHA105, H₂-F/R 引物进行菌落 PCR 检测, 如图 3C 所示, 在 330 bp 和 660 bp 的位置分别有条带, 说明 pEGH-H-H 质粒成功导入根癌农杆菌 EHA105 中。

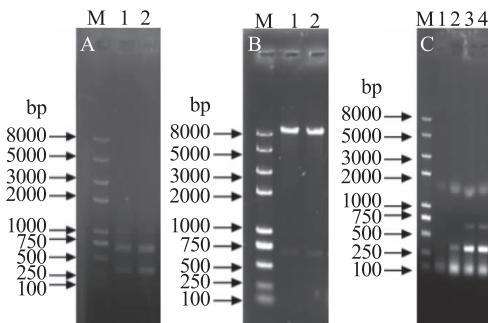


图3 菌落 PCR 与 pEGH-H-H 质粒双酶切验证结果

Fig.3 Colony PCR and digestion of pEGH-H-H plasmid

注: M: Trans 2K DNA marker; A: 泳道 1、2 为随机挑取含 pEGH-H-H 质粒的大肠杆菌单菌落 PCR 结果; B: 泳道 1、2 为随机挑取 2 个含 pEGH-H-H 大肠杆菌的质粒双酶切结果; C: 泳道 1~4 为随机挑取 4 个含 pEGH-H-H 质粒的根瘤农杆菌菌落 PCR 结果。

2.3 转化子的 PCR 筛选及验证

通过根癌农杆菌介导转化将 pEGH-H-H 载体质粒导入到银耳的基因组中。在潮霉素平板上随机挑芽孢转化子, 以拟转化子的 DNA 作模板, 分别用 EH-F/R 和 H₂-F/R 引物进行 PCR 检测, 结果如图 4 所示。其中 EH-F/R 引物扩增的带大小约为 550 bp, H₂-F/R 在 330 bp, 660 bp 左右都有带, 结果与预期相符, 表明融合疏水蛋白成功导入到银耳芽孢中。

2.4 转化子 Southern blot 分析

选取 10 个转化子作 Southern blot 分析, 结果如图 5 所示。5 号芽孢为三拷贝, 8 号为双拷贝转化子, 而 1、2、10 号为单拷贝转化子, 3、4、6、7、9 号转化子未获得杂交信号, 可能为假阳性, 也有可能是在第 3~5 代传代接种的过程中, 部分转化子多次传代后出现了抗性基因丢失, 有研究表明内源强启动子有助于维持转化子遗传性状的稳定表达^[22]。

表 2 起泡性和泡沫稳定性
Table 2 Foamability and foam stability

样品	液面总高度 (mm)	起始泡沫高度 (mm)	1 h 泡沫高度 (mm)	3 h 泡沫高度 (mm)	7 h 泡沫高度 (mm)	起泡性	1 h 泡沫 稳定性	7 h 泡沫 稳定性
P739	15	7	5	5	3	46.7	71.4	42.8
5 号	15	13	12	11	7	86.7	92.3	53.9

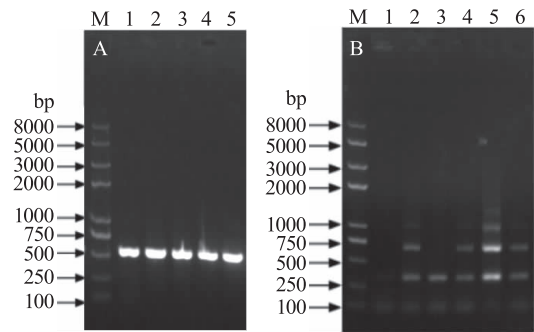


图 4 转化子 PCR 验证结果

Fig.4 Transformant verification by colony PCR

注:A:EH-F/R 引物 PCR 扩增结果,其中泳道 1~5 为转化子;B:H2-F/R 引物 PCR 扩增结果,其中泳道 1 为野生型 32Y,泳道 2~6 为拟转化子;M:Trans 2K DNA marker。

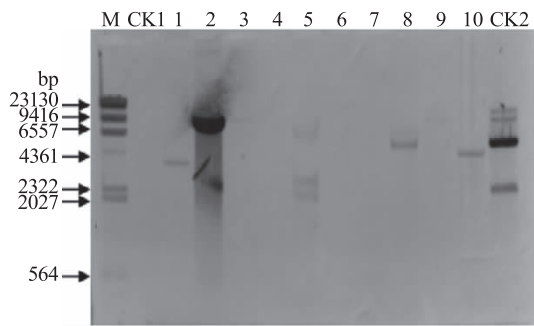


图 5 转化子 Southern 杂交结果

Fig.5 Southern blot analysis of transformants

注:M:λ DNA/HindⅢ marker,CK1 为阴性对照 32Y 芽孢,CK2 为阳性对照载体质粒,1~10 分别 1~10 号转化子。

2.5 转化子 real-time PCR 分析

选取 32Y 野生型芽孢和 1、5、8、10 号转化子芽孢进行 Real-time PCR 分析,结果如图 6 所示。其中 1、8、5 号均有表达,8 号和 5 号表达量较高,分别为野生型对照组的 5.071 倍、11.406 倍,结果与 Southern blot 分析结果一致,而 1 号可能为假阳性转化子或单拷贝。

2.6 目标蛋白的提取及电泳检测

选取 5 号转化子扩大培养,以 P739 平菇菌丝为对照组,利用三氯乙酸法提取目标蛋白,SDS-PAGE 检测,如图 7 所示。从图中能明显看出 5 号转化子能提取出目标蛋白(箭头所指),此蛋白的大小与野生型平菇菌丝中的疏水蛋白有明显差异,约为 P739 平菇菌丝疏水蛋白的二聚体大小类似,表明平菇融合蛋白在银耳芽孢中成功表达。

2.7 起泡性和乳化性分析

使用振荡混匀仪处理终浓度为 50 μg/mL 的平

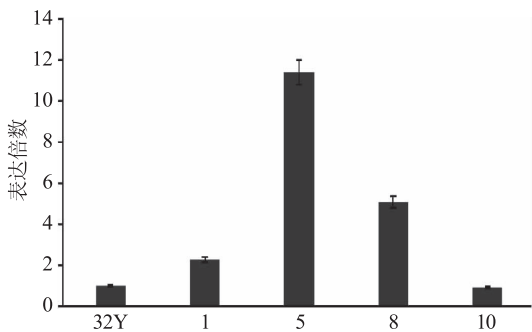


图 6 野生型及转化子的实时定量检测结果

Fig.6 Real-time PCR of

the wild-type and transformants

注:32Y 为野生型银耳芽孢;1、5、8、10 为转化子。

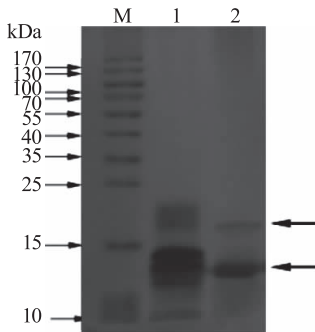


图 7 纯化融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.7 SDS-PAGE result of the purified fusion protein

注:M 为蛋白质分子量 marker;泳道 1 为平菇 P739 菌丝;泳道 2 为 5 号转化子。

菇 P739 疏水蛋白溶液和银耳芽孢 5 号转化子的融合疏水蛋白溶液,如表 2 所示,5 号转化子的蛋白溶液泡沫明显高于平菇 P739 的蛋白溶液泡沫,且在一周后泡沫仍然保持一定高度。从表 3 可知,5 号转化子蛋白溶液的乳化指数(EAI)和乳化稳定性(ESI)均高于 SDS。由此可见,5 号转化子疏水蛋白溶液的性质比平菇的疏水蛋白溶液有一定程度的提升。

表 3 乳化性及乳化稳定性

Table 3 Emulsibility and emulsion stability

样品	吸光值 A	吸光值 A1	乳化指数 EAI	乳化稳定性 ESI
水	0.000	0.000		
SDS	0.053	0.041	5.3	11.6
P739	0.264	0.224	26.4	12.7
5 号	0.422	0.401	42.2	14.3

3 结论

本研究通过双酶切酶连方法,构建融合疏水蛋白基因 H-H,并利用根癌农杆菌介导转化方法将其

成功导入到银耳芽孢中。Southern 杂交验证发现,转化子中存在单拷贝、双拷贝和多拷贝等不同的插入情况。实时荧光定量 PCR 显示,高拷贝转化子中的疏水蛋白相对含量要比单拷贝高,该结果与 Southern 杂交结果一致。

5 号转化子疏水蛋白的相对表达量最高,为野生型的 11.4 倍。蛋白溶液起泡性和乳化性比较发现,5 号转化子融合疏水蛋白的性质稍优于平菇疏水蛋白,其原因可能与融合疏水蛋白中二硫键的数量较平菇疏水蛋白提高有关。

参考文献

- [1] Wessels J G. Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1997, 38: 1-45.
- [2] Lugones L G, Wösten H A B, Birkenkamp K U, et al. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus* [J]. *Mycological Research*, 1999, 103(5): 735-640.
- [3] Linder M B. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces [J]. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2009, 14(5): 356-363.
- [4] 丁靖志, 于雷, 王洪辉, 等. 真菌疏水蛋白的结构和功用 [J]. *生物学杂志*, 2004, 21(5): 8-11.
- [5] 林福呈. 真菌疏水蛋白的研究进展 [J]. *微生物学报*, 2001, 41(4): 518-521.
- [6] Burke J, Cox A, Petkov J, et al. Interfacial rheology and stability of air bubbles stabilized by mixtures of hydrophobin and β -casein [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 34(1): 119-127.
- [7] Green A J, Littlejohn K A, Hooley P, et al. Formation and stability of food foams and aerated emulsions: Hydrophobins as novel functional ingredients [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013, 18(4): 292-301.
- [8] Wösten H A, Scholtmeijer K. Applications of hydrophobins: Current state and perspectives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1587-1597.
- [9] Hektor H J, Scholtmeijer K. Hydrophobins: proteins with potential [J]. *Biotechnology*, 2005, 16: 434-439.
- [10] Akanbi M H, Post E, van Putten S M, et al. The antitumor

(上接第 114 页)

- [16] Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, et al. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain [J]. *Microbiological Research*, 2015, 170: 36-50.
- [17] Zheng G, Slavik M F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain [J]. *Letters in Applied Microbiology* 1999, 28(5): 363-367.
- [18] Alam S I, Kamran M, Sohail M, et al. Partial characterization of bacteriocin like inhibitory substance from *Bacillus Subtilis* BS15, a local soil isolate [J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2011, 43(4): 2195-2199.
- [19] Yusra Y, Azima F, Novelina N, et al. Characterization of antimicrobial bacteriocin produced by *bacillus cereus* ss28 isolates

- activity of hydrophobin SC3, a fungal protein [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(10): 4385-4392.
- [11] 黄年来. 中国银耳生产 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [12] Shin D I, Song K S, Park H S. Oral vaccination of mice with *Tremella fuciformis* yeast-like conidium cells expressing HBsAg [J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(3): 539-544.
- [13] Kang Linzhi, Li Qiongjie, Lin Junfang, et al. Biosynthesis of resveratrol in blastospore of the macrofungus *Tremella fuciformis* [J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(7): 675-684.
- [14] Ma Aimin, Shan Linjun, Wang Nianjiu, et al. Characterization of a *Pleurotus ostreatus* fruiting body-specific hydrophobin gene, *Po.hyd* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47(4): 317-324.
- [15] Zhu Hanyu, Liu Dongmei, Wang Yuanyuan, et al. Use of the yeast-like cells of *Tremella fuciformis* as a cell factory to produce a *Pleurotus ostreatus* hydrophobin [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(8): 1167-1173.
- [16] KEMPPAINEN M J, PARDO A G. pHg/pSILBA γ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: Optimization of ihpRNA-triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(2): 178-200.
- [17] 刘媛媛, 马爱民. 平菇疏水蛋白 *Po.hyd* 基因 RNAi 载体构建及转化 [J]. *食品科学*, 2016, 37(11): 84-89.
- [18] Wösten H A. Hydrophobins: Multipurpose protein [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(55): 625-646.
- [19] 马爱民, 单麟军, 杜昭平, 等. 糙皮侧耳(平菇)疏水蛋白的分离纯化及其界面自组装特性研究 [J]. *菌物学报*, 2007, 26(4): 557-564.
- [20] 刘洋, 朱涵予, 许丹云, 等. 银耳芽孢总蛋白提取方法的建立 [J]. *食品科学*, 2016, 37(9): 35-39.
- [21] 沈心好, 许时婴, 王璋. 番茄籽蛋白的功能和结构 [J]. *食品科学*, 2005, 26(11): 42-46.
- [22] Ding Yi, Liang Sheng, Lei Jinghang, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated fused *egfp-hph* gene expression under the control of *gpd* promoter in *Pleurotus ostreatus* [J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(4): 314-322.

- from budu, a traditionally fermented fish product of west sumatera [J]. *Microbiol Indones*, 2014, 8(1): 24-32.
- [20] Senbagam D, Gurusamy R, Senthilkumar B. Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02 [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013, 6(12): 934-941.
- [21] Khalil R, Fatima D, Yasser E, et al. The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain [J]. *African Journal of Food Science*, 2009, 3(1): 11-22.
- [22] Naclerio G, Ricca E, Sacco M, et al. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4313-4316.