

β -1,4-葡聚糖内切酶 *egl3* 基因在乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363) 中分泌表达的研究

刘秦华, 邵涛, 董志浩, 李湘玉

(南京农业大学饲草调制加工与贮藏研究所, 南京 210095)

摘要: 采用重叠延伸 PCR 合成技术将乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 分泌蛋白基因序列 *usp45* (81 bp) 和瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) β -1,4-葡聚糖内切酶成熟蛋白基因序列 *egl3* (657 bp) 连接成融合基因 *usp45-egl3*, 构建分泌型重组质粒 pMG36e-*usp45-egl3* 及重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*, 分析重组乳酸乳球菌表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果及其降解滤纸和小麦秸秆的能力。结果表明, 重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 经 28 h 培养能胞外分泌酶活为 $1\ 016\ \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -1,4-葡聚糖内切酶, 可有效地降解羧甲基纤维素钠。在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 10 d 时, 重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 降解滤纸和小麦秸秆为其提供发酵底物, 分别产生乳酸 $2.55\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.95\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值分别降至 5.10 和 4.84, 干物质降解率分别为 4.22% 和 29.36%。

关键词: 草原学; β -1,4-葡聚糖内切酶; *egl3* 基因; 乳酸乳球菌; 分泌表达

中图分类号: S812.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2017)15-1729-09

Research of secreting expression of β -1,4-endoglucanase *egl3* gene in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363

LIU Qinhu, SHAO Tao, DONG Zhihao, LI Xiangyu

(Institute of Ensiling and Processing of Grass, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study constructed a secretive recombinant plasmid pMG36e-*usp45-egl3* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* with a fusion gene *usp45-egl3* connected by the secreted protein gene sequence of *usp45* (81 bp) from *L. lactis* and the coded mature-protein gene sequence of *egl3* (657 bp) from *Trichoderma reesei* by the method of overlapping extension PCR. The expressive effect of recombinant *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 was analyzed, and the degradation capabilities of secreted β -1,4-endoglucanase on fiber and wheat straw were evaluated. The results show that the recombinant *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* can secrete β -1,4-endoglucanase with activity of $1\ 016\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ after culturing 28 h and degrading sodium carboxy methylcellulose effectively. After culturing at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 days, recombinant *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* degrades paper and wheat straw to provide fermentation matrix, which produce $2.55\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.95\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ lactic acid and decrease pH values to 5.10 and 4.84, respectively. Dry matter degradation of paper and wheat straw are 4.22% and 29.36%, respectively.

Key words: range science; β -1,4-endoglucanase; *egl3* gene; *Lactococcus lactis*; secreting expression

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130097120053)

作者简介: 刘秦华 (1983—), 男, 副教授, 主要研究方向: 饲草调制加工与利用, 乳酸菌资源的开发、基因改造与利用

通信联系人: 邵涛, 教授, 主要研究方向: 饲草调制加工与利用. E-mail: taoshaolan@163.com

0 引言

瑞氏木霉是高效产纤维素酶的真菌^[1],其产生的纤维素酶具有酶系完全、活性高、胞外分泌、便于分离和提纯等优点,被广泛应用于食品、医药、饲料和化工原料等领域^[2]。根据催化反应功能的不同,纤维素酶可分为内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡聚糖苷酶。内切葡聚糖酶中的 β -1,4-葡聚糖内切酶,可在纤维素长链内部随机切割 β -1,4-葡聚糖苷键^[3],使纤维素结构松散,同时又能水解产生一定量的纤维二糖和葡萄糖^[4~5]。编码瑞氏木霉分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶的基因有*egl1*、*egl2*、*egl3*、*egl4*和*egl5*^[4],其中对*egl1*、*egl2*和*egl3*的研究较多^[5~9]。目前,我国尚未构建出 β -1,4-葡聚糖内切酶基因工程乳酸乳球菌。

pMG36e是目前应用较多的一个组成型表达载体,由启动子p32及其下游的部分开放阅读框、多克隆位点和来自乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2)蛋白酶基因(*prtP*)的转录终止子及pWV01复制子以及来自于质粒pE194的红霉素抗性基因*Emr*构成表达载体,其质粒大小为3.6 kb,能够在乳酸乳球菌(*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363)的胞内表达^[9~10]。与胞内表达相比,分泌型表达使目的蛋白更易纯化和提取,因而深受重视^[4]。乳酸乳球菌的信号肽基因*usp45*部分序列使其具有蛋白分泌功能^[11~12]。有文献报道将另一基因与目的基因进行融合表达的方法有益于目的基因的正确表达^[13~14]。因此,将*usp45*部分序列与瑞氏木霉*egl3*基因编码的成熟蛋白序列进行融合,并采用质粒pMG36e,有助于构建出能分泌活性 β -1,4-葡聚糖内切酶的基因工程乳酸乳球菌,但至今尚未发现有类似的报道。

本研究旨在构建分泌型重组质粒pMG36e-*usp45-egl3*,获取重组乳酸乳球菌*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*,并检测其分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的表达效果和降解滤纸、小麦秸秆的效果,为 β -1,4-葡聚糖内切酶基因工程乳酸菌在废弃物利用产业和乳酸工业上的应用提供乳酸菌资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

乳酸乳球菌(*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363)来源于南京农业大学饲草调制加工与利用实验室;表达型质粒载体pMG36e购于上海瑞楚生物科技公司。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶*Sma* I和*Xba* I、T4 DNA连接酶、PCR试剂、蛋白Marker均购于TaKaRa公司;DNA Marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于Omega公司;引物由上海英潍捷基生物科技有限公司合成;PBS缓冲液、SDS-PAGE浓缩胶(浓度5%)和分离胶(浓度12%)的制备参考TaKaRa商品目录进行(S-1);其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基与培养条件

乳酸乳球菌的培养基采用M17培养基(北京奥博星);GM17培养基:在M17培养基中加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖;抗生素的使用浓度:红霉素 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 *usp45-egl3* 融合基因的合成

根据GenBank乳酸乳球菌*usp45*基因(基因收录号:M60178)编码信号肽的序列和瑞氏木霉*egl3*

基因(基因收录号: AB003694)中编码成熟蛋白的序列,委托上海捷瑞生物工程有限公司采用重叠延伸 PCR 合成技术合成上游带有 *Sma* I 酶切位点、下游带有 *Xba* I 酶切位点的 *usp45-egl3* 融合基因。

1.2.2 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 感受态细胞的制备

L. lactis subsp. *lactis* MG1363 感受态细胞的获取:接种一个单菌落于 5 mL GM17 培养基中,30℃ 恒温培养箱培养过夜;将 1 mL 培养物加入到 100 mL 含 2%甘氨酸的 GM17 培养基中,30℃ 恒温培养至 $OD_{600}=0.5$;于 4℃、10 000g 离心 15 min 收集菌体;用 1/10 体积冰冷的等渗缓冲液(0.5 mol·L⁻¹蔗糖、10%甘油)洗涤菌体 2 次,4℃、10 000g 离心 5 min;用 1/100 体积的同一等渗缓冲液重悬细菌,以 100 μ L 分装于 EP 管中,贮存于-80℃ 备用。

1.2.3 分泌型表达质粒的构建

将测序正确的 *usp45-egl3* 片段和 pMG36e 质粒进行 *Sma* I 和 *Xba* I 酶切。用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 *usp45-egl3* 和 pMG36e 质粒过夜连接。将连接产物电转化至 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 感受态细胞中。转化条件:仪器,艾本德电转化仪;电压,2 150 V,电转时间,4.8 ms。涂于含有 5 mg·L⁻¹红霉素的 GM17 固体培养基进行筛选。挑取单菌落,经菌体 PCR(上游引物:GCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTAGTTGATAGA;下游引物:CGTTTCAGCAGAAAAATTCGTAATTCGAGCTC。PCR 程序为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,59℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 保持 10 min)、*Xba* I 单酶切,*Sma* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定后将阳性克隆子送至上海英潍捷基生物科技有限公司测序,并与参比基因(基因收录号: M60178, AB003694)进行序列比对,分析相似性。阳性转化子经菌体 PCR 扩增、提取质粒进行双酶切鉴定,获得阳性菌株 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*。

1.2.4 重组乳酸乳球菌表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果

采用刚果红染色法和羧甲基纤维素钠糖化力法^[15],评价重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果。过夜培养重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e、*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3* 和 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 后,分别接种上述菌液 1 μ L 到含有 0.5%羧甲基纤维素钠的 GM17 固体培养基中培养 36 h。将平板上的菌落冲洗后,加入 0.1%刚果红溶液覆盖平板表面,室温下染色 20 min 后倒掉刚果红溶液,加入适量 1 mol·L⁻¹的 NaCl,室温下脱色反应 20 min,观察菌落周围是否有水解圈。接种 200 μ L 重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 于 100 mL 含 5 mg·L⁻¹红霉素的 GM17 液体培养基中。30℃ 培养 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 h 后,取 1 mL 菌液,8 000 r·min⁻¹,4℃ 离心 10 min,获得菌体和上清液。向菌体中加入 1 mL PBS 缓冲液,冰浴中破碎菌体,获得菌体粗酶液。以 1%羧甲基纤维素钠为底物,加入上清液或菌体粗酶液 200 μ L,在 pH=6.0 的醋酸缓冲液中 50℃ 反应 15 min,用相应煮沸失活的样品为对照,在波长为 520 nm 下测定其吸光值。 β -1,4-葡聚糖内切酶的酶活性为: β -1,4-葡聚糖内切酶每分钟水解羧甲基纤维素钠产生 1 μ mol 还原糖的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.2.5 β -1,4-葡聚糖内切酶电泳鉴定

L. lactis subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 在 GM17 液体培养基中培养 28 h 后,4℃、10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液。采用三氯乙酸法在滤液中加入 1/4 体积的 10%三氯乙酸,充分混匀,冰浴 1 h 后,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃上清,收集沉淀。用预冷的丙酮将沉淀洗涤 3 次,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,倒掉丙酮,在通风厨中挥发残余的丙酮。取适量的去离子水将沉淀或菌体重悬,加入等体积的 2 \times 上样缓冲液,混匀,于沸水中煮沸 10 min,4℃、10 000g 离心 5 min。各取 10 μ L 上清液和菌体样品液,

进行十二烷基硫酸钠 (SDS) -聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。

1.2.6 重组乳酸乳球菌降解滤纸与小麦秸秆的能力

200 μ L 的 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 和 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 分别接种于含 2% 的灭菌滤纸 (ϕ 1 mm) 和小麦秸秆 (ϕ 1 mm) 的 GM17 培养基中 (碳源为 0.5% 的葡萄糖和 0.3% 的乳糖, 滤纸和小麦秸秆) 30 $^{\circ}$ C 培养 10 d 后, 检测 pH 值、乳酸、乙酸、干物质降解率。采用 pH 计测定 pH 值, 乳酸和乙酸含量采用安捷伦高效液相色谱仪 Agilent HPLC 1260 测定。测定条件: 色谱柱, Carboximix[®] H-NP5; 检测器, 示差检测器; 流动相, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ H₂SO₄, 流速, 0.7 mL \cdot min⁻¹; 柱温箱温度, 55 $^{\circ}$ C。

1.2.7 统计方法

采用 SPSS (SPSS 13.0 for windows) 软件对重组乳酸乳球菌分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性在 $P < 0.05$ 的显著性水平下进行方差分析, 并对均值采用 Duncan 法进行多重比较。重组乳酸乳球菌降解滤纸和小麦秸秆的 pH 值, 乳酸、乙酸含量和干物质降解率在 $P < 0.05$ 的显著性水平下进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 *usp45-egl3* 融合基因中各构成基因的相似性分析

如图 1 所示, *usp45-egl3* 融合基因经测序后, 发现各构成基因与对应的参比基因 (基因收录号: M60178, AB003694) 的相似性均为 100%, 长度分别为 81 bp 和 657 bp, 无碱基突变。



图 1 克隆的 *usp45-egl3* 基因与参比基因 (基因收录号: M60178, AB003694) 的序列相似性

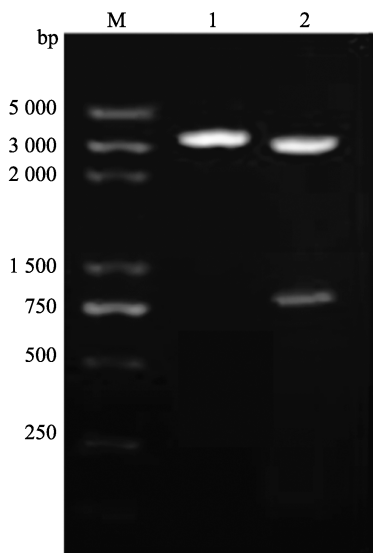
Fig. 1 Sequence similarity of cloned *usp45-egl3* gene and reference gene (GenBank accession No. M60178, AB003694)

2.2 分泌型表达质粒的构建与验证

将测序正确的片段和质粒经 *Sma* I 和 *Xba* I 酶切后连接, 转化至 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363. 经菌体 PCR 鉴定后, 提取质粒, 再用 *Xba* I 单酶切、*Sma* I 和 *Xba* I 双酶切验证, 结果如图 2 所示。*Xba* I 单酶切片段为 1 条, 约 4 200 bp, *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切片断为 2 条带。其中, 分子量较小的酶切片段大小与带酶切位点的融合基因 *usp45-egl3* 一致。pMG36e-*usp45-egl3* 表达载体经测序后表明, DNA 序列无误, 即分泌型表达载体构建成功。

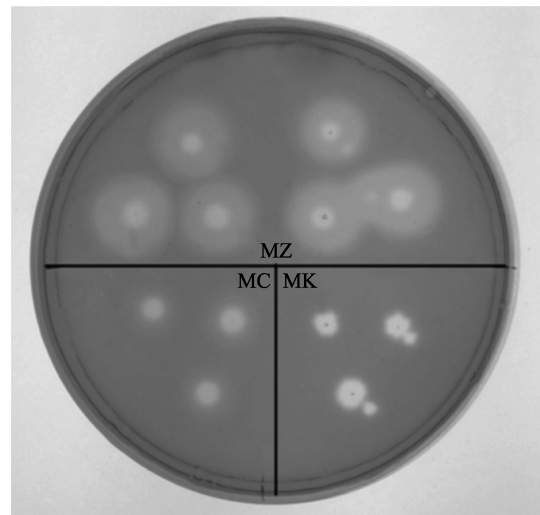
2.3 重组乳酸乳球菌产 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性分析

由图 3 可知, 重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 菌株在 0.5% 羧甲基纤维素钠 GM17 培养基上呈现清晰的水解圈, 而 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3* 和 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e 周围均未见水解圈, 说明重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3* 分泌了活性 β -1,4-葡聚糖内切酶。综上所述, 成功获得了分泌表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 菌株。如表 1 所示, 重组乳酸乳球菌 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 菌培养 28 h 后, 其产生 β -1,4-葡聚糖内切酶的活



注: M—Marker; 1—*Xba* I 酶切; 2—*Sma* I 和 *Xba* I 酶切

图 2 pMG36e-*usp45-egl3* 的酶切鉴定
Fig. 2 pMG36e-*usp45-egl3* identification by enzyme digestion



注: MZ—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*;
MC—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e; MK—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3*

图 3 重组乳酸乳球菌在羧甲基纤维素钠 M17 培养基上表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果

Fig. 3 Effect of recombinant *L. lactis* expressing β -1,4-endoglucanase on the M17 medium containing sodium carboxymethylcellulose

表 1 重组乳酸乳球菌分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性 ($U \cdot L^{-1}$)

Tab. 1 Activity of recombinant *L. lactis* secreting β -1,4-endoglucanase ($U \cdot L^{-1}$)

位置	不同培养时间/h							标准误差	P
	16	20	24	28	32	36	40		
细胞外	507 ^e	736 ^f	853 ^d	1 118 ^a	1 016 ^b	971 ^c	849 ^e	0.58	<0.001
细胞内	321 ^e	459 ^f	635 ^d	761 ^a	748 ^b	676 ^c	552 ^e	0.49	<0.001

注: 相应煮沸失活的样品为对照, 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$

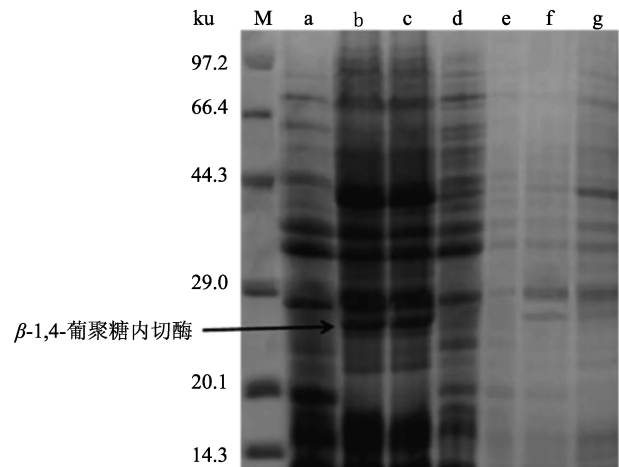
性达到最高。 β -1,4-葡聚糖内切酶分泌到细胞外的活性为 $1118 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ ，分泌到细胞内的活性为 $761 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 重组乳酸乳球菌表达产物电泳分析

对重组乳酸乳球菌 *E. coli* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 进行 SDS-PAGE 分析，重组乳酸乳球菌菌体和上清液均可见 1 条大小约为 25 ku 的蛋白条带，分子量与理论值一致，但菌体的 β -1,4-葡聚糖内切酶含量比上清液多（如图 4 所示）。

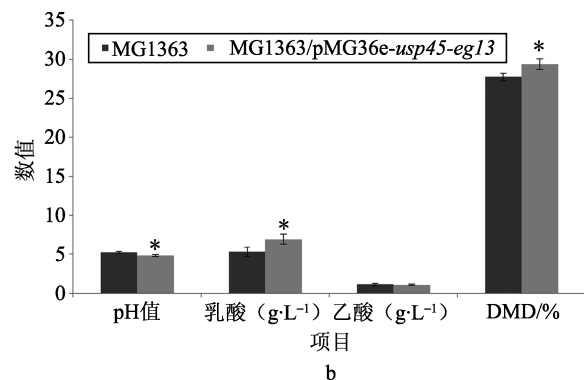
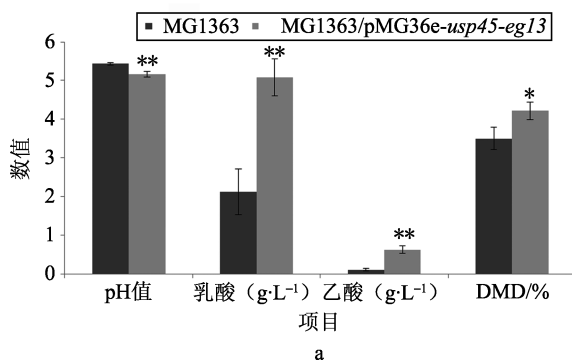
2.5 重组乳酸乳球菌降解滤纸和小麦秸秆的效果

如图 5 所示，培养 10 d 后，与乳酸乳球菌相比，重组子 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 能够降解滤纸和小麦秸秆产生较多的乳酸 ($P<0.05$)，降低了 pH 值 ($P<0.05$)，增加了干物质降解率 ($P<0.05$)。重组子 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 利用小麦秸秆产生的乳酸多于利用滤纸产生的乳酸 ($P<0.05$)。



注：M—蛋白 Marker；a—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 的胞内蛋白；b—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3* 的胞内蛋白；c—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 的胞内蛋白；d—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 的胞外蛋白；e—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*egl3* 的胞外蛋白；f, g—*L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 的胞外蛋白

图 4 重组乳酸乳球菌表达蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant *L. lactis*



注：*和**表示 MG1363 与 MG1363/pMG36e-*usp45-egl3* 的差异显著水平分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ ；DMD—干物质降解率

图 5 重组乳酸乳球菌降解滤纸 (a) 和小麦秸秆 (b) 的产酸效果

Fig. 5 Degradation and acid-production effect of degrading paper (a) and wheat straw (b) of recombinant *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*

3 讨论

β -1,4-葡聚糖内切酶是纤维素酶的重要成分，能随机切割纤维素内部使纤维素结构松散，释放一定量的水溶性碳水化合物，已被广泛应用于工业领域，如棉麻纺织品的处理、饲料添加剂和加酶洗涤剂的生产等。近年来，构建纤维素酶基因工程乳酸乳球菌成为研究热点。然而，细菌分泌表达真核生物的 β -1,4-葡聚糖内切酶基因 *egl1* 和 *egl2* 较困难，表达产物的分子结构均不正确^[7~8]，不能折叠成天然的活性蛋白，而一般聚集成不溶性的包涵体^[7]。蛋白融合表达是一种有效促进蛋白正确折叠的方法^[14]。本实验利用乳酸乳球菌表达 *egl3* 基因时，去除了其信号肽序列，并将 *usp45* 部分序列与 *egl3* 基因成熟蛋白编码

序列进行融合,表达了具有活性的 β -1,4-葡聚糖内切酶;而未融合 *usp45* 的重组乳酸乳球菌不具有降解纤维的能力,即 *usp45* 基因部分序列融合目的基因能正确引导乳酸乳球菌表达有活性的目的蛋白,这与 van ASSELDONK 等^[11]表达淀粉酶的方法一致。

pMG36e 是一个能够在多个宿主中进行复制的质粒,目前已经发现的宿主有大肠杆菌、乳酸乳球菌和部分乳杆菌^[15],已经在大肠杆菌和乳酸乳球菌中表达了溶菌酶基因和超氧化物歧化酶基因^[16~17]。pMG36e 是细胞内表达载体,在细胞外表达还需要宿主能够识别的信号肽序列^[10]。本实验采用的 *usp45* 信号肽基因部分序列来源于乳酸乳球菌,能被乳酸乳球菌识别,使连接其 C 端的蛋白跨越细胞壁^[18],避免了目的蛋白被细胞内的蛋白酶降解^[19],但有研究表明 *usp45* 的分泌效率有时不佳或蛋白停留在细胞壁上而无活性^[20],其原因可能与目的蛋白的大小和构象有关。本实验中重组乳酸乳球菌分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶到细胞外并不完全,说明表达的蛋白与信号肽可能有一定的拮抗,这与张秋香等^[21]利用 *usp45* 基因表达目的基因的结果一致。朱双杰等^[22]研究发现,超高压、保压时间等均影响纤维素酶活性,如何提高 *egl3* 在细胞外的表达和酶活性,还有待进一步研究。

目前,尚未发现 *egl3* 基因在乳酸乳球菌中表达的研究,仅有 *egl3* 基因在大肠杆菌中表达的研究。然而,大肠杆菌表达 *egl3* 基因的效果并不理想。OKADA 等^[6]发现大肠杆菌中表达 *egl3* 基因的活性约为 $25 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,且不能分泌到细胞外。NAKAZAWA 等^[9]提高了大肠杆菌表达 *egl3* 基因的活性,达到了 $760 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,但大部分蛋白仍是包涵体。王瑾等^[8]发现内切葡聚糖酶基因在乳酸乳球菌中虽有表达,但无活性。本实验直接利用 *egl3* 成熟蛋白编码区域,避开了信号肽和内含子的影响,同时融合分泌蛋白基因部分序列 *usp45*,成功实现了在乳酸乳球菌中的克隆,且将该序列酶切、连接到 pMG36e 中,转化至乳酸乳球菌并分泌表达了 β -1,4-葡聚糖内切酶,蛋白分子量约为 25 ku,在 0.5%的羧甲基纤维素钠 LB 中形成了明显的降解圈,说明成功构建了分泌型表达载体, β -1,4-葡聚糖内切酶在细胞内的最大表达活性为 $761 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,在细胞外的最大表达活性为 $1118 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与 NAKAZAWA 等^[9]的结果相比,表达活性提高了 2.47 倍。重组乳酸乳球菌良好地降解了滤纸和小麦秸秆,产生较多的乳酸、较高的干物质降解率,因此重组乳酸乳球菌在废弃物利用产业和乳酸工业上具有较大的应用前景。

4 结论

成功构建了重组乳酸乳菌株 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363/pMG36e-*usp45-egl3*,实现了 β -1,4-葡聚糖内切酶基因 *egl3* 在乳酸乳球菌中的分泌表达,分泌到细胞外的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解了羧甲基纤维素钠,细胞外分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性为 $1118 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,有效地降解了滤纸和小麦秸秆产生的乳酸,具有较大的应用潜力。

[参考文献] (References)

- [1] 伍红,农向,张琪,等. 瑞氏木霉 β -内切葡聚糖酶的纯化及其部分酶学性质研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2009, 31(3): 316-320.
WU H, NONG X, ZHANG Q, et al. Purification of β -endoglucanase in *T. reesei* QM9414 and its enzymological study[J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 2009, 31(3): 316-320. (in Chinese)
- [2] NEVALAINENA K M H, TE' O V S J. Enzyme production in industrial fungi: molecular genetics strategies for integrate strain improvement[J]. Applied Mycological Biotechnology, 2003, 3(3): 241-259.
- [3] 刘高磊,胡蝶,邬敏辰,等. 内切葡聚糖酶与木聚糖酶在毕赤酵母中的共分泌表达[J]. 食品与生物技术学报, 2015,

- 34 (3) : 253-259.
- LIU G L, HU D, WU M C, et al. Co-expression of endoglucanase and xylanase in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(3): 253-259. (in Chinese)
- [4] 卢敏, 王帅豪, 狄元冉, 等. 纤维素酶基因克隆与表达[J]. 动物营养学报, 2012, 24 (6) : 1013-1018.
- LU M, WANG S H, DI Y R, et al. Cloning and expression of cellulase genes[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(6): 1013-1018. (in Chinese)
- [5] 肖志壮, 王婷, 汪天虹, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶III基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2001, 41 (4) : 391-396.
- XIAO Z Z, WANG T, WANG T H, et al. Cloning and expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase III (*egIII*) gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(4): 391-396. (in Chinese)
- [6] OKADA H, TADA K, SEKIYA T, et al. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 555-563.
- [7] 雒军, 宫晓燕, 魏炜, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II 在大肠杆菌中的重组表达及重组酶性质测定[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2009, 32 (3) : 92-98.
- LUO J, GONG X Y, WEI W, et al. Expression of recombinant *Trichoderma reesei* endoglucanase II in *Escherichia coli* and properties of the recombinant enzyme[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2009, 32(3): 92-98. (in Chinese)
- [8] 王瑾, 邬敏辰, 周晨妍. 内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌与毕赤酵母中的表达[J]. 生物技术通报, 2008 (3) : 110-114.
- WANG J, WU M C, ZHOU C Y. Expressions of endoglucanase II gene (*egII*) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(3): 110-114. (in Chinese)
- [9] NAKAZAWA H, OKADA K, KOBAYASHI R, et al. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 681-689.
- [10] 丁寅寅, 马会勤, 左芳雷, 等. 乳酸菌载体 pMG36e 的应用现状[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (11) : 106-111.
- DING Y Y, MA H Q, ZOU F L, et al. Application of lactic acid bacteria vector pMG36e[J]. China Biotechnology, 2009, 29(11): 106-111. (in Chinese)
- [11] van ASSELDONK M, de VOS W M, SIMONS G. Functional-analysis of the *Lactococcus lactis usp45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase[J]. Molecular and General Genetics, 1993, 240(3): 428-434.
- [12] 叶飞, 李昌, 任大勇, 等. 乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 1.2472 *usp45* 基因的克隆与原核表达[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50 (7) : 36-38.
- YE F, LI C, REN D Y, et al. Cloning and prokaryotic expression of *usp45* gene of *Lactococcus lactis* 1.2472[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50(7): 36-38. (in Chinese)
- [13] 黄建飞, 成丽丽, 李娜, 等. 棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶的乳酸乳球菌表达[J]. 现代食品科技, 2014, 30 (5) : 33-37.
- HUANG J F, CHENG L L, LI N, et al. Food-grade expression of β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus* in *Lactococcus lactis*[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 33-37. (in Chinese)
- [14] 张飞飞, 王瑞青, 朱宇鹏, 等. 大肠杆菌系列融合表达载体的构建[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2013, 36 (3) : 97-102.
- ZHANG F F, WANG R Q, ZHU Y P, et al. Construction of *Escherichia coli* fusion expression vectors[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2013, 36(3): 97-102. (in Chinese)
- [15] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analysis Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [16] CORTHESEY B, BORIS S, ISLER P, et al. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori*

- urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2005, 192(8): 1441-1449.
- [17] van de GUCHTE M, van der VOSSSEN J M, KOK J, et al. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(1): 224-228.
- [18] ZHANG W, WANG C, HUANG C Y, et al. Construction and secretory expression of beta-galactosidase gene from *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactococcus lactis*[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2012, 25(2): 203-209.
- [19] RAVN P, ARNAU J, MADSEN S M, et al. Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*[J]. *Microbiology*, 2003, 149(8): 2193-2201.
- [20] van ASSELDONK M, RUTTEN G, OTEMAN M, et al. Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363[J]. *Gene*, 1990, 95(1): 155-160.
- [21] 张秋香, 侯慧丽, 芦颖, 等. 猪链球菌口服疫苗的制备及小鼠血清免疫效果的评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(7): 25-30.
- ZHANG Q X, HOU H L, LU Y, et al. Preparation and immunogenicity of streptococcus suis oral vaccine in mice[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(7): 25-30. (in Chinese)
- [22] 朱双杰, 潘见, 杨俊杰, 等. 超高压处理对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(1): 62-66.
- ZHU S J, PAN J, YANG J J, et al. Effect of ultrahigh pressure processing on the activities of cellulose in *C. militaris* juice[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(1): 62-66. (in Chinese)