

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12) :1576 – 1583; 4 December 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150129

短小芽孢杆菌 β -1,4-甘露聚糖酶的酶学性质及其在干酪乳杆菌中的表达

邹业霞, 林金钟, 卜雪梅, 蒋露露, 陈正军*, 葛向阳*

华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】干酪乳杆菌广泛的应用于食品加工和饲料行业, 本研究拟构建表达甘露聚糖酶的重组干酪乳杆菌并进行相关评价。【方法】利用干酪乳杆菌表达载体 pELX1 和 pELSH, 将短小芽孢杆菌的 β -1,4-甘露聚糖酶成熟肽的基因克隆到上述两个载体中, 构建的重组质粒电转化到干酪乳杆菌宿主中, 分别构建能够胞内表达和分泌表达甘露聚糖酶的重组干酪乳杆菌。【结果】重组干酪乳杆菌菌株经培养后, 胞内表达的 β -1,4-甘露聚糖酶在重组细胞总蛋白中最高可达 23 U/mg, 分泌表达培养基上清的 β -1,4-甘露聚糖酶最高达到 8.8 U/mL。【结论】本研究首次实现了甘露聚糖酶在干酪乳杆菌中的表达, 结果表明该重组干酪乳杆菌具有较大的应用前景, 值得进一步研究。

关键词: β -1,4-甘露聚糖酶, 酶学性质, 干酪乳杆菌, 胞内/分泌表达

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1576-08

甘露聚糖是由 β -1,4-D-吡喃甘露糖连接而成的线状多聚体, 是半纤维素的重要组成部分, 广泛存在于自然界中。在许多植物如魔芋、椰子及多种植物胶(槐豆胶、瓜尔胶等)中都含有大量的甘露聚糖^[1]。但人和大部分家畜均不能分泌降解甘露聚糖的酶类, 至今仅有小部分甘露聚糖作为食品凝胶使用, 大部分尚未被有效的开发利用。内切 β -1,4-D-甘露聚糖酶(EC. 3.2.1.78)能随机的切断葡萄糖-甘露聚糖, 半乳-甘露聚糖和甘露聚糖等的 β -1,4-糖苷键, 生成的甘露寡糖能进一步被 β -甘露糖苷酶降解成甘露糖。甘露寡糖和甘露糖广泛地应用于饲料、食品和医药当中, 因此研究 β -D-甘露聚糖酶对开发利用甘露聚糖至关重要^[2]。

随着基因工程技术的发展和运用, 多种不同来源的 β -甘露聚糖酶基因已经被成功地从细菌和真菌中克隆并在相应的表达系统中进行了表达试验。研究比较多的表达宿主主要有两个, 分别是大肠杆菌(*Escherichia coli*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统^[3-8], 这两类表达系统对于大规模表达纯化 β -甘露聚糖酶, 测定酶学性质等特性意义重大, 但是通过这两种宿主表达的重组酶安全性不能得到完全有效的保证。还有一类研究较少的是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)表达系统^[9-10], 枯草芽孢杆菌作为一种食品级的菌株用于外源表达的宿主菌被广泛地应用到基因的克隆及过量表达, 相比于前述两种表达系统, 枯草芽孢杆菌表达系统的安全

* 通信作者。Tel: +86-27-87281040; Fax: +86-27-87280670; E-mail: 葛向阳, gxy@mail.hzau.edu.cn; 陈正军, vax@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 邹业霞(1988-), 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为乳酸菌的分子生物学。E-mail: zouyexia@163.com

收稿日期: 2015-03-23; 修回日期: 2015-04-28

性好。乳酸菌作为外源蛋白表达宿主菌,比枯草芽孢杆菌有优势。干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 作为乳酸菌的一员,是公认的安全菌株 (generally regarded as safe, GRAS), 通过食品级表达载体重组表达的酶无需纯化即可用于饲料添加剂等食品级用途^[11]。不仅如此,干酪乳杆菌是肠道微生物菌群的主要菌株,能够耐受机体的防御机制,其在进入机体后可以在肠道内大量存活,起到调节肠内菌群平衡、促进机体消化吸收,同时某些菌株被证实具有高效降血压、降胆固醇,抗过敏,增强机体免疫等益生功能,因此研究干酪乳杆菌表达系统意义重大^[12]。

本实验利用基因工程的方法从短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 中克隆 β -1,4-甘露聚糖酶基因 (*ManB*) 的成熟肽编码序列,将该基因克隆到乳酸菌表达载体 pELX1 中,并在大肠杆菌和干酪乳杆菌中进行了目标蛋白表达试验,并测定分析了大

肠杆菌重组表达的 *ManB* 的酶学性质。同时,以乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 的分泌蛋白 USP45 的信号肽 (SP_{USP45}) 为分泌信号构建了干酪乳杆菌分泌表达载体 pELSH,并实现了 *ManB* 在干酪乳杆菌中的分泌表达,并测试了表达 *ManB* 的重组干酪乳杆菌在以魔芋精粉为唯一碳源的培养基中的生长状况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 菌株和质粒见表 1。干酪乳杆菌菌株在 MRS 培养基中 37 °C 静置培养,大肠杆菌和短小芽孢杆菌在 Luria-Bertani (LB) 培养基中 37 °C 振荡培养。选择培养基添加 100 μ g/mL 的氨苄青霉素或 10 μ g/mL 的红霉素。

表 1. 本研究所用菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains, plasmids utilized in this study

Strains or plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Lb. casei</i> MCJΔ1	Transformation /Expression host	[13]
<i>B. pumilus</i>	β -1,4-Mannanase (<i>ManB</i>) gene	CCTCC AB94044
<i>Lc. lactis</i> MG1363	Secreted protein USP45 signal peptide (SP _{usp45})	Bright Dairy & Food Co., Ltd.
<i>E. coli</i> JM109	Transformation/Expression host	TaKaRa (Japan)
Plasmids		
pELX1	Cloning/expression vector	[13]
pELSH	Secretion expression vector/ the SP _{usp45} was cloned into pELX1	This work
pELX1-man	<i>ManB</i> was cloned into pELX1	This work
pELSH-man	<i>ManB</i> was cloned into pELX1	This work

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和 Protein Marker 购自美国 Fermentas 公司; *Taq* DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶和 dNTPs 购自北京全式金生物技术有限公司; 小量质粒 DNA 提取试剂盒和小量 PCR/酶切产物回收试剂盒购自美国 Omega 公司; 抗 His-Taq 抗体购自碧云天生物技术研究, 辣根过氧化物酶底物显色试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; Protein Assay 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; 镍柱购自德国 QIAGEN 公司; D-甘露糖购自国药集团化学试剂有限公司; 魔芋精粉购自湖北惠葡生化科技有限公司; 细胞电转仪购

自德国 Eppendorf 公司, 高压细胞破碎仪购自德国 Siemens 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 公布的序列定位目的基因序列号如下: 短小芽孢杆菌 β -1,4-甘露聚糖酶 (*ManB*) 基因 (GenBank No. JF791253.1), 乳酸乳球分泌蛋白 USP45 的基因 (GenBank No. M60178.1)。将 *ManB* 基因在在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 上预测信号肽序列, 截掉信号肽序列, 以此为模板设计引物, 同时设计构建干酪乳杆菌分泌表达载体 pELSH 的系列引物 (表 2)。

表 2. 本研究所用引物序列

Table 2. Primers Sequence utilized in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>Nco</i> I-man-F	CATGCCATGGCATACTGTGTGCGCTGTGAATC
<i>Kpn</i> I-man-R	CCGGGCTACCTCATTCAACGATTGGCGTTAAAG
<i>Eco</i> R I-PSlpA-F	CCGGGAATTCAAGCGGTAGGTGAAATATTAC
PSlpA-R	CATGTGGTCTTTTCCTCCTTG
SOE-SPusp45-F	CAAGGAGGAAAAAGACCACATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTA
<i>Xho</i> I-SPusp45-R	GGCCCTCGAGGTTTGTGTCAGCGTAAACACC
<i>Xho</i> I-MCS-F	GGCCCTCGAGCACCATCATCATCATCATGAC
<i>Bam</i> H I-T-R	GGCCGGATCCAGCTTGCCTTTGATTTTC

1.3 重组质粒构建

1.3.1 提取总 DNA:按照如文献 [14] 所述方法提取短小芽孢杆菌和乳酸乳球菌的总 DNA。

1.3.2 分泌表达载体 pELSH 的构建:用引物对 *Eco*R I-PSlpA-F/PSlpA-R 以质粒 pELX1 为模板进行 PCR 扩增得到嗜酸乳杆菌 SlpA 基因的启动子序列 (P_{slpA}), 用引物对 SOE-SPusp45-F/*Xho* I-SPusp45-R 以乳酸乳球菌的总 DNA 为模板 PCR 扩增得到 SPusp45 的 DNA 序列^[15], 将上述两个扩增得到的 DNA 片段用 SOE PCR (splicing overlapping extension PCR)^[16] 的方法扩增得到 PslpA-SPusp45 融合 DNA 片段, 试剂盒回收该片段后用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后, 备用; 用引物对 *Xho* I-MCS-F/*Bam*H I-T-R 以 pELX1 为模板 PCR 扩增得到包括 His-tag、多克隆位点 (multiple cloning site, MCS) 和转录终止子的一段 DNA 片段, 试剂盒回收该片段后用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 备用; 将 pELX1 载体用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切后, 胶回收大片段 DNA, 备用。将上述 3 个片段进行 3 片段酶连, 转化大肠杆菌, 挑选正确克隆命名为 pELSH。

1.3.3 pELX1-man 和 pELSH-man 的构建:用引物对 *Nco* I-man-F/*Kpn* I-man-R 以短小芽孢杆菌的基因组为模板进行 PCR 扩增 *manB* 基因的 DNA 片段, 用 *Nco* I/*Kpn* I 双酶切后连接到 *Nco* I/*Kpn* I 双酶切的质粒载体 pELX1 和 pELSH, 筛选正确克隆分别命名为 pELX1-man 和 pELSH-man。

1.4 干酪乳杆菌的电转化

按照文献报道 [13] 的方法制备干酪乳杆菌 MCJΔ1 感受态细胞和干酪乳杆菌的电转化。

1.5 β-甘露聚糖酶在大肠杆菌和干酪乳杆菌蛋白表达的鉴定

将大肠杆菌和干酪乳杆菌转化子分别在含相应抗生素的培养基中培养至对数生长后期, 11200 × g

离心 5 min 收集细胞, 用 1/10 体积的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (0.0802 mol/L K_2HPO_4 , 0.0198 mol/L KH_2PO_4 , pH7.4) 重悬细胞, 高压细胞破碎仪破碎细胞, 以携带空载体 pELX1 的重组菌为阴性对照, 点样进行 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析, 用抗 His-Taq 的抗体检测目标蛋白。Western blotting 方法同文献报道的方法 [13]。

收集重组大肠杆菌细胞, 压力破碎后, 4 °C 下 11200 × g 离心 10 min 取上清液, 过镍柱, 用不同浓度的咪唑缓冲液洗脱蛋白, SDS-PAGE 分析。

1.6 β-甘露聚糖酶活测定

用 0.1M 的乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH5.5) 配制 0.5% 的魔芋精粉, 常温下不停搅拌 30 min 成均匀胶体状。将重组干酪乳杆菌破碎细胞总蛋白上清液用乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH5.5) 稀释至合适倍数, 50 °C 保温 10 min。在 25 mL 比色管中加入 2 mL 0.5% 的魔芋精粉溶液, 同样在 50 °C 保温 10 min, 加入 2 mL 保温的稀释好的酶液, 精确计时 30 min, 加入 5 mL DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 定容至 25 mL, 测定波长 540 nm 下的吸光值。以先加 DNS, 后加酶液同样保温 30 min 的反应管为对照组调零。

以甘露糖储备液制作标准曲线, 根据标准曲线计算酶活性, 甘露聚糖酶活的定义为在 pH5.5, 50 °C 下, 每分钟产生 1 μmol 甘露糖所需的酶量定义为一个酶活单位 U。

1.7 β-甘露聚糖酶的酶学性质分析

最适温度和温度稳定性:将酶液置于 30、40、50、60、70 和 80 °C 上述温度下保温, 每 30 min 取样测定酶活力, 观察不同温度对酶促反应的影响。

最适 pH 和 pH 稳定性:配制 pH3.0 - 10.0 范围缓冲液, 50 °C 条件与相应粗酶液混合反应测定其酶活, 观察最适 pH; 将酶液加入上述缓冲液中 50 °C 条件下保温 30 min, 取样适当稀释, 测定酶活力, 观察

其在不同 pH 条件下的稳定性。

1.8 重组干酪乳杆菌不同生长时期 β -甘露聚糖酶蛋白量的表达测定

收集不同细胞浓度下的重组的干酪乳杆菌细胞, 7000 \times g 离心收集细胞, 用 PBS 缓冲液重悬, 高压破碎, 用乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH5.5) 稀释总蛋白至合适浓度, 测定菌体总蛋白的甘露聚糖酶酶活性, 同时用 Protein assay 试剂盒检测总蛋白的蛋白浓度, 计算重组干酪乳杆菌发酵液中甘露聚糖酶的总酶活量和单位总蛋白中甘露聚糖酶的酶活性。

1.9 重组干酪乳杆菌对魔芋精粉为唯一碳源的利用

以宿主干酪乳杆菌为对照, 同时选择胞内表达和分泌表达 β -甘露聚糖酶的重组干酪乳杆菌在 MRSK 培养基 (用 0.5% 的魔芋精粉替代 MRS 培养基中的葡萄糖) 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 取样测定细胞密度和培养基中的糖的还原性末端的浓度。

2 结果

2.1 β -1,4-甘露聚糖酶 (*ManB*) 基因在大肠杆菌和干酪乳杆菌中的表达

前期实验证实克隆有增强型绿色荧光蛋白 (*eGFP*) 基因的重组质粒 pELX1-eGFP 能使携带该质粒的重组大肠杆菌 JM109 中大量表达 eGFP 蛋白^[13]。因此在本实验中, 将含有重组质粒 pLEX1-man 的大肠杆菌 JM109 菌体总蛋白 (whole cell protein, WCP) 进行 SDS-PAGE 分析并过镍柱纯化, 观察目的蛋白 ManB 的表达并且纯化得到单一的 ManB 蛋白 (结果未显示)。

重组质粒 pLEX1-man 转化干酪乳杆菌 MCJ Δ 1 感受态细胞, 挑取阳性克隆转接至 100 mL MRS 培养基中, 培养过夜。离心收集细胞后压力破碎, 总蛋白进行 SDS-PAGE (图 1-A) 和 Western blotting (图 1-B) 分析。从 SDS-PAGE 凝胶上无法看到目标条带, 通过 Western blotting 的方法, 用抗 His-tag 的抗体杂交证实 ManB 在干酪乳杆菌中特异性的表达。取不同生长阶段的重组干酪乳杆菌, 破碎细胞, 取细胞破碎液测定 ManB 的酶活, 发现随着细胞的生长, 在重组干酪乳杆菌发酵液中 ManB 总量稳步上升 (图 2-A), 单位细胞总蛋白中最高的 ManB 酶活达到 23 U/(mg \cdot WCP) (图 2-B)。

基于分泌表达载体 pELSH 构建重组质粒 pELSH-man, 电转化至干酪乳杆菌中, 挑选阳性克隆重组子诱导培养, 检测上清液 ManB 的酶活。结果显示, 在细胞浓度 $OD_{600} \leq 3.4$ 时, 上清液中 ManB 的酶活随着细胞生长而增高, 在 $OD_{600} = 3.4$ 时达到最高, 酶活为 8.8 U/mL (图 3)。之后随着细胞浓度的增高, ManB 的单位发酵液酶活下降, 其原因可能是由于发酵液 pH 值的降低导致 ManB 降解, 或生长后期部分细胞破裂释放的蛋白酶降解引起。

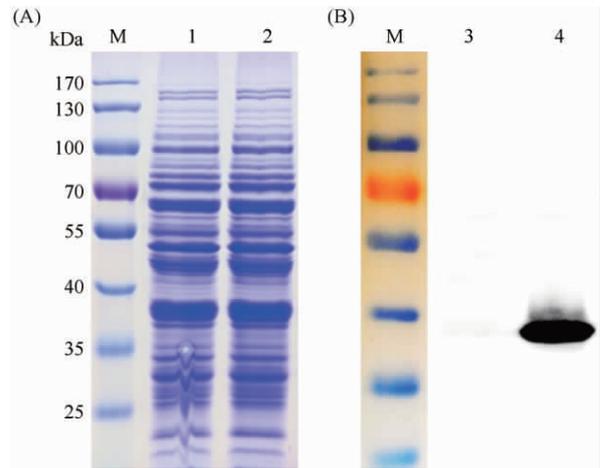


图 1. SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B) 分析 ManB 在干酪乳杆菌 MCJ Δ 1 中的胞内表达

Figure 1. Expression of ManB in *Lb. casei* MCJ Δ 1 by SDS-PAGE and Western blotting. (A) represent SDS-PAGE, M, marker; lane 1 - 2, whole protein of transformants of pELX1, pELX1-man. (B) represent Western blotting analysis, which suggested both recombinant proteins were expressed specifically. M, marker; lane 3 - 4, whole protein of transformants of pELX1, pELX1-man.

2.2 ManB 的酶学性质

2.2.1 最适反应温度和温度稳定性: 实验结果表明 ManB 的最适温度为 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 下酶活力为 50 $^{\circ}$ C 的 70%, 60 $^{\circ}$ C 以上随着温度升高酶活力迅速下降 (图 4-A)。50 $^{\circ}$ C 以下较为稳定, 保温 3 h, 保留酶活力在 90% 以上, 60 $^{\circ}$ C 以上, 随着时间延长, 酶活迅速下降, 60 $^{\circ}$ C 保温 3 h 后, 保留酶活力只有 25%, 70 $^{\circ}$ C 保温 2 h 几乎完全丧失 (图 4-B)。

2.2.2 最适反应 pH 与 pH 稳定性: pH 为 5.5 时酶促反应活性最高 (图 5-A), 但 pH 为 6 时酶的稳定性最好, 保温 30 min 后仍有 95% 的酶活保留, 在 pH5 - 8 范围内处理 30 min 后酶活力均保留 70% 以上, pH < 5 或 pH > 8, 酶较不稳定 (图 5-B)。

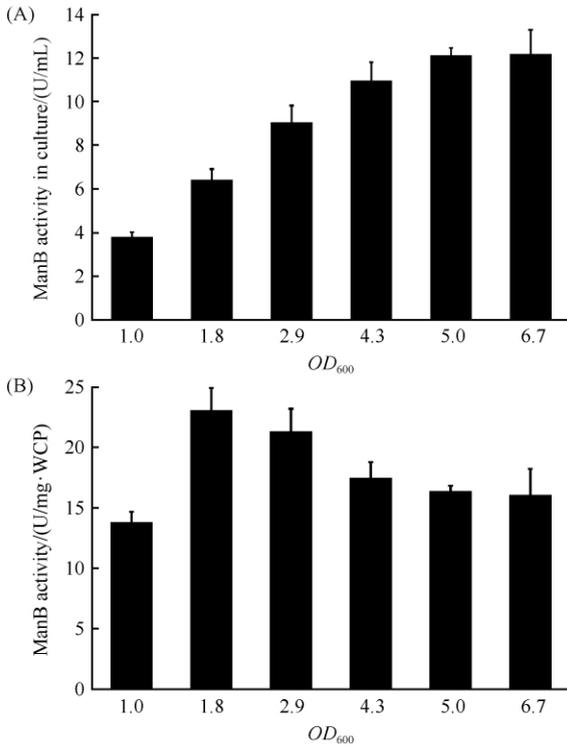


图 2. ManB 在干酪乳杆菌 MCJΔ1 中的胞内表达量
Figure 2. The intracellular expression quantity of ManB in *Lb. casei* MCJΔ1. (A) represent the whole intracellular expression ManB activity in culture of *Lb. casei* MCJΔ1 transformant by pELX1-Man vector. (B) represent the ManB activity in a unit WCP of *Lb. casei* MCJΔ1 transformant by pELX1-Man vector.

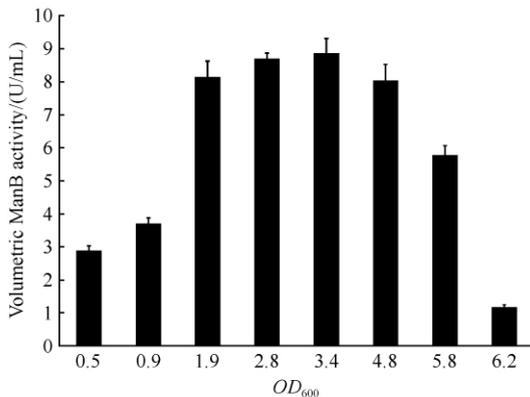


图 3. ManB 在干酪乳杆菌 MCJΔ1 的分泌表达
Figure 3. Secreted expression of ManB in *Lb. casei* MCJΔ1.

2.2.3 不同的金属离子对 ManB 酶活性的影响:
结果如表 3 所示, Na^+ 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 等对酶促反应有促进作用, Ag^+ 、 Hg^+ 和 SDS 对酶有明显的抑制作用。

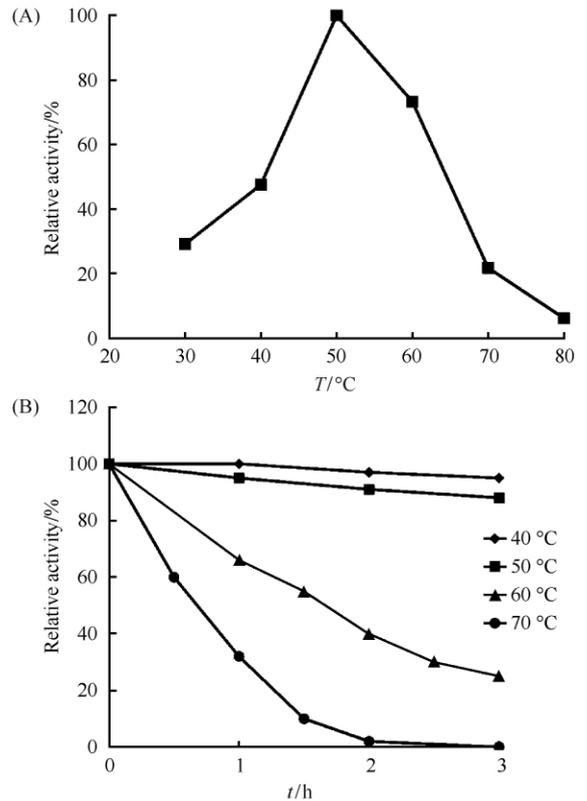


图 4. ManB 的最适反应温度 (A) 和温度稳定性 (B)
Figure 4. The optimum temperature (A) and thermal stability (B) of ManB.

表 3. 金属离子对 ManB 酶活力的影响

Table 3. Effects of various metal ions on ManB activity

Metal ions	Concentration / (mmol/L)	Relative activity / %
Control	1	100
K^+	1	102
Mn^{2+}	1	95
Na^+	1	113
Ca^{2+}	1	105
Mg^{2+}	1	101
Co^{2+}	1	110
Ba^{2+}	1	103
Al^{3+}	1	104
Ni^{2+}	1	114
Cu^{2+}	1	104
Li^+	1	105
Fe^{3+}	1	99
Zn^{2+}	1	91
Hg^+	1	2
Ag^+	1	5
EDTA	1	98
SDS	1	32

2.3 重组干酪乳杆菌利用魔芋精粉生长状况

以宿主菌株 (*Lb. casei* MCJΔ1) 为对照, 胞内表

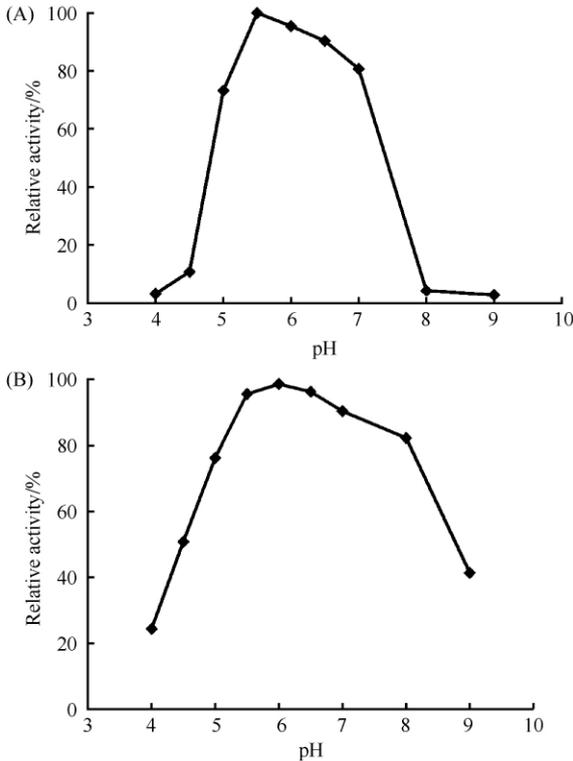


图 5. ManB 最适反应 pH (A) 与 pH 稳定性 (B)

Figure 5. The optimum pH (A) and pH stability (B) of ManB.

达的重组干酪乳杆菌 (pELX1-man-MCJΔ1) 和分泌表达重组干酪乳杆菌 (pELSH-man-MCJΔ1) 在以魔芋精粉为唯一碳源的 MRSK 培养基 (0.5% 的魔芋精粉替代 MRS 培养基中的葡萄糖) 中培养时的生长曲线。结果显示,受碳源制约,干酪乳杆菌在 MRSK 培养基中生长量不高。分泌表达菌株生长至最高的浓度时 OD_{600} 仅达 0.8 左右,而对照组和胞内表达组较为类似 (图 6-A)。ManB 是内切甘露聚糖酶,不能有效的将甘露寡糖进一步分解成甘露糖。因此,测定培养基中糖的还原性末端浓度可反映实际的酶活情况。结果表明,分泌组培养基中魔芋精粉在 15 h 后已经被完全分解成甘露寡糖 (图 6-B),胞内组则不能有效的分解培养基中的甘露聚糖。从分泌组的生长曲线可以得出,干酪乳杆菌 MCJΔ1 不能高效的利用甘露寡糖为碳源生长。

3 讨论

甘露聚糖酶作为一种重要的半纤维素酶,其对降解半纤维素具有重要的意义。研究表明甘露聚糖酶作为饲料添加剂,能够明显提高饲料利用率^[2],

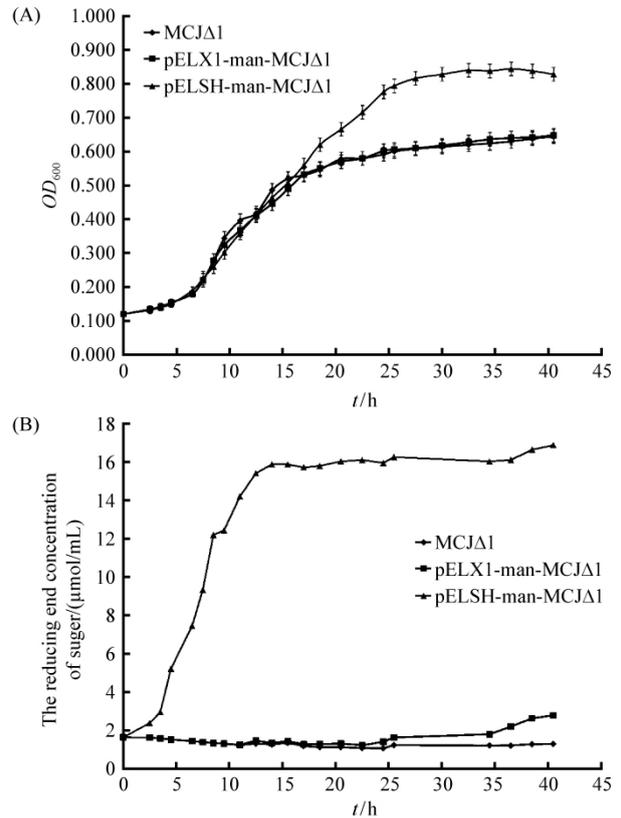


图 6. 重组干酪乳杆菌在 MRSK 培养基的生长曲线 (A) 和培养基上清的糖还原性末端浓度 (B)

Figure 6. The growth curve (A) and the reducing end concentration of suger (B) in supernatant of recombinant *Lb. casei* MCJΔ1 in MRSK medium.

甘露聚糖酶还可用来分解食物中的甘露聚糖,产生功能性糖类,由此可改善人体和动物肠道中的菌群组成,调节消化系统的功能减轻肥胖^[17-18],因而甘露聚糖酶研究逐渐受到重视。多年来,包括从产酶菌种的筛选、诱变和纯化,到利用基因工程技术在大肠杆菌和毕赤酵母等进行异源表达甘露聚糖酶都进行了广泛的研究。但是正如前言所述,大肠杆菌和毕赤酵母表达的甘露聚糖酶的安全性还无法完全保证,毕赤酵母表达系统至今都没有被批准用于食品级蛋白表达,大肠杆菌作为机会致病菌,更不适用于食品级表达。大肠杆菌表达系统由于研究较为深入,背景清晰,是研究甘露聚糖酶的良好表达宿主,但大肠杆菌中,蛋白表达量低,蛋白易形成包涵体,导致后续纯化过程复杂,产业化生产困难大。

乳酸菌有用于食品生产的悠久历史,其中的多种乳酸菌被证实是对人类有益的益生菌^[19]。随着分子生物学研究的进展,通过基因工程技术改造乳

酸菌,在乳酸菌细胞内或者胞外积累对人体有益的物质,对开拓乳酸菌新的应用前景意义重大。本文将来源于 *B. pumilis* 的 β -1,4-甘露聚糖酶 (ManB) 基因在大肠杆菌和干酪乳杆菌进行了表达,首次报道了甘露聚糖酶在干酪乳杆菌中的胞内表达,通过测定大肠杆菌表达的 ManB 的酶学性质,表明该酶具有良好的耐热性和温度稳定性,与报道的结果一致^[20]。

本研究同时构建了以乳酸乳球菌分泌蛋白 USP45 的信号肽为分泌信号的干酪乳杆菌分泌载体。在干酪乳杆菌中分泌表达 ManB 蛋白的同时,也证实了 USP45 的信号肽在干酪乳杆菌中的有效性。此外,分泌表达结果显示,重组干酪乳杆菌在以甘露聚糖酶为唯一碳源的培养基中能将甘露聚糖有效的分解成甘露寡糖,显示了益生菌和益生源配合作为动物肠道健康应用方向上的潜力和广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Jiang JX, Zhang WM, Zhu LW, Xu JS, An XN. Development of studies on vegetable gums of galactomannan. *Chinese Wild Plant Resources*, 2001, 20 (4): 1-5, 10. (in Chinese)
蒋建新, 张卫明, 朱莉伟, 徐嘉生, 安鑫南. 半乳甘露聚糖型植物胶的研究进展. *中国野生植物资源*, 2001, 20 (4): 1-5, 10.
- [2] Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Recent advances and prospect on structural biology of β -mannanase—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (9): 1131-1137. (in Chinese)
赵月菊, 薛燕芬, 马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望. *微生物学报*, 2009, 49 (9): 1131-1137.
- [3] Chen XL, Cao YH, Ding YH, Lu WQ, Li DF. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128 (3): 452-461.
- [4] Duruksu G, Ozturk B, Biely P, Bakir U, Ogel ZB. Cloning, expression and characterization of endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 2009, 25 (1): 271-276.
- [5] Ethier N, Talbot G, Sygusch J. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (11): 4428-4432.
- [6] Huang SP, Wang CL, Zhang GM, Ma LX. Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (2): 280-284. (in Chinese)
黄生平, 汪昌丽, 张桂敏, 马立新. 植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的构建和产酶分析. *微生物学报*, 2007, 47 (2): 280-284.
- [7] Li YN, Meng K, Wang YR, Yao B. A β -mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Zeitschrift Für Naturforschung, Tübingen*, 2006, 61 (11/12): 840-846.
- [8] Lv JN, Chen YQ, Pei HL, Yang WH, Li ZM, Dong B, Cao YH. Cloning, expression, and characterization of β -mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169 (8): 2326-2340.
- [9] Guo S, Tang JJ, Wei DZ, Wei W. Construction of a shuttle vector for protein secretory expression in *Bacillus subtilis* and the application of the mannanase functional heterologous expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24 (4): 431-439.
- [10] Yoon KH, Lim BL. Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17 (10): 1688-1694.
- [11] Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal*, 2011, 6 (9): 1147-1161.
- [12] Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 2013, 63 (2): 253-257.
- [13] Chen ZJ, Lin JZ, Ma CJ, Zhao SM, She QX, Liang YX. Characterization of pMC11, a plasmid with dual origins of replication isolated from *Lactobacillus casei* MCJ and construction of shuttle vectors with each replicon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (13): 5977-5989.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de

- Vos WM, Simons G. Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene*, 1990, 95 (1) : 155-160.
- [16] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2007, 2 (4) : 924-932.
- [17] Fujiwara S, Hirota T, Nakazato H, Muzutani T, Mitsuoka T. Effect of *Konjac* mannan on intestinal microbial metabolism in mice bearing human flora and in conventional F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, 29 (9) : 601-606.
- [18] Smith DL Jr, Nagy TR, Wilson LS, Dong SL, Barnes S, Allison DB. The effect of mannan oligosaccharide supplementation on body weight gain and fat accrual in C57Bl/6J mice. *Obesity*, 2010, 18 (5) : 995-999.
- [19] Gibson GR, Probert HM, van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 2004, 17 (2) : 259-275.
- [20] Araujo A, Ward OP. Mannanase Components from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56 (6) : 1954-1956.

Characterization of β -1, 4-mannanase from *Bacillus pumilus* and heterologous expression in *Lactobacillus casei*

Yexia Zou, Jinzhong Lin, Xuemei Bu, Lulu Jiang, Zhengjun Chen^{*}, Xiangyang Ge^{*}

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] *Lactobacillus casei* is widely used in food production and feed industry. The aim of this study was to construct the recombinant expression mannanase *Lb. casei*. [Methods] The mature peptide gene of β -1,4-mannanase from *Bacillus pumilus* was cloned into expression vectors pELX1 and pELSH, then electroporated into *Lb. casei*, establishing an intracellular and a secretion expression mannanase *Lb. casei* respectively. [Results] After incubation, the specific activity of β -1,4-mannanase was 23 U/mg whole cell protein for intracellular expression and 8.8 U/mL for secretion expression in supernatant. [Conclusion] Mannanase gene expression in *Lb. casei* provides application prospect and deserves further study.

Keywords: β -1,4-mannanase, enzyme property, *Lactobacillus casei*, intracellular/secretion expression

(本文责编:李磊,王晋芳)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-27-87281040; Fax: +86-27-87280670; E-mail: Xiangyang Ge, gxy@mail.hzau.edu.cn; Zhengjun Chen, vax@mail.hzau.edu.cn

Received: 23 March 2015/Revised: 28 April 2015