微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Jun. 20, 2020, 47(6): 1730−1739
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190714

研究报告

一株降解纤维素放线菌的产纤维素酶基因克隆与表达

张志宇　刘东格　卓君雨　景如贤　李祎*

河南师范大学生命科学学院　河南 新乡　453007

摘　要:【背景】纤维素在自然界中储量丰富，但天然纤维素的难降解性成为广泛应用纤维素资源的壁垒，近年来利用微生物来降解纤维素成为热点研究。【目的】筛选分离得到一株具有降解纤维素功能的放线菌菌株 Lb1，通过全基因组测序确定其产纤维素酶关键基因 5676，对基因 5676 进行克隆转化，使其在大肠杆菌中进行表达。【方法】通过基因工程技术将产纤维素基因连接到表达质粒上并导入表达菌株，对其降解纤维素生成葡萄糖的能力进行探究。【结果】将 Lb1 菌株的 16S rRNA 基因进行比对，确定菌株 Lb1 属于链霉菌属，命名为 *Streptomyces* sp. Lb1。成功构建出纤维素酶表达载体，并且导入表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)，重组菌株的产纤维素酶能力大于空载菌株。【结论】通过基因工程技术成功克隆出产纤维素酶基因，从而表达纤维素酶，为今后利用微生物降解纤维素的大规模应用提供参考。

关键词: 纤维素，放线菌，纤维素酶基因，异源表达

Cloning and expression of cellulase gene from a strain of cellulose degrading actinomycete

ZHANG Zhi-Yu　LIU Dong-Ge　ZHUO Jun-Yu　JING Ru-Xian　LI Yi*

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China

Abstract: [Background] Cellulose is abundant in the nature, but difficult for natural cellulase to degrade, which is a barrier to the extensive application of cellulose resources. In recent years, the degradation of cellulose by microorganisms has become a hot research topic. **[Objective]** A strain of actinomycete Lb1 with cellulose degradation ability was screened and isolated. The key cellulase producing gene 5676 was determined by whole genome sequencing, and the gene 5676 was cloned and transformed to be expressed in *Escherichia coli*. **[Methods]** The cellulose producing gene was connected to the expression plasmid and transferred into the expression strain by genetic engineering technology to investigate its ability to degrade cellulose. **[Results]** 16S rRNA gene of the strain Lb1 was sequenced, which was determined that the strain Lb1 belonged to genus *Streptomyces* and was named *Streptomyces* sp. Lb1. The expression vector of cellulose producing gene was successfully constructed, and the expression strain *Escherichia coli* BL21(DE3) was introduced, and its cellulase production capacity was higher than that of the wild-type strain. **[Conclusion]** Cellulase gene was successfully cloned and produced by genetic engineering

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51008119, 41576109); National Research Project Training Fund of Henan Normal University (5101049170805)
***Corresponding author:** Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn
Received: 29-08-2019; **Accepted:** 12-10-2019; **Published online:** 04-11-2019
基金项目：国家自然科学基金(51008119，41576109)；河南师范大学国家级科研项目培育基金(5101049170805)
*通信作者：Tel：0373-3326559；E-mail：liyi@htu.edu.cn
收稿日期：2019-08-29；接受日期：2019-10-12；网络首发日期：2019-11-04

technology to express cellulase, providing reference for large-scale application of microorganisms to degrade cellulose in future.

Keywords: Cellulose, Actinomycete, Cellulase gene, Heterologous expression

纤维素是自然界分布最广、含量最多的一种由葡萄糖组成的大分子多糖[1]，广泛应用于动物饲料、食品、纺织品、清洁剂和纸张制造[2-3]，然而天然纤维素难以降解，在生产生活中对其利用有很大的局限性[4]。过往人们对富含纤维素的木材废料、废纸、作物残渣等进行简单堆积或焚烧，不仅没有充分利用纤维素而且对生态环境造成了污染[5]。在传统工业生产中，一般使用酸碱水解纤维素，但是处理后会引入一些不利于纤维素降解的物质且成本较高[6-7]。近年来面对日益严重的环境和资源匮乏问题[8]，越来越多的人把目光投向利用微生物来降解纤维素，这种生物处理方法不仅降解效率高[9]、对环境友好，而且有效降低了成本[10-11]，能有效加强对纤维素的开发和利用。微生物降解纤维素关键在于其能否产生纤维素酶，目前对于产纤维素酶菌种研究较多的是曲霉(*Aspergillus* sp.)、木霉(*Trichoderma* sp.)、腐质霉(*Humicola* sp.)等真菌[12]，但是用真菌分解木质纤维素往往需要较长时间[13]。

本研究通过筛选分离出一株能降解纤维素的放线菌 Lb1，并对其进行全基因组测序，对功能基因进行注释后确定其降解纤维素的通路，发现有 3 个基因与纤维素酶的合成有关，使用基因工程技术将其中尚未被报道的基因 5676 进行克隆，将重组 DNA 分子导入大肠杆菌 BL21(DE3)，成功表达出纤维素酶，对利用生物方法降解纤维素提供理论基础，为放线菌降解纤维素在生产生活中的应用有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

富集培养基(g/L)：CMC-Na 5.0，滤纸 5.0，$NaNO_3$ 2.0，K_2HPO_4 1.0，KCl 0.5，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，$FeSO_4$ 0.001，pH 自然。

筛选鉴定培养基(g/L)：CMC-Na 5.0，酵母粉 2.0，磷酸二氢钾 0.5，硫酸镁 0.5，琼脂 20.0。

液体产酶鉴定培养基(g/L)：CMC-Na 10.0，蛋白胨 3.0，酵母粉 0.2，硫酸铵 2.0，磷酸二氢钾 4.0，硫酸镁 0.3。

LB 液体培养基(g/L)：酵母粉 5.0，蛋白胨 10.0，氯化钠 10.0，调 pH 至 7.0。

抗生素浓度：氨苄青霉素(Amp)浓度为 100 mg/mL。

1.1.2 主要试剂和仪器

PBS 缓冲液：磷酸二氢钾 0.24 g，磷酸氢二钠 1.44 g，氯化钠 8 g，氯化钾 0.2 g，加去离子水 800 mL 溶解，调 pH 至 7.2，定容至 1 L。

DNS 试剂：酒石酸钾钠 18.2 g，溶解在 50 mL 蒸馏水中，加入 0.63 g 3,5-二硝基水杨酸，溶解，再依次加入 2 g 氢氧化钠、0.5 g 苯酚和 0.5 g 无水硫酸钠，溶解后定容至 100 mL，避光保存，放置一周后使用。

1% CMC 缓冲液：1 g CMC-Na，溶解在 100 mL 50 mmol/L 柠檬酸-100 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0)中。

EZ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司；PCR 引物、PCR Mix，pETDuet-1 载体，T4 DNA 连接酶，宝生物工程(大连)有限公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒，天根生化科技有限公司；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒，北京索莱宝科技有限公司。

高速冷冻离心机，Eppendorf 中国有限公司；PCR 仪，北京东胜创新生物科技有限公司；凝胶成像分析系统，济南东仪实验室设备有限公司；超微量分光光度仪，赛默飞世尔科技公司；电泳仪，Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

土样取自河南师范大学花园土壤，土样采集时选择带有枯枝落叶的表层土。取 5 g 样品放入 200 mL 富集培养基，30 °C 条件下 180 r/min 恒温培养 3 d，观察菌体生长情况。采用梯度稀释法将富集培养后的菌液涂布于筛选培养基平板。24 h 后观察平板菌落，挑取不同形态、颜色的菌落进行分离及纯化，从而获得纯培养物。

将分离纯化的单菌落接种于 LB 液体培养基，37 °C、180 r/min 培养 2 d 后，取 1 mL 菌液于离心管中，4 000 r/min 离心 2 min，用液体产酶培养基洗涤 2 次，4 000 r/min 离心 2 min 去上清。无菌水重悬菌体，取 5 μL 点在筛选鉴定培养基平板中心，37 °C 培养 1 d 后观察菌落形态，测量菌落直径，使用克氏碘染液将菌落染色 5 min，观察透明圈大小，测量并记录透明圈直径。计算透明圈直径与菌落直径的比值，筛选出比值比较大的菌株。

1.2.2 菌株的鉴定

将筛选出的菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序。将测序结果与 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库进行比对[14]，选取出与所测序列相似性较高的种或属，最后再用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树[15]。

1.2.3 菌株 Lb1 的全基因组学分析

对 Lb1 进行全基因组测序分析[16]，送测菌株做 3 个生物学重复。送检样品通过 DNA 抽提、纯化、建库和测序，得到一系列下机数据。运用统计学方法对所有测序 Reads 的每个 Cycle 进行碱基分布和质量波动的统计，从宏观上反映出测序样本的文库构建质量和测序质量，并分析每一个样本的碱基质量、碱基错误率以及碱基分布。

对 Lb1 基因进行综合预测，采用 GeneMark S-native 方法[17]和 Heuristic 模型参数[18]，与 KEGG、COG、NR、SwissProt 和 GO 5 个数据库进行比对，得到相应的注释信息。在进行 BLAST 时需要设置筛选条件：*E*-value 小于 10^{-5}，大于 40%的序列相似性，大于 50%的序列覆盖度。在相同条件下将基因的注释信息进行集合组成，用 Circos 绘制 Lb1 的基因图谱。

1.2.4 纤维素酶分泌表达载体的构建

根据 *Streptomyces* sp. Lb1 基因组序列中 5676 基因序列设计一对引物 5676F (5′-GGAATTCCATATGATGGACGTCAGCAGGGGG-3′)和 5676R (5′-GGGGTACCTCACTCGCCGGCCCGGGC-3′)，在引物 5′加 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切位点，片段大小为 1 044 bp。以 *Streptomyces* sp. Lb1 总 DNA 为模板对基因 5676 进行扩增。PCR 反应体系：DNA 0.5 μg，Premix *Taq* 25 μL，正、反向引物各 0.2 μmol/L，ddH_2O 补充至 50 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；98 °C 10 s，55 °C 30 s，72 °C 1.5 min，30 个循环；72 °C 10 min，8 °C 保存。PCR 产物纯化回收后，用 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切，纯化回收片段。然后将 pETDuet-1 空质粒用同样的酶双酶切，纯化回收后与前面得到的片段连接。连接产物转化 *E. coli* DH5α，转化子经菌落 PCR 验证，PCR 反应体系：*rTaq* (5 U/μL) 0.25 μL，正、反向引物(同上)各 1 μmol/L，10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus) 5 μL，dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL，无菌牙签挑取菌落混入反应液，ddH_2O 补充至 50 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；98 °C 10 s，55 °C 30 s，72 °C 1.5 min，30 个循环；72 °C 10 min，8 °C 保存。质粒抽提和双酶切验证，获得的重组表达质粒 pETDuet-1-5676，并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

1.2.5 纤维素酶重组表达菌株的构建

挑取 LB 固体平板上大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落于 LB 液体培养基中，37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.5，4 °C、5 000 r/min 离心 10 min，弃上清，用预冷过的无菌水洗涤 2 次后加入 1.5 mL 预冷的 $CaCl_2$ (100 mmol/L)重悬后即为感受态细胞[19]。取 100 μL 感受态细胞加入 5 μL 重组质粒 pETDuet-1-5676 (100 ng/μL)，冰浴 30 min，42 °C

水浴 90 s 后冰浴 2 min，加入 350 μL 预热的 LB 液体培养基 37 °C 水浴孵育 1 h，吸取 100 μL 涂布于含有氨苄青霉素抗性平板，37 °C 正置培养 1 h 后倒置培养 12 h，挑取转化子，经质粒抽提酶切验证获得阳性转化子，通过该方法构建重组表达菌株并同时构建空质粒 pETDuet-1 的对照组菌株。

1.2.6 葡萄糖标准曲线

由于纤维素在纤维素酶的作用下生成葡萄糖[20-21]，因此测得反应液中葡萄糖即可确定纤维素的酶活力。本研究采用 DNS 法测定葡萄糖，首先绘制葡萄糖标准曲线：取 9 支 10 mL 的 EP 管，向每支管中分别加入 1 mg/mL 的葡萄糖标准液、DNS 试剂和蒸馏水，配制成不同浓度的葡萄糖反应液。混匀后在沸水浴中加热 10 min，然后立即用流动水冷却，分别取 200 μL 加到 96 孔板中，用酶标仪测定其在 540 nm 下的吸光值。以葡萄糖质量为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.7 纤维素酶活力的测定

吸取 150 μL CMC 缓冲液于 4 mL EP 管中，加入 50 μL 产酶液，对照组加空质粒 pETDuet-1 发酵液。50 °C 水浴保温 30 min，结束后加入 200 μL DNS 终止反应，将 EP 管中的混合液沸水浴 5 min，加入 650 μL 蒸馏水，混匀取 200 μL 加至 96 孔板，用酶标仪测定 540 nm 下的吸光度值，实验组与对照组做 3 个平行重复取平均值[22]。酶活力定义为：在 50 °C 的反应条件下，1 min 内催化 CMC-Na 生成 1 μmoL 葡萄糖所需的酶量[23]。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

通过对样品进行直接稀释涂布分离筛选及纯化，共获得 6 株纤维素降解菌(表 1)。这 6 株菌在筛选鉴定培养基平板上培养 1 d 后菌落为白色或乳白色；菌落形态均为圆形有光泽不透明。分别测量这 6 株菌的降解圈和菌落的直径发现，菌株 D3 的降解圈直径最大为 2.7 cm，菌株 Lb1 的降解圈直径最小为 1.4 cm，菌株 D3 的菌落直径最大为 1.90 cm，菌株 Lb1 的菌落直径最小为 0.45 cm。单个菌株的大小或是透明圈的大小不能代表菌株的降解能力，所以用每个菌株的透明圈直径与菌落直径的比值来表示菌株的降解能力。菌株 Lb1 的直径比值最大为 3.10，从而反映出菌株 Lb1 的降解能力最强，因此选择菌株 Lb1 作为目标菌株进行后续实验。

表 1 菌落及降解圈大小

Table 1 Colony and degradation cycle size

菌株名称 Strain name	降解圈直径 Degradation circle diameter (cm)	菌落直径 Colony diameter (cm)	降解圈直径/菌落直径 Degradation circle/Colony diameter
D1	2.6	1.75	1.49
D3	2.7	1.90	1.42
D4	2.2	1.50	1.47
H1	2.3	1.16	1.44
H2	1.8	1.15	1.57
Lb1	1.4	0.45	3.10

2.2 菌株的鉴定

将菌株 Lb1 测序后的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库进行比对，结果表明菌株 Lb1 与 *Streptomyces* 属的菌株 *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *apingens* (DSM41392)有最高相似性(表 2)，为 99.93%。使用 MEGA 5 软件构建系统发育树，从进化树中可以看出，菌株 Lb1 与菌株 *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *apingens* (DSM41392)在同一分支中(图 1)。因此，根据 16S rRNA 基因序列、系统进化分析及形态特征，确定菌株 Lb1 为 *Streptomyces* 属，命名为 *Streptomyces* sp. Lb1。

2.3 Lb1 的全基因组学分析

2.3.1 Lb1 的基因组特征

依据测序结果及分析，Lb1 的全基因组由一条 2 184 066 bp 的完整环状染色体组成，基因大小为 6 275 290，拼接数 284，(G+C)mol%含量占比 72.45%，编码序列数量 5 806 个，KEGG 基因注释 2 820 个，COG 基因注释数量为 4 285 个。

2.3.2 Lb1 的 GO 功能注释

Lb1 的 GO 功能注释结果如图 2 所示，有 2 574 个基因有具体的功能定义，共获得了 12 956 个 GO 功能注释。在所有 GO 注释中，有 3 847 个为分子功能，占 28.5%；有 3 068 个为细胞组件，占

表 2　菌株 Lb1 与其他菌株的 16S rRNA 基因相似性

Table 2　16S rRNA gene similarity between strain Lb1 and other strains

种属名 Hit taxon name	种加词 Hit strain name	登录号 Accession No.	相似度 Similarity (%)	完整度 Completeness (%)
Streptomyces thermoviolaceus subsp. *apingens*	DSM41392	Z68095	99.93	100.0
Streptomyces thermoviolaceus subsp. *thermoviolaceus*	DSM40443	Z68096	99.41	100.0
Streptomyces mexicanus	CH-M-1035	AF441168	99.12	100.0
Streptomyces chiangmaiensis	TA4-1	AB562507	98.81	100.0
Streptomyces chromofuscus	NBRC12851	AB184194	98.60	99.8
Streptomyces bullii	C2	HE591384	98.59	99.2
Streptomyces glomeratus	LMG19903	AJ781754	98.38	100.0
Streptomyces thermoalcalitolerans	NBRC16322	AB249909	98.38	100.0
Streptomyces thermocarboxydovorans	DSM44296	U94489	89.29	100.0
Streptomyces thermodiastaticus	DSM40573	Z68101	88.59	100.0

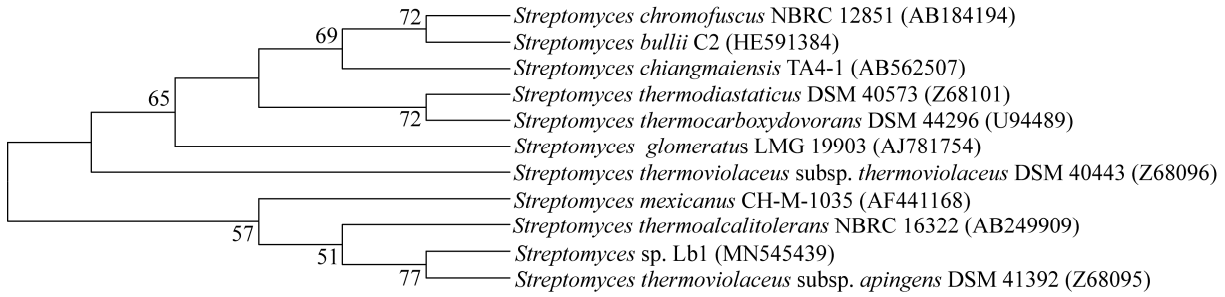

图 1　菌株 Lb1 基于 16S rRNA 基因构建的系统进化树

Figure 1　Phylogenetic tree of strain Lb1 based on 16S rRNA gene sequence

注：步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来；只保留步长值大于 50%.

Note: Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points; Only bootstrap values>50% are showed.

29.2%；6 041 个为生物过程，占 46.6%。所有 GO 注释的基因可归为 40 个亚类。与分子相关的基因最多，为 44.3%。催化活性(catalytic activity)和蛋白结合(binding)相关的基因数量最多，其比例为 71.6%和 56.0%，并且有 178 个基因与转录活性(transporter activity)有关，有 165 个基因与核酸结合转录因子(nucleic acid binding transcription factor activity)有关，有 30 个基因与分子传感活性(molecular transducer activity)有关，而与水营养活性(nutrient reservoir activity)有关的最少，只有 1 个。

2.3.3　菌株 Lb1 的碳水化合物活性酶注释

碳水化合物在很多生物学功能中具有重要地位，通过研究碳水化合物相关酶可以得到大量有意义的生物学信息，CAZy 数据库专注于分析碳水化合物酶的基因组、结构和生物化学信息。比对 CAZy 数据库(Carbohydrate Active Enzymes Database)获得碳水化合物活性酶基因注释概况并进行统计。如图 3 所示，在菌株 Lb1 中，比例最高的是水解酶(glycoside hydrolases)，占 40.81%；其次是糖基转移酶(glycosyltransferases)，占 24.66%。

2.3.4　菌株 Lb1 的 KEGG 代谢通路分析

通过 KEGG 的计算和推测，获得菌株 Lb1 的 KEGG 注释(图 4)。结果显示其基因功能与细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢和生物体系统这 6 类有关。在代谢通路中发现有 39 个与菌体生长能力有关的基因，这些基因可映射到 5 个 KEGG pathway 通路上，说明这些基因可以在这 5 个代谢途径上发挥作用。这些基因基本与糖的降解有关，形成一个复杂而又稳定的网络为菌体的生长提供物质和能量，能将来源于细胞外的蔗糖降解为葡萄糖和果糖，将细胞外麦芽糖降解为葡萄糖，这些基因通过产生不同的酶改变糖的构象和种类，最终将多糖和二糖降解成可利用的单糖。降解过程中产生的尿苷二

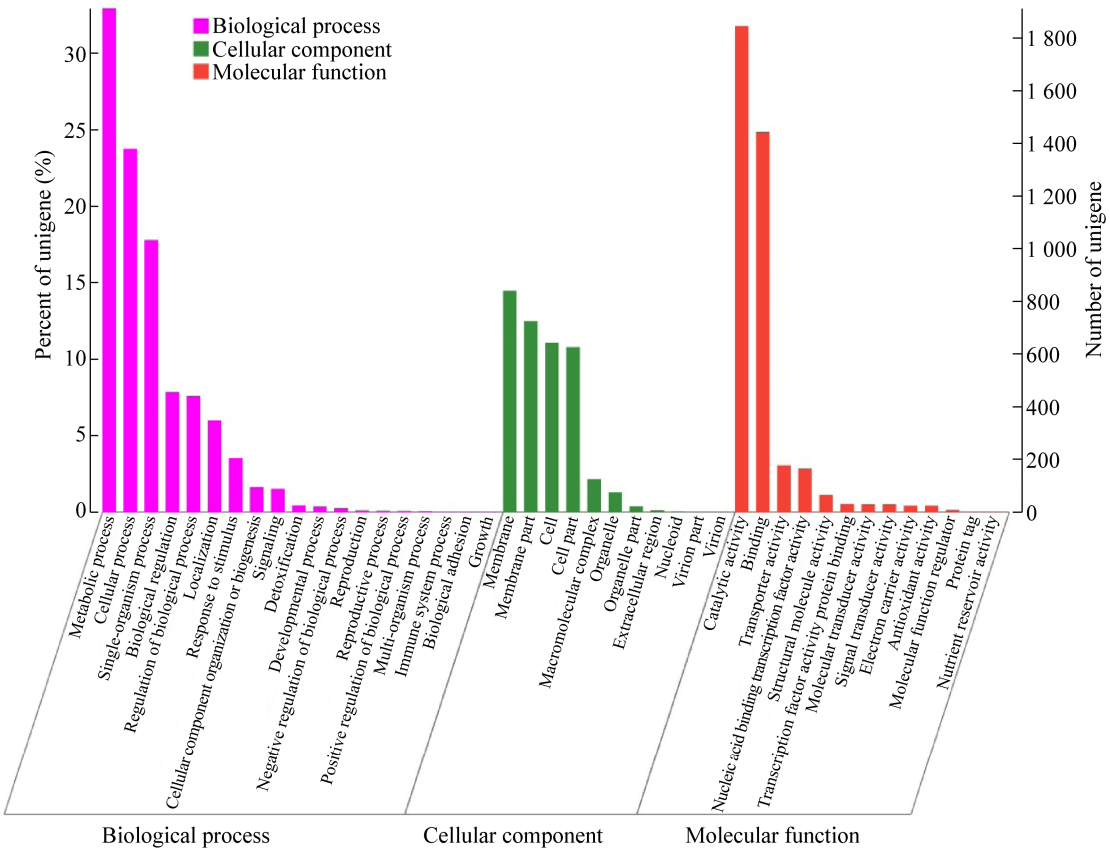

图 2　菌株 Lb1 的 GO 功能注释

Figure 2　GO function annotation of strain Lb1

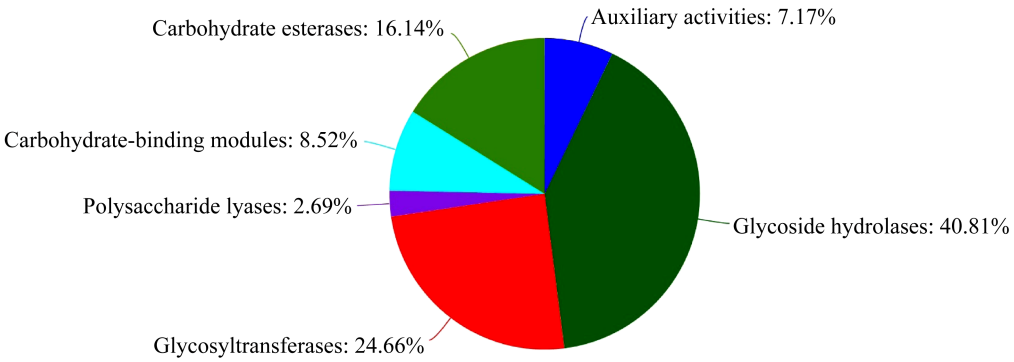

图 3　菌株 Lb1 的碳水化合物合成酶基因组成

Figure 3　The carbohydrate synthase gene composition of strain Lb1

磷酸葡萄糖与氨基糖和核苷酸糖代谢过程互为联系，而产生的腺嘌呤核苷二磷酸葡萄糖与糖异生或糖酵解过程相联系，从而与细胞内的其他过程相联系。

从菌株 Lb1 的 KEGG 通路中可知，有两条与纤维素降解有关的途径，与纤维素降解有关的基因有 3 个，如图 4 所示，纤维素可以由基因(3.2.1.4)先分解成纤维糊精(cellodextrin)，再由 β-葡糖苷酶(3.2.1.21)分解成葡萄糖，也可以由基因(3.2.1.91)分解成纤维二糖(cellobiose)，最终分解成葡萄糖；纤维素也可以直接由基因(3.2.1.91)或者内切葡聚糖酶(3.2.1.4)分解成纤维二糖，之后再降解成单糖。

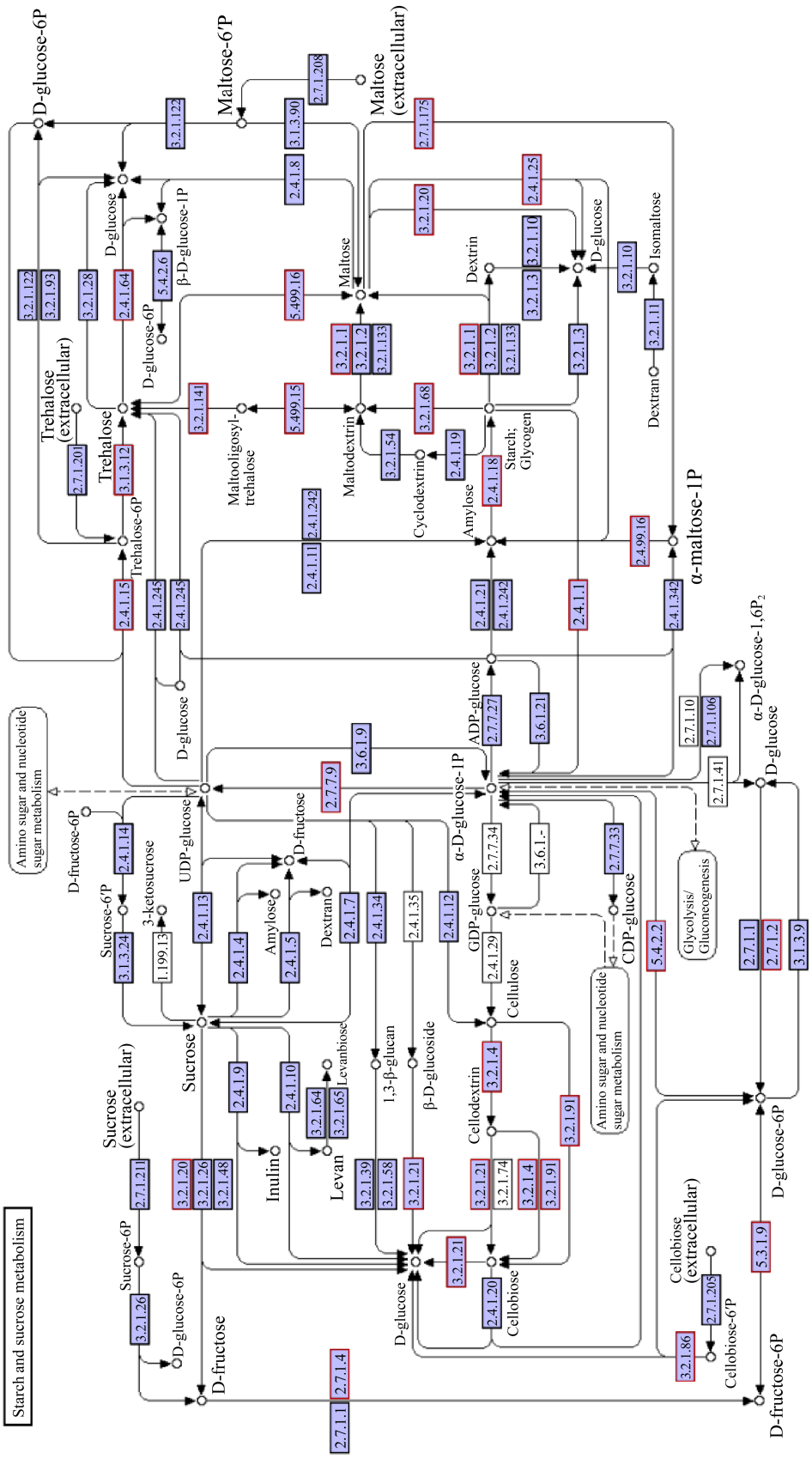

图 4 菌株Lb1的KEGG通路

Figure 4 KEGG pathway of strain Lb1

如表3所示，与产纤维素酶有关的基因有3个，其中有两个基因已经被命名为 *bg1B* 和 *cbhA*，本研究选取另外一个没有被命名的且标识为 5676 的基因进行克隆并使其在大肠杆菌中得到表达。

2.4 纤维素酶表达载体的构建

通过构建 pETDuet-1 纤维素酶重组表达载体 pETDuet-1-5676，转化到大肠杆菌 DH5α，挑选克隆子在氨苄青霉素抗性培养基培养过夜，抽提质粒酶切验证结果如图 5 所示。重组质粒经过 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切后，经 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示得到两条片段大约为 5 366 bp 和 1 044 bp，通过对重组表达质粒测序，验证连接到载体的基因与目的基因一致，说明重组表达载体构建成功。

2.5 纤维素酶表达菌株的构建

将构建好的纤维素表达载体转入 BL21(DE3)，得到表达菌株 BL21(5676)，将空质粒 pETDuet-1 转入 BL21(DE3)得到对照菌株 BL21(pETDuet-1)，经液体培养抽提质粒酶切验证，结果如图 6 所示，抽提重组质粒后测序，目的片段与目的基因一致，表明纤维素酶表达菌种构建成功。

表 3 与产纤维素酶有关的基因

Table 3 Genes involved in cellulase production

基因 Gene	基因名称 Gene name	基因长度 Geng long (bp)	基因标识 Gene ID	注释 Defination	与基因 5676 相似度 Similar to gene 5676 (%)
3.2.1.4	–	1 044	Gene5676	Engoglucanase	100.00
3.2.1.21	*bg1B*	1 359	Gene0220	Beta-glucosidase	48.09
3.2.1.91	*cbhA*	1 341	Gene1760	Cellose 1,4-beta-cellobiosidase	46.97

注：–：未命名的基因名.

Note: –: The name of the unnamed gene.

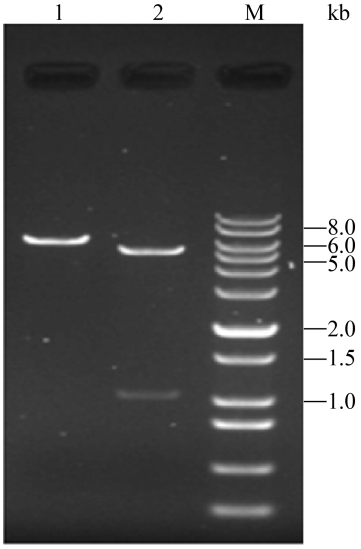

图 5 重组表达质粒 pETDuet-1-5676 酶切验证

Figure 5 Restriction analysis of expression plasmid pETDuet-1-5676

注：1：重组质粒；2：经 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切后的重组质粒；M：1 kb plus DNA ladder.

Note: 1: Recombinant plasmid; 2: Recombinant plasmid digested by *Nde* I and *Kpn* I; M: 1 kb plus DNA ladder.

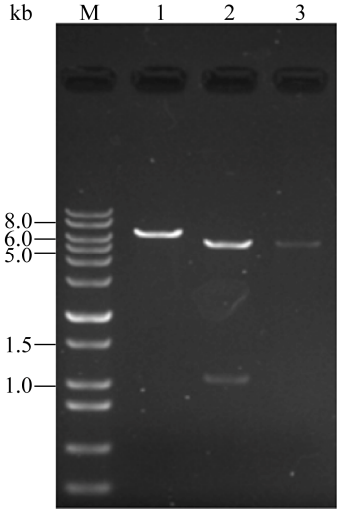

图 6 表达菌株抽提重组质粒酶切验证

Figure 6 Restriction analysis of expression vector in expression of strain

注：M：1 kb plus DNA ladder；1：经单酶切后的重组质粒；2：经 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切后的重组质粒；3：经单酶切后的空质粒.

Note：M: 1 kb plus DNA ladder; 1: Recombinant plasmid digested by *Nde* I and *Kpn* I; 2: Recombinant plasmid digested by *Nde* I; 3: Empty plasmid digested by *Nde* I.

2.6 表达菌株纤维素酶活性的测定

配制浓度范围在 0−1.6 mg/mL 的葡萄糖标准液，加入 DNS 试剂充分混匀后沸水浴 10 min，用酶标仪测定其在 540 nm 下的吸光值制作标准曲线，根据标准曲线计算线性回归方程为 y=2.150x−0.057，相关系数 R^2=0.972 13。分别取表达菌株发酵液和空载菌株发酵液加入到 CMC 缓冲液中，使用 DNS 终止法测定发酵液酶活性，实验组和对照组做 3 个平行重复，取平均值，结果如图 7 所示。

可以看到对于纤维素降解生成葡萄糖，表达菌株相较于空载菌株有较为明显(P<0.001)的促进纤维素生成葡萄糖的作用，因此可以判断出表达菌株生成有纤维素酶。

3 讨论

目前所发现和研究的降解纤维素的微生物主要为真菌，真菌产纤维素酶较细菌活性高，但发酵过程不易控制且发酵时间过长，所以克隆真菌中产纤维素酶基因使其在原核生物如大肠杆菌中进行表达也是热点研究[24-26]。近年来有学者对真菌-细菌联合使用降解纤维素生成乳酸进行初步研究[27]。本研究分离筛选出一株具有降解纤维素作用的放线菌，并将纤维素酶合成基因在大肠杆菌中表达。对于控制生成纤维素酶的基因的研究主要在于基因 *bg1B* 和基因 *cbhA*，本研究首次验证了基因 5676 产纤维素酶的功能并使其在细菌中表达，为微生物降解纤维素的理论和应用提供新的渠道。

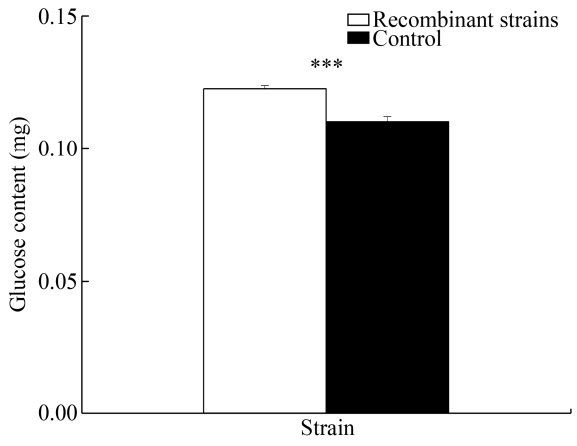

图 7 重组菌株的纤维素酶活性

Figure 7 Cellulase activity of recombinant strain

注：所有的误差棒代表 3 个生物学重复. ***：P<0.001.

Note: All error bars indicate the SE of the three biological repeats. ***: P<0.001.

4 结论

本研究首先筛选分离出一株具有降解纤维素功能的菌株 Lb1，鉴定证实属于链霉菌属，命名为 *Streptomyces* sp. Lb1。通过对 Lb1 的全基因组测序分析，发现其有 3 个与纤维素酶表达相关的基因，选取基因 5676，构建出纤维素酶表达载体，实现了纤维素酶在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达。通过对表达菌株发酵液降解纤维素并对其产物葡萄糖进行测定，其降解纤维素的能力要明显高于空质粒菌株发酵液。未来对其的后续研究可重点放在发酵工艺的优化，使得纤维素酶在菌株中得到更高量的表达，为其在工业中的应用打下良好的基础。

REFERENCES

[1] Gilbert HJ. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 444-455

[2] Payne CM, Knott BC, Mayes HB, et al. Fungal cellulases[J]. Chemical Reviews, 2015, 115(3): 1308-1448

[3] Ang SK, Shaza EM, Adibah Y, et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(9): 1293-1302

[4] Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 27(2/3): 175-185

[5] Zhang XH, Hong CL, Zhu FX, et al. Current situation and prospect of utilization of agricultural waste resources[J]. Modern Agricultural Technology, 2013(20): 209,218 (in Chinese)
张俙何, 洪春来, 朱凤香, 等. 农业废弃物资源化利用现状与前景展望[J]. 现代农业科技, 2013(20): 209,218

[6] Ma H, Liu WW, Chen X, et al. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment[J].

Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1279-1284

[7] Sun JS, Su DH, Liu L. Pretreatment technology of corn Stover for ethanol production[J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(7): 1122-1128 (in Chinese)
孙君社, 苏东海, 刘莉. 秸秆生产乙醇预处理关键技术[J]. 化学进展, 2007, 19(7): 1122-1128

[8] Annamalai N, Rajeswari MV, Elayaraja S, et al. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(1): 409-415

[9] Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 452-481

[10] Zheng W, Zheng Q, Xue YY, et al. Influence of rice straw polyphenols on cellulase production by *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(6): 731-738

[11] Libardi N, Soccol CR, Góes-Neto A, et al. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*[J]. Process Biochemistry, 2017, 57: 190-199

[12] Gu FY, Chen CY, Shi JJ, et al. Advances in cellulase and its development tendency[J]. Journal of Microbiology, 2008, 28(1): 83-87 (in Chinese)
顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83-87

[13] Dong XQ, Yang JS, Zhu N, et al. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 443-451

[14] Chen MH, Sheu SY, Chen CA, et al. *Corallomonas stylophorae* gen. nov., sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the reef-building coral *Stylophora pistillata*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(3): 982-988

[15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599

[16] Ng PC, Kirkness EF. Whole genome sequencing[A]//Barnes MR, Breen G. Genetic Variation: Methods and Protocols[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010: 215-226

[17] Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): 2607-2618

[18] Claverie JM, Bougueleret L. Heuristic informational analysis of sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(1): 179-196

[19] Yun CH, Bae CS, Ahn T. Transformation of *Escherichia coli* and protein expression using lipoplex mimicry[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 127: 68-72

[20] Wood TM, Bhat KM. Methods for measuring cellulase activities[J]. Methods in Enzymology, 1988, 160: 87-112

[21] Eveleigh DE, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulase[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2: 21

[22] Fu L, Ding YF, Zhang C. Studies on methods for determination of cellulase activity[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2000, 23(2): 45-48 (in Chinese)
傅力, 丁友昉, 张篪. 纤维素酶测定方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(2): 45-48

[23] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. Journal of the American Chemical Society, 1934, 56(3): 658-666

[24] Zhang CF, Gu WJ, Peng KF, et al. Present situation of research on microbial cellulase[J]. China Journal of Bioinformatics, 2007, 5(1): 34-36 (in Chinese)
张传富, 顾文杰, 彭科峰, 等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. 生物信息学, 2007, 5(1): 34-36

[25] Lin MI, Nagata T, Katahira M. High yield production of fungal manganese peroxidases by *E. coli* through soluble expression, and examination of the activities[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 145: 45-52

[26] Bai HZ, Zi H, Huang YQ, et al. Catalytic properties of carboxymethyl cellulase produced from newly isolated novel Fungus *Penicillium ochrochloron* ZH1 in submerged fermentation[J]. Catalysis Letters, 2017, 147(8): 2013-2022

[27] Shahab RL, Luterbacher JS, Brethauer S, et al. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a synthetic fungal-bacterial consortium[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(5): 1207-1215