

桑天牛肠道微生物内切葡聚糖酶基因的克隆及在乳酸杆菌中的表达

谢骛李畅 杨雨鑫 王小龙 陈玉林*

(西北农林科技大学动物科技学院,杨凌 712100)

摘要: 本试验旨在构建含内切葡聚糖酶基因的重组乳酸杆菌,研究其对秸秆植物性饲料的降解效果,为后期构建高效分解纤维素的工程菌奠定基础。从桑天牛(*Apriona germari*)体内分离出枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),克隆其内切葡聚糖酶基因,通过酶切连接的方式将目的基因片段与启动子 P₃₂、信号肽 SP_{Ip0373}、乳酸杆菌载体 pLEM-415 共同构建了内切葡聚糖酶分泌表达重组质粒 pLEM-P₃₂SPNqm,并对重组乳酸菌酶学性质和其在秸秆饲料中的降解能力进行测定。结果表明:从枯草芽孢杆菌中克隆出的目的基因大小为 1 490 bp,构建的重组乳酸杆菌其表达产物的蛋白大小约 54 ku。进一步测定发现,重组乳酸杆菌产酶最适温度和时间分别为 37 ℃、24 h,在最佳条件下其羧甲基纤维素酶(CMCCase)活性为 2.06 U/mL。酶促反应最适温度和 pH 分别为 60 ℃、6.0。在 50~70 ℃、弱酸性条件下该酶的稳定性较好。金属离子 Na⁺、K⁺、Mn²⁺对酶促反应有促进作用,而 Mg²⁺、Cu²⁺对酶活性抑制作用较大。重组乳酸杆菌发酵粗饲料,对玉米秸秆、苜蓿秸秆、小麦秸秆均发挥了一定的降解作用,中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维相对降解率分别为 10.42%、21.12%、4.99%、7.85%、4.57%、9.53%。综上,本试验构建的重组乳酸杆菌对常见的秸秆植物性饲料均有一定的降解能力。

关键词: 枯草芽孢杆菌;内切葡聚糖酶;罗伊乳酸杆菌;基因工程;发酵饲料

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)03-1344-09

全球经济建设飞速发展,人类对不可再生资源的肆意使用,使得有毒有害气体对全球环境造成了严重危害。所以可再生资源的有效利用引起了科学家们的关注。纤维素是自然界存量最多的可再生资源,由 D-葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连接而成^[1-2],是地球上分布最广、含量最多的一种多糖。纤维素主要通过植物的光合作用产生^[3],在自然界中,纤维素的降解是碳素循环的关键^[4]。纤维素的利用与转化对解决资源危机以及人类的可持续发展具有重要意义。但纤维素分子结构极其稳定,很难被有效降解和利用。通过生物酶降解是利用纤维素的一种较为理想方式,能很好地

起到降低经济成本和保护环境的作用^[5]。纤维素酶(CMCCase)属于糖苷水解酶家族,其在真菌、细菌、植物、动物体内均有不同表现形式^[6],其中通过动物体内真菌、细菌所产 CMCCase 来降解纤维素,并克隆 CMCCase 相关基因用于重组菌的构建已被科学家们广泛研究^[7-8]。随着现代生物技术、基因重组技术的大力发展,外源 CMCCase 基因已经成功在不同模式的宿主菌株中表达,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸杆菌、里氏木霉等^[9-10]。

桑天牛(*Apriona germari*)属于昆虫纲,鞘翅目,天牛科,在我国分布广泛,是许多树木、花卉的主要害虫之一,但它可以通过降解纤维素来促进

收稿日期:2019-09-03

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0501905);国家绒毛用羊产业技术体系(CARS-39-12)

作者简介:谢骛李畅(1994—),男,重庆人,硕士研究生,研究方向为分子营养。E-mail:383566815@qq.com

*通信作者:陈玉林,教授,博士生导师,E-mail:chenyulin@nwafu.edu.cn

农业生态系统的平衡。CMCase 可由细菌产生, 由于细菌生长速度快, 便于作为研究对象, 因此科学家们对细菌所产 CMCase 产生了浓厚的兴趣。桑天牛成虫最喜蛀食树皮来获取营养成分, 故该天牛具有较强的纤维素分解能力, 考虑到其潜在作用, 故本试验选取了桑天牛作为研究对象。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 具有编码分泌优良酶的基因, 故被认为是 CMCase 有效的生产者, 且枯草芽孢杆菌作为常见菌株, 耐受力佳, 更具研究意义。CMCase 是把纤维素降解为葡萄糖的酶的总称, 根据作用机理分为 3 类, 分别是内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶, 3 种 CMCase 各司其职将纤维素大分子降解为生物可以吸收利用的葡萄糖^[11-12]。枯草芽孢杆菌作为好氧革兰氏阳性杆状细菌, 它不会产生毒素, 是一种无致病性的安全微生物, 易于存活, 是良好的基础研究试验菌株。

乳酸杆菌嗜酸性, 因发酵产生乳酸而得名^[13], 是一类生活在机体内有益于宿主健康的微生物, 它可以调节机体免疫功能以及维护机体的健康。近年来, 重组微生物技术迅速发展, 乳酸杆菌被大量学者选作基因工程宿主菌, 构建重组菌来表达各种目的基因^[14], 这在生产实践中具有极其重要的应用价值。

本试验从桑天牛体内获取的枯草芽孢杆菌中克隆了内切葡聚糖酶基因, 并与乳酸杆菌成功构建重组菌, 从而使得重组菌既有传统乳酸菌发酵饲料提高粗饲料品质、适口性的作用, 同时又能发挥降解纤维素的功能。之后对表达产物进行了酶学性质研究以及粗饲料发酵试验, 充实了乳酸杆菌重组菌的研究数据, 为提高粗饲料的利用提供了试验依据, 同时为相关试验提供一定的参考价值。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒

质粒 pMP (含乳酸菌组成型启动子 P_{32} 和信号肽 SP_{1p0373}) 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并保存于实验室; 乳酸杆菌质粒 pLEM-415、大肠杆菌 DH5 α 及感受态和罗伊乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 及感受态均由本实验室保存; 枯草芽孢杆菌分离于桑天牛体内。

1.1.2 主要培养基

固体筛选培养基: 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 10 g/L、蛋白胨 2 g/L、酵母膏 0.5 g/L、 K_2HPO_4 1.5 g/L、 Na_2SO_4 2.5 g/L、琼脂 20 g/L。

种子培养基: 牛肉膏 1 g/L、蛋白胨 0.3 g/L、NaCl 0.5 g/L。

发酵产酶培养基: CMC-Na 7.5 g/L、蛋白胨 3 g/L、酵母膏 0.5 g/L、 KH_2PO_4 2 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L、 $CaCl_2$ 0.3 g/L。

MRS 培养基: 酵母提取物 5 g/L、牛肉膏 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、 $MnSO_4$ 0.25 g/L、吐温-80 1 mL/L、葡萄糖 5 g/L、 $MgSO_4$ 0.58 g/L、柠檬酸三胺 2 g/L、乙酸钠 5 g/L。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购于 TaKaRa (大连) 公司; DNA 凝胶回收、质粒提取试剂盒购于北京全式金生物技术公司; 细菌全基因组 DNA 提取试剂盒购于美国 OMEGA BIO-TEK 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 桑天牛肠道产 CMCase 细菌的分离鉴定

将前期试验制备的桑天牛体内肠道悬液 10^{-5} 稀释液 100 μ L 涂板于固体筛选培养基, 37 $^{\circ}C$ 培养 30 h, 待单克隆长成后接种于种子培养基中, 重复以上步骤直至获得形状近似的纯化菌株。最后用 1% 刚果红在固体筛选培养基中染色 15 min, 用 1 mol/L NaCl 溶液洗脱 15 min, 若观察到菌落周围有水解圈, 则可判定是产 CMCase 菌株, 取较大水解圈的 2 株菌株分别命名 C1、C2, 菌液交由北京擎科新业生物技术公司进行 16S rDNA 测序种属鉴定。

1.2.2 目的菌株内切葡聚糖酶活性测定

将 C1、C2 接种至发酵产酶培养基, 在摇床 37 $^{\circ}C$ 条件下发酵培养获得粗酶液, 在不同时间测定内切葡聚糖酶活性。

CMCase 活性采用 DNS 法测定^[15]: 配制 1 mg/mL 的葡萄糖母液, 以 0.2 mL 为梯度, 分别取 0~2 mL 放入比色管中, 不足 2 mL 则用蒸馏水补足 2 mL, 随后加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液摇匀, 沸水浴 5 min, 冷却后用蒸馏水定容至 10 mL, 以对照管调零, 于 540 nm 波长测定吸光度 (OD) 值, 根据 OD540 值和对应葡萄糖含量绘制标准曲线。测定内切葡聚糖酶活性时, 在比色管

中加入 500 μL 粗酶液与 1% CMC-Na 磷酸盐缓冲液作为底物, 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 随后迅速加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液, 沸水浴 5 min。冷却后加蒸馏水定容至 10 mL。根据葡萄糖含量标准曲线计算内切葡聚糖酶活性。内切葡聚糖酶活性单位定义: 一定条件下, 每分钟与 CMC-Na 反应生成 1 μmol 还原糖所需要的酶量, 单位为 U/mL。

1.2.3 目的基因的扩增

取内切葡聚糖酶活性较高的菌株——枯草芽孢杆菌作为后续试验对象, 提取枯草芽孢杆菌全基因组 DNA 作模板, 根据 GenBank 公布的枯草芽孢杆菌内切- β -1,4-葡聚糖酶基因序列 (ID: KT992142.1) 设计特异性引物 *NqmF*、*NqmR*, 克隆其内切葡聚糖酶基因, 命名 *Nqm*。同时利用引物 *P₃₂F*、*P₃₂R* 和 *SPF*、*SPR* 扩增乳酸杆菌启动子 *P₃₂* 和信号肽 *SP_{1p0373}*, 引物由北京擎科新业生物公司合成, 引物序列见表 1 (下划线为保护碱基, 大写表示酶切位点)。

表 2 PCR 退火温度和延伸时间

Table 2 Annealing temperature and extension time of PCR

引物 Primers	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	延伸时间 Extension time/s	酶切位点 Restriction site
<i>NqmF</i>	56	48	<i>Sac</i> I
<i>NqmR</i>			<i>Sac</i> II
<i>P₃₂F</i>	58	6	<i>Bam</i> H I
<i>P₃₂R</i>			<i>Spe</i> I
<i>SPF</i>	61	6	<i>Spe</i> I
<i>SPR</i>			<i>Sac</i> I

1.2.4 重组质粒的构建

使用 *Spe* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对 pLEM-415 载体与启动子 *P₃₂* 扩增产物进行双酶切, 再利用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 经抗性平板筛选阳性菌落提质粒测序。将测序鉴定正确的重组质粒命名为 pLEM-P₃₂。测序均由北京擎科生物公司完成。

使用相同方法用对应的限制性内切酶对 pLEM-P₃₂ 载体与信号肽 *SP_{1p0373}* 扩增产物进行酶切, 连接, 转化, 提质粒测序验证, 将正确构建的质粒命名为 pLEM-P₃₂SP。

最后, 将质粒 pLEM-P₃₂SP 与扩增出的内切葡聚糖酶基因片段 *Nqm* 经 *Sac* II 和 *Sac* I 双酶切, 连

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primers	序列 Sequence (3'—5')
<i>NqmF</i>	<u>c</u> GAGCTCatgaacggctcaatctctatt
<i>NqmR</i>	<u>tcc</u> CCGCGGgggtctgttcccaaatc
<i>P₃₂F</i>	<u>c</u> GGATCCaattcggtcctcgggatag
<i>P₃₂R</i>	<u>g</u> ACTAGT aactatacggaggatt
<i>SPF</i>	<u>ctag</u> ACTAGTatgtacactgaaaatactg
<i>SPR</i>	<u>c</u> GAGCTC tgaactagcatcaacaacc

PCR 反应体系 12.5 μL : cDNA 模板 1 μL 、正反向引物各 0.5 μL 、Taq MasterMix (康为) 6.5 μL 、ddH₂O 4 μL 。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度时间如表 2, 退火时间 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时间如表 2, 进行 38 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。

接, 转化, 提质粒鉴定后, 获得最终重组质粒 pLEM-P₃₂SP*Nqm*。

1.2.5 重组乳酸杆菌的构建与表达

使用 Eppendorf 电转化仪, 在电压 2 500 V、电击时间 5 ms 的条件下将重组质粒 pLEM-P₃₂SP*Nqm* 转化至罗伊氏乳酸杆菌感受态细胞中, 将电转化产物涂布于含红霉素抗性的 MRS 固体培养基, 培养后提取质粒测序同时进行 *Sac* I、*Sac* II 双酶切鉴定。

将重组菌在 MRS 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、厌氧、静置培养过夜, 离心 10 min 分别收集上清液和菌体沉淀。使用磷酸盐缓冲液重悬菌体沉淀, 利用超声波裂解 (频率 20 kHz, 破碎 4 s, 休息 5 s, 运行 15 min) 使菌液澄清透亮。再使用 Millipore 10 ku

规格超滤管,将上清液及澄清菌体液进行蛋白浓缩。最后,各取 20 μL 上清液和超声波破碎溶液加入适量上样缓冲液,沸水浴 10 min 后,在电压 90 V、电泳时间 180 min 条件下进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白的表达。

1.2.6 重组蛋白酶学性质研究

将重组乳酸杆菌在 MRS 培养基中培养,分别于 30、37、45 $^{\circ}\text{C}$ 培养,于 30 h 后测定菌内 CMCase 活性,确定其最佳产酶温度。在最佳产酶温度下再次培养重组乳酸杆菌,分别在不同时间段测定 CMCase 活性,确定其最佳产酶时间。在最佳产酶时间和温度下收集粗酶液。不同温度、pH 条件下,测定产酶最适反应温度、pH、热稳定性、pH 耐受性,将粗酶液与含有 5 mmol/L 的常见金属离子溶液混合,以无添加金属离子的底物作为对照组,即 CMCase 相对活性为 100%,反应 5 min 后测定酶活性以确定不同金属离子对该酶的影响。每次试验测定均独立重复 3 次。

CMCase 活性测定方法同 1.2.2。

1.2.7 重组乳酸杆菌粗饲料发酵试验

将 15 mL 重组乳酸杆菌菌液、15 mL 蒸馏水以及 80 g 粉碎后过 1 mm 筛的苜蓿秸秆加入到厌氧发酵袋中混匀作为试验组,对照组将重组乳酸杆菌换为野生型罗伊斯乳酸杆菌,试验组和对照组各进行 3 个重复试验,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱发酵 5 d。使用 ANKOM 200i 半自动纤维分析仪(美国)测定

各组粗饲料的中性酸性洗涤纤维、酸性洗涤纤维质量分数,试验组纤维含量相对于对照组所减少的部分与对照组纤维含量之比即为中性(酸性)洗涤纤维相对降解率。采用同样方法测定重组菌对小麦秸秆和玉米秸秆相对降解率。

1.3 统计分析

所有的试验数据利用 Excel 2016 作初步整理,再利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA, LSD),所有结果均以平均值 \pm 标准差($\bar{X}\pm\text{SD}$)表示,以 $P<0.05$ 作为差异性显著的判断标准。

2 结果与分析

2.1 产 CMCase 细菌鉴定及其酶活性测定

将测序结果在 NCBI 进行 Blast 分析,结果见表 3,可知 C1、C2 菌株分别是枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。将纯化的菌株在发酵培养基上培养,每隔 12 h 测定酶活性(图 1)。C2(苏云金芽孢杆菌)发酵的 96 h 内其内切葡聚糖酶活性一直在 0.7 U/mL 波动,从未超过 1 U/mL,而 C1(枯草芽孢杆菌)在发酵的 4 d 内,酶活性相对较高,在 36 h 达到 2.091 U/mL 的峰值。因此认定,C1(枯草芽孢杆菌)的 CMCase 降解能力较强。所以后续试验以枯草芽孢杆菌为研究对象,克隆其内切葡聚糖酶基因进行重组乳酸杆菌的构建。

表 3 2 株桑天牛体内纤维素降解菌的种属鉴定

Table 3 Attribute identification of two cellulose-degrading bacteria in *Apriona germari*

菌株编号 Strain No.	最高相似度菌株名称 Name of the most similar strain	最高相似度菌株 GenBank No. GenBank No. of the most similar strain	相似性 Similarity/%
C1	枯草芽孢杆菌	MK367805.1	99
C2	苏云金芽孢杆菌	AB592540.1	99

2.2 重组质粒 pLEM-P₃₂SPNqm 的构建

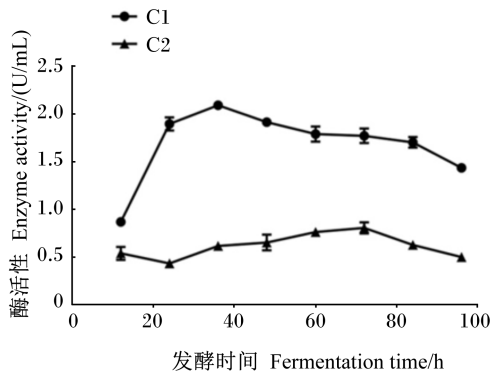
扩增后的目的片段 *Nqm*、P₃₂、SP_{lp0373} 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,分别得到 1 490(图 2-A)、120(图 2-B)、120 bp(图 2-C)的目的条带,与预期大小相符。

重组质粒 pLEM-P₃₂SPNqm 测序结果显示 P₃₂ 基因长度为 125 bp,无突变;SP_{lp0373} 基因序列长度为 123 bp,无突变;*Nqm* 基因长度为 1 490 bp,与枯

草芽孢杆菌内切- β -1,4-葡聚糖酶基因(ID: CP021903.1)的相似性为 99%。对重组质粒进行 *Sac* I、*Sac* II 双酶切鉴定,得到约 1 500 bp 的条带,与预期目的片段大小相符(图 3)。

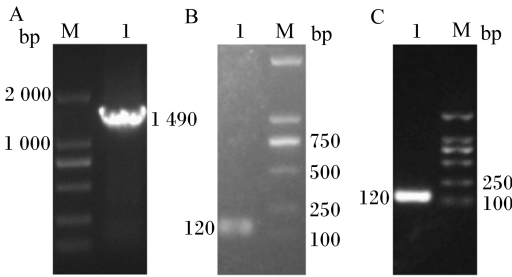
2.3 重组乳酸杆菌的表达

SDS-PAGE 分析显示,重组乳酸杆菌菌体蛋白(图 4-A)和上清蛋白(图 4-B)均在 54 ku 处显示出条带,与预期大小一致。判定其为重组蛋白产物。



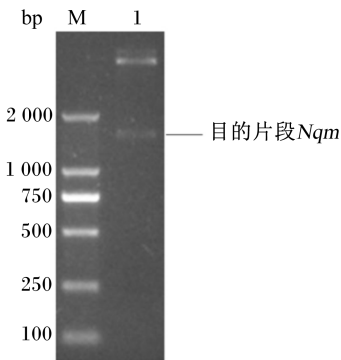
C1: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*; C2: 苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*。

图1 2株菌在不同发酵时间的酶活性
Fig.1 Enzyme activity of two strains at different fermentation time



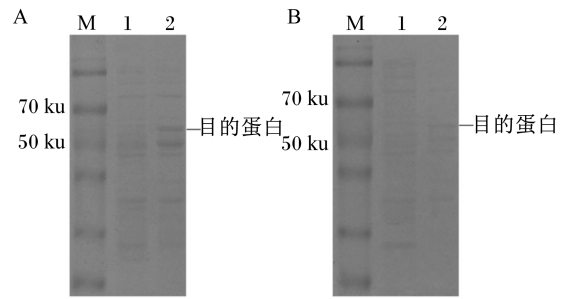
M: DL 2000 标记 DL 2000 marker; A: *Nqm* 基因 *Nqm* gene; B: *P₃₂* 基因 *P₃₂* gene; C: *SP_{1p0373}* 基因 *SP_{1p0373}* gene。

图2 目的片段 *Nqm*、*P₃₂*、*SP_{1p0373}* PCR 产物凝胶电泳图
Fig.2 Gel electrophoretogram of PCR products *Nqm*, *P₃₂* and *SP_{1p0373}*



M: DL 2000 标记 DL 2000 marker; 1: 重组质粒 pLEM-*P₃₂* SP*Nqm* *Sac* I、*Sac* II 酶切鉴定 pLEM-*P₃₂* SP*Nqm* digested by *Sac* I and *Sac* II。

图3 重组乳酸杆菌 *Sac* I、*Sac* II 双酶切鉴定
Fig.3 *Sac* I and *Sac* II double enzyme digestion identification of recombinant *Lactobacillus*



A: M 为蛋白标记,泳道 1 和 2 分别为野生型罗伊乳酸杆菌 (LR) 和重组乳酸杆菌菌体蛋白 SDS-PAGE 图 M was protein marker, and lanes 1 and 2 were LR and the SDS-PAGE of bacterial protein, respectively; B: M 为蛋白标记,泳道 1 和 2 分别为 LR 和重组乳酸杆菌上清蛋白的 SDS-PAGE 图 M was protein marker, and lanes 1 and 2 were LR and the SDS-PAGE of supernatant protein, respectively。

图4 重组蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig.4 Analysis of recombinant protein SDS-PAGE

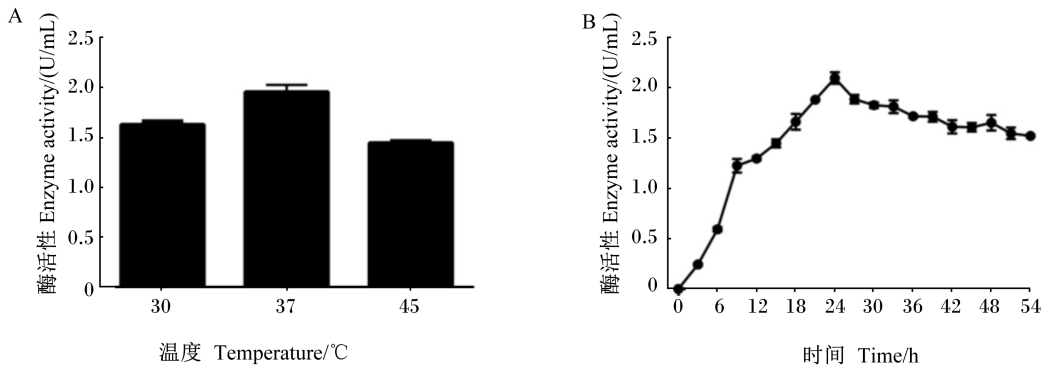
2.4 重组乳酸杆菌产酶特性及酶学性质

由图 5-A 可知,重组乳酸杆菌在 37 °C 达到最高酶活性 1.97 U/mL,培养温度高于或低于 37 °C 产酶量均会降低,所以该重组菌最佳产酶温度为 37 °C。测定重组菌在不同发酵时间的 CMCase 活性(图 5-B),重组菌生长至 24 h 时,酶活性逐渐升高直至 2.06 U/mL。之后的 18 h 酶活呈现下降趋势,在 42 h 后,CMCase 活性维持在 1.6 U/mL 左右,最佳产酶时间为 24 h。

将重组乳酸杆菌在 37 °C、180 rpm 的条件下,培养 24 h 离心获取粗酶液,进行酶促反应,测定最适温度、最适 pH、温度耐受性、pH 稳定性以及金属离子对酶活性的影响。由图 6-A 可知,该酶最适反应温度为 60 °C。该融合 CMCCase 经 30~90 °C 保温处理 60 min 后,再以 CMC-Na 为底物,测定 CMCCase 活性,可以看出其在 60 °C 稳定性最佳,在 50~70 °C,可以保持 90% 以上活性(图 6-B)。由图 6-C 可知,该酶酶促反应最适 pH 为 6.0,将 pH 降为 3.0 或者升至 10.0 时,酶活性下降至最高酶活的 68% 或 63%。将该酶在 pH 3.0~10.0 处理 60 min 后,测定其 pH 稳定性,可知当 pH 为 5.0 时,酶活性最高,其稳定性最佳,当 pH 在 4.0~8.0 时能维持最高酶活的 80% 以上活性(图 6-D)。由图 6-E 可知,测定的金属离子对酶促反应的影响各不同。其中 Na⁺、K⁺、Mn²⁺ 对酶有激活促进作用,其中 Mn²⁺ 对酶促反应有较强促进作用,相对活

性可达 125%。 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活性抑制作用最

大,相对活性仅为 77%、78%。



A:不同温度条件培养 30 h 后重组菌的 CMCase 活性 CMCase activity of recombinant strain after 30 h culture at different temperature conditions; B: 37 °C 不同时间内重组菌的 CMCase 活性 CMCase activity of recombinant strain at 37 °C for different time.

图 5 重组乳酸杆菌的产酶特性

Fig.5 Enzyme production characteristics of recombinant *Lactobacillus*

2.5 重组菌对粗饲料的发酵降解

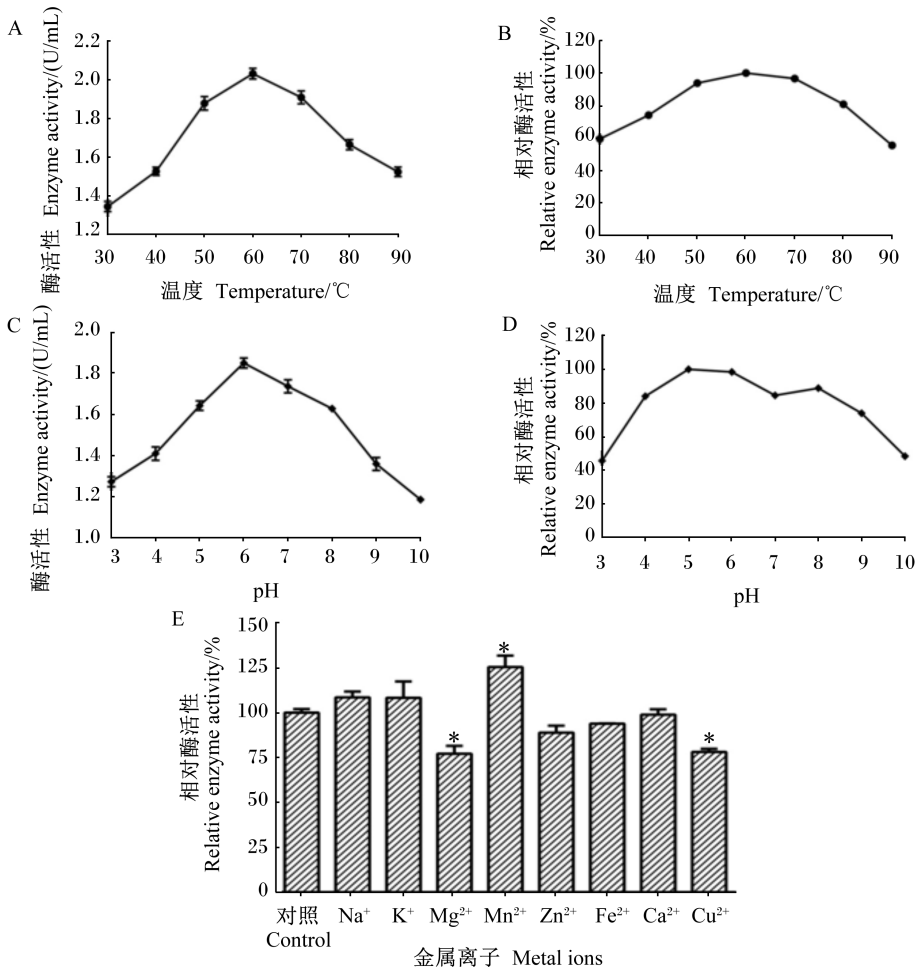
对发酵 5 d 后的 3 种粗饲料进行中性(酸性)洗涤纤维含量测定。如表 4 可知,试验组玉米秸秆酸性洗涤纤维含量相较于对照组差异显著($P < 0.05$),虽然其余试验组指标相较于对照组差异不显著($P > 0.05$),但试验组所有指标均明显降低。与对照组相比,试验组玉米秸秆、苜蓿秸秆、小麦秸秆的中性洗涤纤维相对降解率分别为 10.42%、4.99%、4.57%,其对应的酸性洗涤纤维相对降解率分别为 21.12%、7.85%、9.53%。这表明重组乳酸杆菌对秸秆植物性饲料均发挥一定的降解作用。

3 讨论

本研究从桑天牛体内筛选出产内切葡聚糖酶活性较高的枯草芽孢杆菌,克隆酶基因,将其与不受环境影响、不需诱导也能持续表达的外源基因,即在乳酸杆菌中应用较广的组成型启动子 P_{32} ^[16-17],分泌效率高、受分泌蛋白影响小在乳酸杆菌分泌表达系统中较理想的异源信号肽 SP_{Ipo373} ^[12] 以及乳酸杆菌质粒 pLEM-415 共同构建了内切葡聚糖酶基因 *Nqm* 的乳酸杆菌分泌表达载体 pLEM- $P_{32}SPNqm$ 。

重组乳酸杆菌在培养 24 h 后,酶活性达到 2.06 U/mL,当其酶活性进入稳定期后 CMCase 活性为 1.6 U/mL 左右,均低于原枯草芽孢杆菌酶活性(2.091 U/mL)。因为纤维素的有效降解需要葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶协同作用^[18],单个 CMCase 在降解纤维素时可能存在一定局限性^[19];也可能是由于枯草芽孢杆菌自身启动子稳定性更佳、转录能力更强、更能高效表达 *CMCase*^[20],而相比于重组菌外源质粒的表达则会受到多方面的影响^[21]。随着对基因组学的开发研究,挑选出高活性的组成型启动子和分泌效率理想的信号肽,进一步优化重组菌的表达载体,能更好地促进外源基因的高效表达。

该重组乳酸杆菌酶促反应最适温度和 pH 分别是 60 °C、6.0。 Mn^{2+} 对酶促反应有较强促进作用,而 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活性抑制作用最大。该重组菌可适应较广的温度和 pH 范围,因此较适合于实际生产应用。丁轲等^[9]对筛选的枯草芽孢杆菌产 CMCase 进行研究,其酶促反应最适温度和 pH 分别是 50 °C、6.0, Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对 CMCase 活性具有明显抑制作用。造成这些差异的原因多种多样,比如可能菌株受到不同环境的生长影响,也可能是受体菌自身的酶基因发生了突变^[22],不同的酶结构以及试验方法的区别都可能引起差异。



A: 最适温度 optimum temperature; B: 热稳定性 thermal stability; C: 最适 pH optimum pH; D: pH 稳定性 pH stability; E: 金属离子对酶促反应的影响 effects of metal ions on enzymatic reaction。数据柱标注 * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$) data column labeling * indicated significant difference from the control group ($P < 0.05$)。

图 6 重组乳酸杆菌的酶学性质

Fig.6 Enzymatic properties of recombinant *Lactobacillus*

表 4 秸秆植物性饲料中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量的测定

Table 4 Determination of neutral detergent fiber and acid detergent fiber contents in straw plant feed %

秸秆植物性饲料 Straw plant feed	试验组 Test group		对照组 Control group	
	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber
玉米秸秆 <i>Zea mays</i>	49.91±0.73	28.29±0.41 ^a	55.71±0.93	35.87±0.82 ^b
苜蓿秸秆 <i>Medicago sativa</i>	53.84±0.42	42.18±1.35	56.67±0.75	45.77±1.33
小麦秸秆 <i>Triticum aestivum</i>	71.81±0.96	44.72±1.08	75.24±0.97	49.43±1.11

同一指标同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same item, values in the same row with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with no letter superscripts mean significant difference ($P > 0.05$).

传统乳酸菌发酵饲料能提高粗饲料品质、适口性,能增强肠道有益菌群,维持菌群平衡,提高动物免疫力,为机体的生长过程提供营养物质^[23],但野生的乳酸菌对粗饲料无纤维素降解能力。本试验利用重组乳酸菌发酵粗饲料,结果表明重组菌对几种常见的秸秆植物性饲料均有一定降解能力,其中玉米秸秆的降解效果最佳。同时该酶无需诱导产生且对温度和 pH 均有一定的耐受性,在生产实践中能够有效延长保存时间,极大地降低成本,提高饲料营养水平,具有一定的应用价值。

4 结 论

本研究从桑天牛体内筛选的枯草芽孢杆菌中克隆出内切葡聚糖酶 *Nqm* 基因,与启动子 P_{32} 、信号肽 SP_{1p0373} 连接构成新载体,使之在乳酸杆菌中表达。重组乳酸杆菌产酶最适条件为 37 °C、24 h。将重组菌进行粗饲料发酵试验,其对几种常见的秸秆植物性饲料均有一定降解效果。

参考文献:

- [1] NI J F, TOKUDA G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31 (6): 838 – 850.
- [2] 叶代勇,黄洪,傅和青,等.纤维素化学研究进展[J]. *化工学报*, 2006, 57(8) : 1782–1791.
- [3] 廖春蓉,郭雅蓉.产纤维素酶菌株的研究进展[J]. *职业与健康*, 2016, 32(19) : 2722–2724.
- [4] ZANG X Y, LIU M T, FAN Y H, et al. The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11 : 51.
- [5] FONTES-PEREZ H, OLVERA-GARCÍA M, CHÁVEZ-MARTÍNEZ A, et al. Genome sequence of *Citrobacter* sp. ctb7.12, isolated from the gut of the desert subterranean termite *Heterotermes aureus* [J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6) : e01290–15.
- [6] BHAT M K, BHAT S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications [J]. *Biotechnology Advances*, 1997, 15(3/4) : 583–620.
- [7] DUAN J W, LIU J, MA X L, et al. Isolation, identification, and expression of microbial cellulases from the gut of *Odontotermes formosanus* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(1) : 122–129.
- [8] 王智伟,周小敏,杨雨鑫,等.黑胸散白蚁体内产纤维素酶细菌的筛选及其纤维素酶基因的鉴定与原核表达[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(8) : 1275–1287.
- [9] 丁轲,邱静静,罗伟光,等.2个枯草芽孢杆菌源纤维素酶基因的克隆、融合表达及其酶学性质分析[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(8) : 2725–2733.
- [10] 阮涛,曹一丁,刘贝贝,等.绿木霉 ZY-01 的外切葡聚糖酶 *CBHI* 基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. *化学与生物工程*, 2017, 34(1) : 27–31.
- [11] UZCATEGUI E, RUIZ A, MONTESINO R, et al. The 1, 4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei* [J]. *Journal of biotechnology*, 1991, 19(2/3) : 271–285.
- [12] 曹平华.多元纤维素酶基因乳酸杆菌共表达载体的构建及无抗标记乳酸杆菌重组技术的研究[D]. 博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学, 2016:1–12.
- [13] KIM H S, HAN O K, KIM S C, et al. Screening and investigation *Lactobacillus* spp. to improve *Secale cereale* silage quality [J]. *Animal Science Journal*, 2017, 88(10) : 1538–1546.
- [14] 刘原子,王艳,万学瑞,等.多粘类芽孢杆菌纤维素酶基因 *bglA*, *bglB* 和 *EG* 在乳酸杆菌中的分泌表达[J]. *草原与草坪*, 2017, 37(1) : 8–13.
- [15] 黄玉兰,李征,刘晓宁,等.一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(5) : 637–644.
- [16] 李旺.纤维素酶基因重组野生型乳酸杆菌表达系统的构建[D]. 博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学, 2010:1–17.
- [17] 王磊.转植酸酶和内切葡聚糖酶基因乳酸杆菌的构建及其肉鸡饲喂效果验证[D]. 博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- [18] SINGHANIA R R, SUKUMARAN R K, PATEL A K, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(7) : 541–549.
- [19] MORAÍS S, BARAK Y, CASPI J, et al. Cellulase-xy-lanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate [J]. *mBio*, 2010, 1(5) : e00285–10.
- [20] 熊海涛,韦宇拓.枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子的研究进展[J]. *广西科学*, 2018, 25(3) : 233–241.

- [21] 翟成一,徐岩,聂尧,等.产普鲁兰酶重组大肠杆菌质粒稳定性的研究[J].工业微生物,2015,45(2):13-20.
- [22] 龙海波,魏丽莎子,赵志祥,等.象耳豆根结线虫纤维素结合蛋白 *Me-cbp-1* 基因的克隆与功能分析[J].农业生物技术学报,2017,25(2):196-204.
- [23] 高苙宸,林金生.乳酸菌青贮与自然青贮的质量及其对反刍动物的影响[J].中国奶牛,2017(6):17-20.

Cloning Endo-Glucanase Gene of Cellulolytic Microorganisms from *Apriona germari* and its Expression in *Lactobacillus*

XIE Aolichang YANG Yuxin WANG Xiaolong CHEN Yulin*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The recombinant *Lactobacillus* containing cellulase gene was constructed to study its degradation effect on straw plant feed, which laid a foundation for the later construction of engineering bacteria that efficiently decompose cellulose. This study amplified an endo- β -1,4-glucanase gene from the *Bacillus subtilis* which was isolated from the *Apriona germari* *in vivo*. Through the restriction enzyme digestion and connection method, the *Lactobacillus* constitutive promoter element P₃₂, signal peptide SP_{1p0373} gene and cellulase gene are connected with *Lactobacillus* expression vector pLEM-415. After secretion and expression of the target gene, the enzymatic properties and the conditions of producing enzyme were studied, as well as the fermentation test of crude enzyme to roughage. The results showed that the length of the cellulase gene fragment was 1 490 bp, the molecular weight of the expressed protein was 54 ku. The optimum enzyme producing time and temperature of recombinant *Lactobacillus* were 24 h and 37 °C. Under the optimum enzyme producing conditions the activity of CMCase was 2.06 U/mL. The optimum temperature and pH of enzymatic reaction were 60 °C, 6.0, respectively. Under the condition of pH 5.5, 50 to 70 °C, the stability of the enzyme were the best. Metal ions Na⁺, K⁺ and Mn²⁺ had a promoting effect on the enzymatic reaction, while the Mg²⁺ and Cu²⁺ had a strong inhibitory effects. The fermentation test showed that recombinant *Lactobacillus* had degradation effect on corn straw, alfalfa hay and wheat straw, and the relative degradation rates of neutral detergent fiber and acid detergent fiber were 10.42% and 21.12%, 4.99% and 7.85%, 4.57% and 9.53%, respectively. Thus, the recombinant *Lactobacillus* constructed in this experiment has certain degradation ability to common straw plant feed. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(3):1344-1352]

Key words: *Bacillus subtilis*; endo-glucanase; *Lactobacillus reuteri*; genetic engineering; fermented feed