

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):628-633; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

牛凝乳酶原基因在乳酸乳球菌中的表达

孙大庆^{2#}, 秦兰霞^{1#}, 姚丽燕³, 李彬³, 曲行光³, 韩希妍³, 姜毓君^{1 3 *}

(¹ 东北农业大学国家乳业工程技术研究中心, 哈尔滨 150086)

(² 黑龙江八一农垦大学黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 大庆 163319)

(³ 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】利用乳酸乳球菌 nisin 诱导基因表达系统(the NIsin Controlled gene Expression system, NICE)表达牛凝乳酶原。【方法】从克隆载体 pS19-PPC 中获得牛凝乳酶原基因,将该基因与表达载体 pNZ8148 连接并电转化乳酸乳球菌 NZ9000,转化子经酶切、PCR 和测序鉴定后,用 nisin 进行诱导表达,表达产物利用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定,表达产物纯化后检测凝乳活性。【结果】重组牛凝乳酶原与天然牛凝乳酶原比较,其分子量大小、免疫性质、生物活性和抑制剂敏感性没有发现显著差异,其凝乳活性可达 2×10^3 IMCU/mL。【结论】在乳酸乳球菌中表达了具有凝乳活性的牛凝乳酶原,同时乳酸乳球菌作为发酵剂和凝乳酶产生菌双重角色的实现,为奶酪加工提供了新思路和新方法。

关键词: 牛凝乳酶原;乳酸乳球菌;蛋白印迹;凝乳活性

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0628-06

牛凝乳酶(323 AA,分子量 35600 Da)存在于未断奶小牛的皱胃中,属于天冬氨酸蛋白酶家族成员,可以特异性裂解 κ -酪蛋白 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ 之间肽键,引起牛乳中蛋白质的凝聚,相较于其他来源的凝乳酶具有优良的凝乳特性,因此在奶酪加工中长期而广泛的应用。牛凝乳酶在胃粘膜细胞中以牛凝乳酶原前体(bovine preprochymosin, bPPC)形式合成,含有 16 个氨基酸疏水性信号肽序列,分泌到细胞外时形成牛凝乳酶原(bovine prochymosin, bPC, 365 AA,分子量 40777 Da)。pH 4-5 时, bPC 可以自我催化裂解氨基端 42 个氨基酸,形成具有活性的凝乳酶。当 pH < 2.5 时, bPC 会裂解掉一个 27 AA-28 AA 的短肽,形成假凝乳酶。bPC 基因全长 10.5 kb,含有 9 个外显子和 8 个内含子,具有两个等位基因形式,分别表达为凝乳酶 A 和凝乳酶 B,凝乳酶 A 氨基酸²⁴⁴

是 Asp,凝乳酶 B 则是 Gly^[1]。

乳球菌是发酵乳制品最常用的发酵剂之一,尤其在奶酪生产中具有十分重要的地位,它也是目前乳酸菌中研究最为深入的公认安全型(generally recognized as safe, GRAS)模式菌株。2001 年第一株乳酸菌即乳酸乳球菌 IL1403 全基因组测序项目即告完成,随后又有 2 株乳球菌全基因组完成测序^[2],其间不短有新的基因及其调控元件被分离鉴定,揭开了乳酸菌后基因组时代的序幕,这些都极大的促进了乳球菌的深层次开发和利用,例如作为生产蛋白的 GRAS 细胞工厂^[3-4],传递抗原或细胞因子的 GRAS 活体疫苗^[5-6],都是近年来乳酸菌研究中方兴未艾的热点和前沿。

本研究从克隆载体 pS19-PPC 中扩增 bPC 基因,亚克隆构建表达载体 pNZ8148-PC,获得重组乳

基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA10Z311); 黑龙江省科技厅攻关项目(GB08B403)

* 通讯作者。Tel/Fax: +86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@163.com

作者简介: #并列第一作者。孙大庆(1979-),男,黑龙江人,助理研究员,硕士,主要从事食品生物技术的研究。E-mail: sundaqing1979@163.com; 秦兰霞(1971-),女,黑龙江人,助理研究员,博士,主要从事食品生物技术的研究, E-mail: xia3688@163.com

收稿日期: 2009-12-12; **修回日期:** 2010-02-13

酸乳球菌 NZ9000/pNZ8148-PC, 表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定有目标蛋白表达, 纯化后测定其具有凝乳活性。本研究在乳酸乳球菌中成功表达了具有生物活性的牛凝乳酶, 同时乳酸乳球菌作为奶酪生产的发酵剂和凝乳酶产生菌双重角色的实现, 为奶酪生产提供了新思路和新方法, 具有潜在的商业价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 质粒 pS19-PPC、表达质粒 pNZ8148、*Lactococcus lactis* NZ9000 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶、DNase 酶、RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天根生化科技; 焦碳酸二乙酯 (DEPC)、TRIzol、乳链球菌素 (nisin)、天然 bPC 购自 Sigma; 玻璃珠购自 BioSpec; Anti-chymosin 兔血清购自上海英基生物; 羊抗兔 IgG-HRP 抗体购自北京中杉金桥生物技术; 其余均为分析纯试剂。

1.2 乳球菌表达载体的构建

以含有 *bPPC* 基因的克隆载体 pS19-PPC 为模版, 利用引物 PC-F 和 PC-R (序列见表 1) 进行 *bPC* 基因的扩增。PCR 产物用 *Nco* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 酶切产物与表达载体 pNZ8148 进行连接, 用于电转化。

按 Holo H 等^[7] 方法制备乳酸乳球菌 NZ9000 电转化感受态细胞。转化子利用 PCR (引物 8148-F 和 8148-R, 序列见表 1) 和酶切法进行鉴定。由北京 Invitrogen 公司进行测序。测序结果用 DNAMAN 软件进行分析。重组质粒命名为 pNZ8148-PC。

表 1 基因扩增的引物序列

Table 1 Sequences of primers for gene amplification		
Target Gene	Primer Probe	Oligonucleotide Sequence (5'→3')
<i>bPC</i> gene	PC-F	GCCCATGGCTGAGATCAC
	PC-R	CCCAAGCTTTCAGATGG
No/ <i>bPC</i> gene	8148-F	TATAAGGAGGCACTCA
	8148-R	TCAATCAAAGCAACAC

1.3 重组牛凝乳酶原的诱导表达

检测 OD₆₀₀ 绘制重组菌 NZ9000/pNZ8148-PC 的生长曲线。重组菌培养到对数生长期中后期时, 加入不同浓度的 Nisin, 继续培养 2 h, 离心收集菌体。

1.4 重组牛凝乳酶原转录产物的鉴定

采用玻璃珠-热酚法提取诱导表达后重组菌的

总 RNA, 提取操作按 Oh ET 等^[8] 方法进行。总 RNA 样品经 DNase I 酶解后进行 RT-PCR 检测。

1.5 重组牛凝乳酶原的鉴定

诱导后离心收集的菌体, 溶菌酶与超声破碎细胞, 随后进行全细胞蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot, 操作方法参见文献^[9]。

1.6 重组牛凝乳酶原的纯化和凝乳活性分析

将 100 mL 菌液离心收集, 破碎细胞后 4℃ 离心收集细胞内容物, 沉淀用 20 mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液重悬。辛酸-硫酸铵法纯化, 4℃ 透析过夜。用 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0/1 mmol/L EDTA/10% 甘油缓冲液 1:4 稀释, 再用清洗并平衡的 DEAE-cellulose 柱 (1.5 cm × 20 cm) 进行层析柱纯化, 梯度洗脱用 0.05 - 1.0 mol/L NaCl/10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0。重组 bPC 的洗脱峰及纯化效果用 SDS-PAGE 检测。

纯化后的样品 pH 调至 4.5 孵育 15 min。pH 调至 6.5 再孵育 1 h。离心后上清用于活性检测。在一个 96 孔板中, 每孔 100 μL 的检测混合液包括 15% 的脱脂乳粉、20 mmol/L CaCl₂、25 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.5 和凝乳酶, 32℃ 孵育 10 min。96 孔板倒置于吸水纸上, 除去未凝固的乳。与天然凝乳酶 (酶活 10⁸ International Milk-Clotting Units per gram, IMCU/g) 比较, 计算重组凝乳酶的凝乳活性以及胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin A) 和苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfony fluoride, PMSF) 对其酶活的敏感性。

2 结果

2.1 表达载体 pNZ8148-PC 的构建

表达载体 pNZ8148-PC 经 PCR 和酶切鉴定为阳性的克隆, 我们进行了测序, 测序结果与克隆载体 pS19-PPC 中 *bPPC* 基因 (Accession No. EF541122) 对应序列完全一致 (数据未列出), 该基因的克隆和序列分析结果已发表^[10]。

2.2 重组牛凝乳酶原转录产物的鉴定

重组菌诱导表达后, 其 RT-PCR 鉴定结果见图 1。含空载体的 NZ9000 没有扩增, 重组菌获得一条约 1.1 kb 大小的条带, 与预期片段大小一致。这表明重组乳球菌中表达载体上的牛凝乳酶原基因已成功转录, 该基因在转录水平上成功表达。为防止总 RNA 提取时可能残留的微量重组质粒造成试验结果的假阳性, 我们利用 DNase I 酶对总 RNA 样品进行了酶解处理。

2.3 重组牛凝乳酶原的鉴定

根据重组乳酸乳球菌 NZ9000/pNZ8148-PC 的生长曲线(数据未列出)可以确定,经过 6 h 培养重组菌生长至对数生长中后期,此时加入不同浓度 nisin 诱导表达 2 h 后进行 SDS-GAGE,结果如图 2 所示。与 NZ9000/pNZ8148 比较,重组菌泳道均增加了一条约 41 kDa 蛋白带,与天然 bPC 分子量大小一致。Nisin 诱导浓度为 10 ng/mL 时表达产量最高。Western blot 检测结果如图 3 所示。由图可知, Anti-chymosin 兔血清与天然 bPC 和重组 bPC 均发生特异性抗原抗体反应。NZ9000/pNZ8148 没有条带产生,这表明重组 bPC 和天然 bPC 具有十分相似的免疫特性。

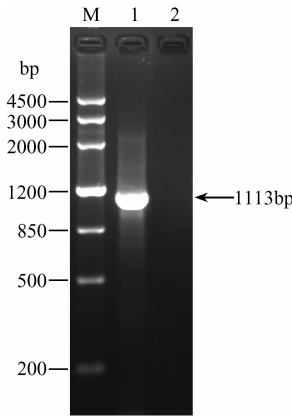


图 1 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 1 Identification of RT-PCR. M. DNA Marker; 1. Production of RT-PCR with recombinant NZ9000/pNZ8148-PC; 2. Production of RT-PCR with NZ9000/pNZ8148.

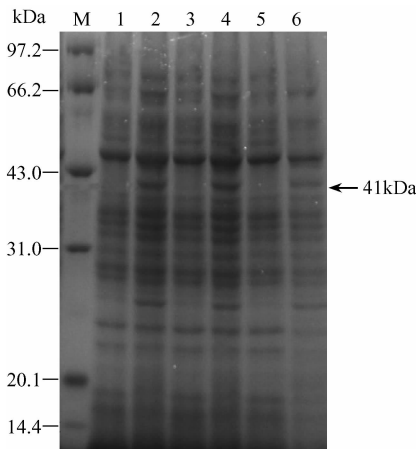


图 2 表达产物 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 Identification of SDS-PAGE. M: Protein Marker; 1, 3, 5: NZ9000/pNZ8148, nisin 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL; 2, 4, 6: NZ9000/pNZ8148-PC, nisin 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL.

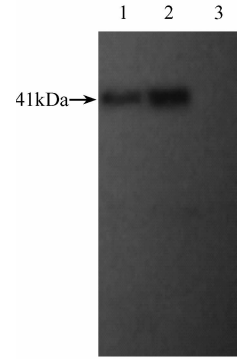


图 3 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant protein by Western blot. 1. Recombinant bPC; 2. Natural bPC; 3. Control NZ9000/pNZ8148.

2.4 重组牛凝乳酶原的纯化和凝乳活性分析

重组 bPC 纯化和活化后的 SDS-PAGE 如图 4 所示。由图 4-3 可知,经辛酸-硫酸铵法和 DEAE-cellulose 层析柱法纯化后,样品中已除去绝大多数蛋白,在约 41 kDa 处出现了预期大小重组 bPC 蛋白带。纯化后样品经酸化/中和处理,SDS-PAGE 结果见图 4-4,在约 36 kDa 处出现了预期的活化后的牛凝乳酶蛋白带。这表明重组 bPC 在酸性条件下能够自我催化,形成大小正确的牛凝乳酶。

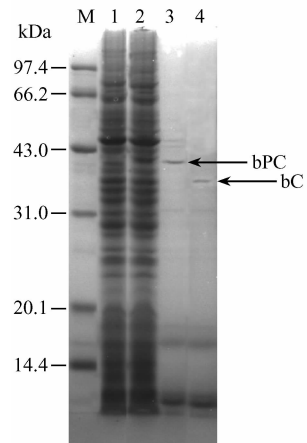


图 4 重组 bPC 纯化和活化鉴定

Fig. 4 Identification of purification and activation of recombinant bPC. M. Protein Marker; 1. Control NZ9000/pNZ8148; 2. NZ9000/pNZ8148-PC; 3. Recombinant bPC after purification; 4. Activated bC after purification.

重组 bPC 的凝乳活性检测结果如图 5 所示。由图 5-2,3,4 可知,检测灵敏度可达 2 IMCU 凝乳酶。重组 bPC(图 5-5)与天然 bPC(图 5-1)均没有凝乳活性。由图 5-6,7,8 可知,重组 bPC 经活化后显示了良好的凝乳活性,酶活可达 2×10^3 IMCU/mL。

天冬氨酸蛋白酶专一性抑制剂——胃蛋白酶抑制剂对天然 bPC 和重组 bPC 均有显著抑制效果(图 5-9,10),而丝氨酸蛋白酶专一性抑制剂——苯甲磺酰氟对它们没有抑制作用(图 5-11,12)。

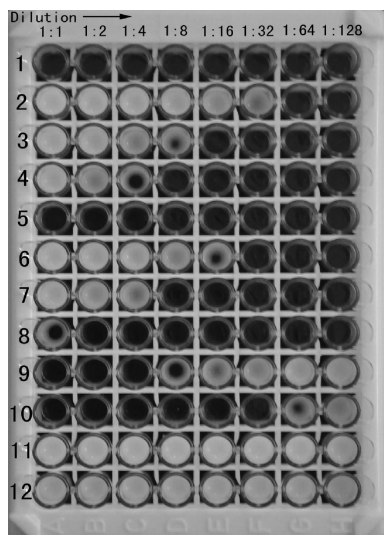


图 5 重组 bPC 凝乳活性检测

Fig. 5 Milk-clotting activity test of recombinant bPC. Enzyme or inhibitors were serially diluted 1:1 in reaction mixture. 1: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Natural bPC; 2,3,4: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Natural bC, respectively; 5:50 μL recombinant bPC; 6,7,8: 50 μL , 6 μL and 1 μL recombinant bC, respectively; 9: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Natural bC with 200-1.5625 mmol/L pepstatin A; 10: 50 μL recombinant bC with 200-1.5625 mmol/L pepstatin A; 11: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Natural bC with 2000-15.625 mmol/L PMSF; 12: 50 μL recombinant bC with 2000-15.625 mmol/L PMSF.

3 讨论

乳酸菌作为细胞工厂最吸引人的是其优越的安全性、没有内毒素和不产生包涵体。乳酸乳球菌 NICE 系统继承了这些优点的同时,还具有表达基因的严密性和高效性^[11-12]。本研究利用该系统成功表达了具有生物活性的 bPC,其免疫特性和生物活性与天然 bPC 相比没有显著差异,凝乳活性可达 2×10^3 IMCU/mL。目前,国内尚无乳酸菌表达 bPC 的报道。

本研究的首选应用是将重组菌株作为生产 bPC 的细胞工厂,为我国基因工程 bPC 的工业化生产提供 GRAS 优良的生产菌株。但为了满足大规模生产食品级 bPC 的要求,我们仍需要解决一些问题,例如表达载体中抗生素标记的去除或替换,怎样进一步提高表达产量和大规模发酵条件的优化。近年来

虽然已有多例乳酸乳球菌表达同源或异源蛋白的报道^[13-15],但至今没有看到成功工业化的案例。究其原因,发酵条件和密码子偏倚性是制约乳酸乳球菌表达产物工业化最重要的两个因素^[16-18],也是乳酸乳球菌表达体系亟需改进和完善的研究方向。最近我们已经开展了乳球菌表达 bPC 中试规模发酵条件的研究,为我国 bPC 工业化生产提供更加详实的研究基础。

与上述应用相比,如果可以将产 bPC 的乳球菌直接用于奶酪的加工,也就是说使乳酸乳球菌既发挥原有的发酵作用又可以在奶酪加工的凝乳阶段产生适量的 bPC,即发酵和凝乳角色合二为一,那么将对奶酪生产更加具有意义。首先,奶酪加工过程中无需添加昂贵的外源凝乳酶产品,更不需要对重组菌表达的凝乳酶进行提取、纯化等加工处理,有效解决了牛凝乳酶来源短缺问题,节约了生产成本。其次,牛凝乳酶具有高效的凝乳活性,0.2 mg 凝乳酶/L 原料乳即可满足奶酪加工要求,因此不必为了追求高效表达而进一步增加细胞的代谢负荷,因为过高的表达量很可能造成细胞发酵能力的下降和物质代谢的紊乱,进而影响奶酪品质。本研究采用的乳酸乳球菌 NICE 系统是目前乳酸菌中最严密和最成熟的基因表达系统之一^[19],完全可以满足适时适量表达凝乳酶的工艺要求,但仍存在一个不足之处,就是如何使胞内表达的 bPC 有效的作用胞外的底物——酪蛋白,使之凝聚成块。为此我们正在进一步研究,或者在奶酪加工的凝乳阶段采用超声等方法将表达 bPC 的重组菌直接破碎,或者进行 bPC 分泌表达改造。总之乳球菌表达具有凝乳活性 bPC 的成功,使奶酪加工中乳球菌的发酵和凝乳双重功能合二为一成为可能,对奶酪加工生产具有十分诱人的应用前景,对我国奶酪市场的开发和乳品行业产品的升级换代,具有积极的现实意义。

本研究将奶酪发酵剂乳酸乳球菌作为宿主菌,成功表达了具有凝乳活性的 bPC,使乳酸乳球菌作为发酵剂和产凝乳酶细菌的双重角色合二为一,既可以为我国基因工程 bPC 的大规模生产提供安全优良的生产菌株,使我国摆脱 bPC 依赖进口的现状,也可以改造为分泌表达后直接应用于奶酪加工,简化凝乳工艺,节约生产成本,为奶酪加工提供了新思路和新方法,具有良好的发展前景和潜在的经济价值。

参考文献

- [1] Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(2-3):205-217.
- [2] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42):15611-15616.
- [3] Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, Poquet I. Lactococcus lactis, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2008, 14(1-3):48-58.
- [4] Mifune J, Grage K, Rehm BH. Production of functionalized biopolyester granules by recombinant Lactococcus lactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14):4668-4675.
- [5] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, Ross E, Foo HL. Cell surface display system for Lactococcus lactis a novel development for oral vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(1):75-81.
- [6] 唐丽杰, 欧笛, 葛俊伟, 徐义刚, 李一经, 史达, 夏春丽, 郁茵. 表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸乳球菌的构建及免疫原性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(2):340-344.
- [7] Holo H, Nes IF. Electroporation of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55:3119-3123.
- [8] Oh ET, So JS. A rapid method for RNA preparation from Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(3):395-398.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 孙大庆, 姜毓君, 韩希妍, 曲妍妍, 毕宇涵, 张光辉. 牛凝乳酶原基因克隆及序列的进化分析. *遗传 (Hereditas)*, 2008, 30(7):863-869.
- [11] Hickey RM, Ross RP, Hill C. Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase enterolysin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:1744-1748.
- [12] de Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM. Controlled gene expression systems for Lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:3662-3667.
- [13] Zavala-Flores LM, Villatoro-Hernandez J, Gamez-Escobedo A, Franco-Molina M, Rangel-Colmenero BR, Villanueva-Olivo A, Gutierrez-Puente Y, de Oca-Luna RM, Valdés-Flores J, Saucedo-Cardenas O. Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by Lactococcus lactis. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(2):215-220.
- [14] Bahey-El-Din M, Griffin BT, Gahan CG. Nisin inducible production of listeriolysin O in Lactococcus lactis NZ9000. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7:24.
- [15] Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. Nisin-controlled extracellular production of apidaecin in Lactococcus lactis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(6):947-953.
- [16] Simşek O, Con AH, Akkoç N, Saris PE, Akçelik M. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered Lactococcus lactis strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(4):481-490.
- [17] Simşek O, Akkoç N, Con AH, Özçelik F, Saris PE, Akçelik M. Continuous nisin production with bioengineered Lactococcus lactis strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(6):863-871.
- [18] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(6):705-717.
- [19] Zhou XX, Li WF, Ma GX, Pan YJ. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(3):285-295.

Production of bovine prochymosin in *Lactococcus lactis*

Daqing Sun^{2 #}, Lanxia Qin^{1 #}, Liyan Yao³, Bin Li³, Xingguang Qu³, Xiyan Han², Yujun Jiang^{1 3 *}

(¹National Research Center of Dairy Engineering and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150086, China)

(²Agri-Food Processing Development Centre of Heilongjiang, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

(³Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: [**Objective**] Bovine prochymosin was expressed by the nisin controlled gene expression system in *Lactococcus lactis*. [**Methods**] We amplified bovine prochymosin gene from pS19-PPC vector by PCR, and ligated the gene with expression vector pNZ8148. Ligated products were electrotransformed into *Lactococcus lactis* NZ9000. Then we identified transformants by restriction, PCR and sequencing, and molecular weight and immune characteristics of expression product by SDS-PAGE and Western blot after inducing using nisin. We tested milk-clotting activity after purification. [**Results**] Recombinant bovine prochymosin was not significantly different in molecular weight, immune characteristics, bioactivity and sensitivity of inhibitors comparison from nature bovine prochymosin. The milk-clotting activity of recombinant bovine prochymosin was 2×10^3 international milk-clotting unit per milliliter. [**Conclusion**] We expressed recombinant bovine prochymosin of milk-clotting activity in *Lactococcus lactis*. This study suggested potential application in cheese manufacture as a new method, which could regard *Lactococcus lactis* as starter of milk and host of expression bovine prochymosin.

Keywords: Bovine prochymosin; *Lactococcus lactis*; Western blot; milk-clotting activity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2008AA10Z311) and the Scientific and Technological Project Heilongjiang Province (GB08B403)

* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@163.com

Those authors contributed equally to this work.

Received: 12 December 2009/Revised: 13 February 2010

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1)收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2)完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给予作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。