

竹虫肠道微生物源纤维素酶基因在运动发酵单胞菌中的异源表达

谭琼^{1,2}, 吴波¹, 何燕^{1,2}, 夏薇³, 胡国全^{1,4*}, 何明雄^{1,3,4}, 王彦伟^{1,4*}

(1. 农业农村部成都沼气科学研究所, 生物质能技术研究中心, 成都 610041; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 成都理工大学, 成都 610041; 4. 农业农村部农村可再生能源开发与利用重点实验室, 成都 610041)

摘要: 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*, *Z. mobilis*) 是生产燃料乙醇的传统优势菌株, 也是秸秆燃料乙醇研究方向的热点。秸秆为底物具有难降解性的特性, 在实际生产应用过程中往往需要额外投加酶制剂, 导致菌株发酵效率降低, 发酵成本增高。为缓解这一问题, 通过引入外源纤维素酶基因, 在 *Z. mobilis* 内构建纤维素酶的分泌途径, 让发酵菌株能够水解利用纤维素。研究利用竹虫肠道内微生物含有丰富的纤维素酶基因, 连接到质粒转化菌株后并检测其在大肠杆菌和 *Z. mobilis* 的异源表达。结果显示, 研究构建了 21 株重组菌 ZMS912, 胞外酶活显示, ZMS912-GH44 酶活最高为 192.56 U·mL⁻¹, ZMS912-GH44C 酶活为 139.19 U·mL⁻¹, ZMS912-GH28 为 138.7 U·mL⁻¹, 分别比出发菌株提高了 11 倍、7.7 倍和 7.6 倍。在菌株内构建分泌纤维素酶途径以降低生产中加酶量是一个可行的降低成本的方法。

关键词: 运动发酵单胞菌; 纤维素酶基因; 信号肽; 竹虫; 酶活

中图分类号: S216.4; X712 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1166(2023)05-0024-10

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.20230912

Heterologous Expression of Cellulase Gene from the Gut of *Omphisca fuscidentalis* in *Zymomonas mobilis* / TAN Qiong^{1,2}, WU Bo¹, HE Yan^{1,2}, XIA Wei³, HU Guoquan^{1,4*}, HE Mingxiong^{1,3,4}, WANG Yanwei^{1,4*} / (1. Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Biomass Energy Technology Research Center, Chengdu 610041, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Chengdu University of Technology, Chengdu 610041, China; 4. Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China)

Abstract: *Zymomonas mobilis* has been widely used in the research of straw fuel ethanol because of dominant strain for fuel ethanol production. However, it will lead to high production costs in the actual production application process, since cellulose is difficult to degrade and additional enzyme preparations are required. In this study, a secretion pathway for cellulase production was constructed in the fermentation strain to alleviate the cost pressure in the production process, and the microorganisms in the gut of *Omphisca fuscidentalis* contain abundant cellulase genes, which can provide the source of enzyme genes for the transformation of strains. The microbial-derived cellulase genes of bamboo worms were analyzed by bioinformatics. Using *ZM*'s own promoter terminator and signal peptide, the gene expression box was connected and shuttle plasmid was constructed to express heterologous genes in *E. coli* and *Z. mobilis*. The results showed that the subcellular localization of 6 foreign genes showed that GH5 was an intracellular protein. GH6, GH10, GH26, GH28 and GH44 are secreted proteins. Extracellular enzyme activity showed that the highest enzyme activity of ZMS912-GH44 was 192.56 U·mL⁻¹, that of ZMS912-GH44C was 139.19 U·mL⁻¹ and that of ZMS912-GH28 was 138.7 U·mL⁻¹. Constructing cellulase secretion pathway in strain to reduce the amount of enzyme added in production is a feasible method to reduce cost. *Z. mobilis* has the potential to construct CBP strains and secrete cellulose.

Key words: *Zymomonas mobilis*; cellulase gene; signal peptide; *Omphisca fuscidentalis*; enzyme activity

收稿日期: 2023-08-13

项目来源: 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2016-BIOMA); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610012021001_03202); 四川省科技计划项目(2022YFS0508); 青海科技厅科技成果转化专项项目(2022-NK-124); 成都市科技计划项目(2022-YF05-00753-SN); 国家成都农业科技中心地方财政专项(NASC2023TD06)。

作者简介: 谭琼(1993-), 女, 土家族, 重庆石柱人, 硕士, 主要研究方向为农业废弃物资源化利用, E-mail: 1207575682@qq.com

通信作者: 胡国全, E-mail: huguoguan@caas.com; 王彦伟, E-mail: wangyanwei@caas.cn

运动发酵单胞菌利用 Entner-Doudoroff (ED) 代谢途径将葡萄糖和果糖转化为乙醇, 能够达到接近最大理论产量^[1-2], 同时 *Z. mobilis* 生长的营养需求相对简单, 能够耐受低 pH 值和水解木质纤维素生物物质产生的抑制物^[3,4], 这些优点使得 *Z. mobilis* 在工业化生产领域广泛的应用。但由于其底物利用范围狭窄, 只能利用葡萄糖和果糖等简单糖类, 几乎不能直接利用纤维素为底物生产乙醇, 在实际生产过程中需要依靠额外的添加酶制剂来完成发酵。若能利用基因工程的方法使运动发酵单胞菌直接以纤维素为底物生产乙醇, 将在一定程度上减少 20% ~ 30% 生产成本。

目前已公布的基因运动发酵单胞菌只含有 β -1,4-内切葡聚糖酶(由 ZMO1086 编码)的酶活性, *CelA* (ZMO1086) 是 *Z. mobilis* 已发表基因组中唯一发现的纤维素分解基因, 酶活很微弱^[5-6]。利用运动发酵单胞菌的烯醇酶基因的 *Peno* 启动子对 ZMO1086 进行表达, 仅有 10% 的蛋白能够分泌到胞外。将 ZMO1086 的信号肽序列 SP1086 融合外源 β -葡糖苷酶基因 *bglB* 尝试分泌表达, 结果表明内源性信号肽能够有效促进纤维素酶的分泌表达^[7]。一些源自运动发酵单胞菌的膜结合蛋白如碱性磷酸酶 *PhoA*^[8] 和 *PhoD*^[9-10] 的信号肽可以在大肠杆菌中引导分泌^[11]。

竹虫 (*Omphisa fuscidentalis* Hampson), 寄生在竹腔体内, 以富含纤维素的植物性物质为食^[12], 可将纤维素水解产生的葡萄糖作为生长发育的能源物

质。竹虫肠道菌群和大熊猫、食木高等白蚁、牛瘤胃、塔马尔沙袋鼠肠道的微生物宏基因组相比, GH5、GH10 和 GH28 是以上样品共有的糖苷水解酶家族, 推测可能与以上几个物种都以富含纤维素植物为食物来源的特殊生活方式有关^[13]。竹虫肠道内具有丰富的纤维素降解菌资源, 在不同水平上菌群的分布与白蚁和大熊猫相似。竹虫肠道微生物的糖苷水解酶具有丰富的多样性, 为基因选取提供了多样化的选择。目前尚无研究利用竹虫肠道纤维素酶基因库作为构建异源表达的候选基因库。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、培养基

本研究所用菌株和质粒见表 1, 所用引物见表 2, 引物均由成都擎科生物科技有限公司合成。

LB 培养基: Tryptone 10 g·L⁻¹, Yeast Extract 5 g·L⁻¹, NaCl 5 g·L⁻¹, 调 pH 值至 7.0, LB 固体培养基需另加 1.5% (w/v) 琼脂; 用于重组菌的培养基需添加壮观霉素, 工作浓度为 100 ug·mL⁻¹; LB-CMC 培养基在 LB 培养基基础上添加 0.12% (w/v) CMC。

RM 培养基^[14]: Yeast Extract 10 g·L⁻¹, Glucose 20 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1 g·L⁻¹, RM 固体培养基需另加 1.5% (w/v) 琼脂; 用于 ZMS912 重组菌的培养基需添加壮观霉素, 工作浓度为 100 ug·mL⁻¹; RM-CMC 培养基^[15] 在 RM 培养基基础上添加 0.12% (w/v) CMC。

表 1 本研究所用菌株和质粒

菌株和质粒	描述	备注
<i>E. coli</i> DH5 α	克隆菌株	实验室保存
<i>Z. mobilis</i> ZM4	野生型, ATCC31821	购自中国菌种保藏中心 (CICC)
ZMS912	<i>Z. mobilis</i> 突变菌株	实验室构建
pEZ15 Asp	克隆载体	实验室保存
pP-GH5-T	GH5 与 <i>pdc</i> 启动子 (<i>Ppdc</i>) 和终止子 (<i>Tpdc</i>) 融合	以下为本研究构建
pP-GH6-T	GH6 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i> 融合	—
pP-GH10-T	GH10 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i> 融合	—
pP-GH26-T	GH26 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i> 融合	—
pP-GH28-T	GH28 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i> 融合	—
pP-GH44-T	GH44 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i> 融合	—
pP-C-GH5-T	融合 <i>phoC</i> 信号肽 (SP)、GH5 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i>	—
pP-C-GH6-T	融合 <i>phoC</i> SP、GH6 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i>	—
pP-C-GH10-T	融合 <i>phoC</i> SP、GH10 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i>	—
pP-C-GH26-T	融合 <i>phoC</i> SP、GH26 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i>	—
pP-C-GH28-T	融合 <i>phoC</i> SP、GH28 与 <i>Ppdc</i> 、 <i>Tpdc</i>	—

表3 序列数据分析工具

软件名称	应用说明	网址
ORF Finder	开放阅读框分析	http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html
ExPASy Translate	蛋白翻译工具	https://web.expasy.org/translate/#opennewwindow
ExPASy ProtParam	理化性质	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy ProtScale	亲水性和疏水性	https://web.expasy.org/protscale/
TMHMM	跨膜结构分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
HMMTOP	跨膜结构分析	http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html
SignalP server	预测信号肽	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
PredictProtein	预测亚细胞定位	https://www.predictprotein.org/home
PredictProtein	二硫键	https://www.predictprotein.org/home
SOPMA	预测二级结构	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
psipred	预测二级结构	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
CDD	预测结构域	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd
Swiss-model	预测三级结构	https://swissmodel.expasy.org/

连接,用于转化 ZM。

以 ZM 基因组为模板,扩增 pEZ15Asp 质粒片段、Ppdc 片段、Tpdc 片段、phoC 片段、phoD 片段。其中,pEZ15Asp 扩增条件为:94℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,68℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 1 min,35 个循环,68℃ 延伸 7 min。Ppdc 片段和 Tpdc 片段退火温度为 53℃;phoC 片段退火温度为 60℃;phoD 片段退火温度为 61℃。经琼脂糖凝胶电泳检测、凝胶回收试剂盒纯化,获得线性 DNA 片段。

1.2.3 pET-28a (+)、pEZ15Asp 重组质粒构建

用质粒提取试剂盒提取 pET-28a (+) 质粒,经电泳和单酶切验证后,检测质粒浓度。GH6 选择 NotI 和 SalI 两个酶切位点,用 NotI 和 SalI 酶切 pET-28a (+),酶切体系:2 μL 10 × Fast Digest Green buffer,10 μL pET-28a (+),1 μL NotI,1 μL SalI,6 μL ddH₂O,于 37℃ 孵育 20 min,电泳检测后用胶回收试剂盒进行纯化回收,获得 pET-28a (+)/NotI + SalI。其余 GH 基因用 BamHI 和 SacI 双酶切质粒 pET-28a (+),酶切体系为 20 μL:2 μL 10 × Fast Digest Green buffer,10 μL pET-28a (+),1 μL BamHI,1 μL SacI,6 μL ddH₂O,于 37℃ 孵育 20 min,电泳检测后用胶回收试剂盒进行纯化回收,获得 pET-28a (+)/BamHI + SacI。然后分别用 T4 DNA 连接酶连接。

利用 Gibson Assembly 连接方法^[16]将 Ppdc 片段、Tpdc 片段、GH 片段、phoC/D 信号肽 4 个片段连接到载体上;分别检测 DNA 片段浓度,根据片段和

浓度计算皮摩尔数,计算公式为 pmols = (weight in ng) × 1,000 / (base pairs × 650 daltons),连接 4 ~ 6 个片段时,DNA 片段需要 0.2 ~ 1.0 pmols,将 phoC 和 phoD 分泌信号的基因片段分别组装在 GH 基因的上游,在信号肽 SP 和基因 GH 融合片段的上游连接 Ppdc 启动子,在融合片段的下游连接 Tpdc 终止子,构成一个基因表达盒,构建的质粒示意图如图 1 所示。连接体系为 20 μL:2 × Gibson Assembly Master Mix 10 μL,Ppdc 片段、phoC/D 片段、GH 片段、Tpdc 片段和 pEZ15Asp 线性载体的摩尔比为 3 ~ 10:1,无菌 ddH₂O 补足体系至 20 μL,50℃ 孵育 60 min,5 个含有同源臂的片段在吉布森连接酶的作用下,基于碱基互补配对原则配对连接。孵育完后,连接产物用无菌 ddH₂O 稀释 4 倍,取 5 μL 稀释物加入到 50 μL *E. coli* DH5α 感受态细胞中,轻柔混匀后冰浴 30 min,42℃ 热激 90 s,冰浴 2 min,加入 950 μL LB 液体培养基,混匀后于 200 rpm,37℃ 恢复培养 1 h。将菌液 4000 rpm,4℃ 离心 3 min,重悬菌体,吸取 100 μL 菌液涂布于含壮观霉素的 LB 平板,37℃ 倒置培养过夜。挑取阳性克隆至含壮观霉素的 LB 液体培养基培养,用基因表达盒的上下游引物 Ppdc-F 和 Tpdc -R 进行 PCR,电泳检测目的条带,将初步验证正确的 PCR 产物送至成都擎科生物科技有限公司测序。

1.2.4 重组质粒 pET-28a (+) 转化 *E. coli* BL21 (DE3)、重组质粒 pEZ15Asp 转化 ZMS912

分别取连接产物以 10% 比例加入 50 μL *E. coli*

BL21(DE3)感受态细胞,缓慢混匀后冰浴 30 min, 42 °C热激 45 sec,冰浴 2 min,加入 950 μL LB 液体培养基,混匀后于 200 rpm,37°C恢复培养 1 h。重悬菌体,吸取 100 μL 菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板,37°C恒温培养箱中倒置培养过夜。待平板上长出单克隆菌落,进行质粒抽提鉴定:挑取单克隆菌落接种至 3 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37°C,200 rpm 培养过夜至菌体明显浑浊,参照质粒提取试剂盒的方法提取质粒并做酶切验证。同时做菌液 PCR 鉴定,检测重组菌是否含有目的基因,将初步验证成功的 PCR 产物送至成都擎科生物科技有限公司测序。将测序结果与构建的重组质粒序列进行比对,显示连接成功的将对应的重组大肠杆菌菌液与 60% (v/v) 灭菌甘油按 1:1 比例混合,于 -80°C 保存。

将成功转入 *E. coli* DH5α 的重组质粒做扩大培养,用中提试剂盒提取重组质粒,电泳检测后再测质粒浓度。为进一步提高生产性能,抵御不良生产环境,本研究采用了课题组构建的运动发酵单胞菌的突变菌株 ZMS912,该突变菌株具有良好的耐受不利环境且对环境适应性较强,乙醇生产速率比 ZM4 高 31%,具有较高的乙醇产率和稳定的发酵性能^[17]。首先制备 ZMS912 感受态细胞^[18],加入电转化杯里重组质粒按 10% 比例混合 50 μL ZMS912 感受态细胞,通过电转化方法将重组质粒导入目的菌株,电转化条件:电压 1600 V,电容 25 μF,电阻 200 Ω,电转化杯厚度选择 1 mm。待含壮观霉素抗性的平板长出菌落后,随机挑取多个单克隆菌落接种至 5 mL 含壮观霉素抗性的 RM 液体培养基,30 °C 过夜培养后做菌液 PCR 验证。若目的条带与预期大小符合,对与预期符合的菌液用 60% 灭菌甘油按 1:1 比例进

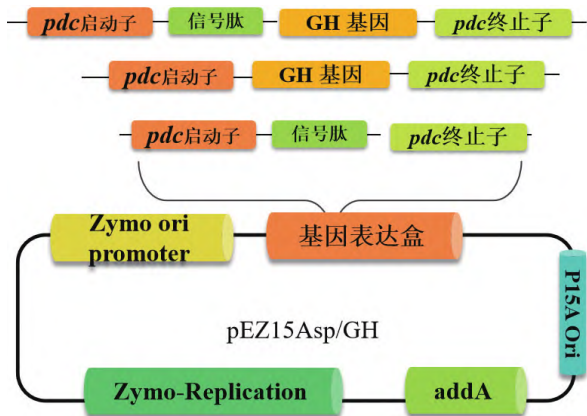


图 1 基因表达盒构建示意图

行保种,混匀后于 -80 °C 保存。

1.2.5 异源基因表达检测

1.2.5.1 刚果红染色水解圈

在 RM-CMC(0.1% CMC)平板上,取 1 μL 菌液点板,30°C 培养 3 d,刚果红染液染色 30 min,弃去染液,加入 5 mL 1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液^[19],洗涤 30 min,观察培养基上透明水解圈直径,初步检测重组菌的纤维素水解能力。

1.2.5.2 DNS 法酶活测定

重组菌株培养 30 °C 静置培养 3 d,菌液离心收集上清液,同时保留菌体备提取胞内蛋白。用蛋白浓缩柱浓缩蛋白,在浓缩柱中先用 ddH₂O 预清洗,加 500 μL ddH₂O,15000 × g 离心至产生超过 400 μL 滤液,倒出滤液和滞留物,浓缩柱预处理完成,加入样品 100 ~ 500 μL,15000 × g 离心至产生需要的浓度,用移液枪吸出柱子内浓缩的滞留物至 1.5 mL 离心管,为胞外蛋白。上述菌体用细胞裂解液 Bug Buster Mix 在室温下低速振荡孵育,离心 20 min,去除破碎残留物,收集上清胞内粗酶液。实验组和对照组设 3 个重复。

首先建立葡萄糖标准曲线,称取恒重葡萄糖配置 2 mL 葡萄糖标准溶液,浓度分别为 0 mg·mL⁻¹, 0.02 mg·mL⁻¹, 0.04 mg·mL⁻¹, 0.08 mg·mL⁻¹, 0.1 mg·mL⁻¹, 0.12 mg·mL⁻¹,加入 4 mL DNS 显色剂,沸水浴 5 min,冰水冷却后,ddH₂O 定容至 10 mL。以 0 号管为空白对照,用分光光度计测定 540 nm 处的吸光度值。以葡萄糖浓度 (mg·mL⁻¹) 为横坐标 x,吸光度值为纵坐标 y,绘制葡萄糖标准曲线。

在 10 mL 具塞比色管中加入 1 mL 1% CMC-Na 溶液,1 mL HAC-NaAC (pH 值 4.8),0.5 mL 粗酶液,50°C 加热 30 min,冰上冷却至室温,加入 2 mL DNS 试剂,沸水浴中煮沸 10 min,冰上冷却,加 ddH₂O 定容至 10 mL,对照组在煮沸前加入 DNS 试剂,于 540 nm 处测定吸光度。ΔA = A_s-A_{ck},根据 ΔA 从标准曲线上计算葡萄糖含量 P,再根据公式 (1) 计算酶活,一个酶活力 U 定义为:1 min 催化底物释放 1 g·L⁻¹ 葡萄糖所需的酶量。酶活力计算公式如下:

$$\text{酶活力}(u \cdot mL^{-1}) = P \times K \times 1000 / (V \times t) \quad (1)$$

式中:P 为测得吸光度值在标曲上对应的葡萄糖量,mg; K 为酶液稀释倍数; V 为取的酶液量, mL; t 为反应时间, min。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶基因序列分析

对竹虫肠道纤维素酶基因编码的蛋白进行理化性质分析结果表明:6个GH基因均为亲水性蛋白,亚细胞定位显示GH5为胞内蛋白,其余都为分泌型蛋白;GH10、GH26和GH44为稳定蛋白;信号肽预测GH44在1~20位氨基酸位置处含有信号肽序列,且含有与蛋白高级结构活性有关的二硫键,推测

GH44是分泌蛋白且具有蛋白活性。GH5和GH44具有相似的三级结构,且都含有内切葡聚糖酶活性,与运动发酵单胞菌自身的纤维素酶种类相同。对竹虫肠道微生物源编码纤维素酶的基因序列进行开放阅读框分析,发现除了GH53的序列不含开放阅读框外,另外6个基因序列分别包含720 bp、285 bp、483 bp、300 bp、440 bp和430 bp的开放阅读框。蛋白质的负电荷氨基酸残基总数、正电荷氨基酸残基总数和稳定系数如下表4所示。

表4 蛋白质理化性质

名称	氨基酸个数	相对分子质量	等电点	分子式	脂肪系数	亲水性平均值	半衰期
GH5	241	23.75kDa	11.59	C ₁₀₃₂ H ₁₅₉₁ N ₃₅₅ O ₂₉₅ S ₂	40.41	-0.687	>10 hours
GH6	94	8.35kDa	7.92	C ₃₅₆ H ₅₃₉ N ₁₀₇ O ₁₂₁ S ₃	40.53	-0.100	>10 hours
GH10	160	15.44kDa	6.09	C ₆₆₇ H ₁₀₁₉ N ₁₉₉ O ₂₁₄ S ₆	29.94	-0.886	>10 hours
GH26	99	9.68kDa	5.27	C ₄₁₅ H ₆₅₈ N ₁₂₈ O ₁₃₄ S ₃	56.16	-0.686	>10 hours
GH28	139	15.86kDa	4.92	C ₇₁₁ H ₁₁₁₁ N ₁₇₇ O ₂₁₇ S ₈	83.45	-0.344	>10 hours
GH44	104	11.13kDa	10.45	C ₅₀₆ H ₇₉₉ N ₁₃₁ O ₁₃₉ S ₆	79.62	0.154	>10 hours

2.2 扩增目的基因、构建重组质粒、转化

根据电泳图显示扩增出的条带符合预期大小,表明成功从竹虫肠道宏基因组中获得目的基因片段,即GH5基因720 bp片段、GH6基因285 bp片段、GH10基因483 bp片段、GH26基因300 bp片段、GH28基因440 bp片段、GH44基因430 bp片段。电泳结果如图2所示。

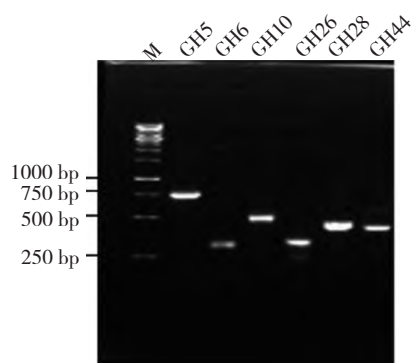


图2 PCR扩增竹虫肠道六个纤维素酶基因

启动子和终止子条带为300 bp,pEZ15Asp线性质粒片段为3 kb,条带与预期大小符合,见图3。

重组质粒转化至目的菌株后,挑取平板上长出的单克隆菌落,分别用6个目标基因的上下游引物进行菌液PCR扩增,电泳结果显示获得与预期大小一致的片段。经公司测序后,利用DNAMAN软件将测序结果与构建的重组质粒序列进行比对,结果显

示重组质粒连接成功,表明纤维素酶基因成功转入目的菌株。

pEZ15Asp(3kb)作为外源基因的载体,是一种可以在大肠杆菌和*Z. mobilis*中都进行复制的质粒,含有该质粒的大肠杆菌和*Z. mobilis*表现出壮观霉素抗性(Spe^r)。pEZ15Asp通过电穿孔的方法实现向*Z. mobilis*的转化。

经PCR反应后获得重组片段Ppdc-SP-GH-Tpdc;目的片段P-C-GH5-T长度为1407 bp,目的片段P-C-GH6-T长度为972 bp,目的片段P-C-GH10-T

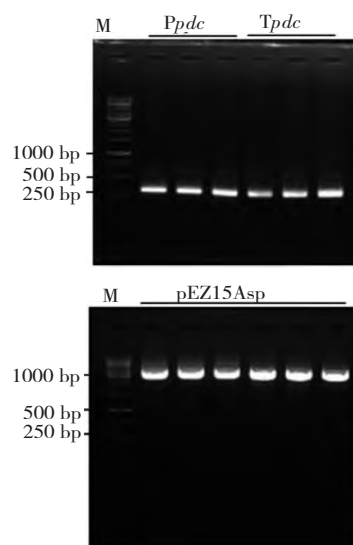


图3 PCR扩增启动子、终止子和质粒电泳图

长度为 1170 bp,目的片段 P-C-GH26-T 长度为 987 bp,目的片段 P-C-GH28-T 长度为 1127 bp,目的片段 P-C-GH44-T 长度为 1117 bp,目的片段 P-D-GH5-T 长度为 1419 bp,目的片段 P-D-GH6-T 长度为 984 bp,目的片段 P-D-GH10-T 长度为 1182 bp,目的片段 P-D-GH26-T 长度为 999 bp,目的片段 P-D-GH28-T 长度为 1139 bp,目的片段 P-D-GH44-T 长度为 1129 bp,目的片段 P-C-T 长度为 687 bp,目的片段 P-D-T 长度为 699 bp,目的片段 P-GH5-T 长度为 1320 bp,目的片段 P-GH6-T 长度为 885 bp,目的片段 P-GH10-T 长度为 1083 bp,目的片段 P-GH26-T 长度为 900 bp,目的片段 P-GH28-T 长度为 1040 bp,目的片段 P-GH44-T 长度为 1030 bp,获得与预期一致的片段,即成功获得 20 个 ZMS912 重组菌株。为方便表示,ZMS912 重组质粒 pEZ15 Asp 上的片段将启动子“Ppdc”和终止子“Tpdc”省略掉,“phoC”简写为“C”,“phoD”简写为“D”,如 Ppdc-phoC-GH5-Tpdc 简写为 GH5C, Ppdc-phoD-GH5-Tpdc 简写为 GH5D,电泳图谱见图 4,图 4(a)为添加信号肽的重组片段,图 4(b)为未添加信号肽的重组片段。

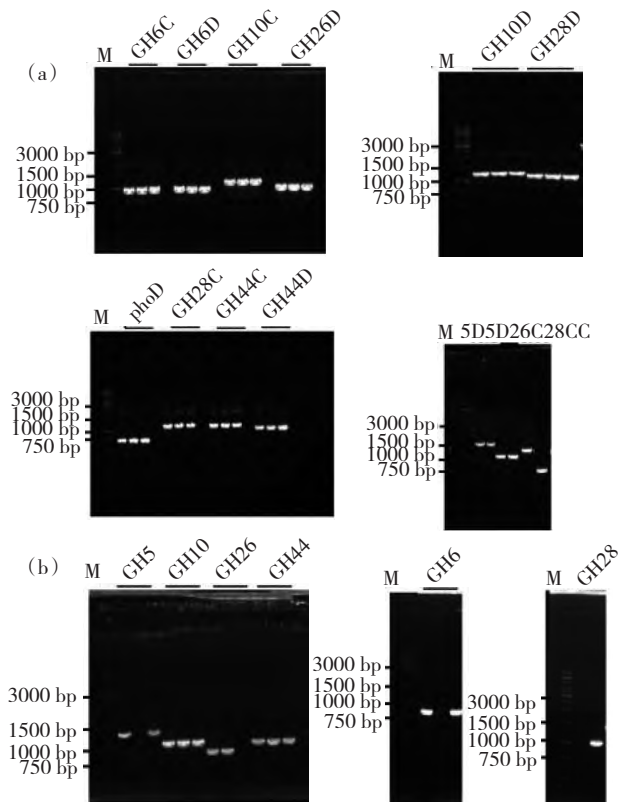


图 4 重组基因片段的 PCR 鉴定电泳图

2.3 重组菌的分泌表达

2.3.1 刚果红染色

重组 *E. coli* 的刚果红染色见图 5,重组菌 *E. coli*-GH6 可见透明水解圈,其次为 *E. coli*-GH28 和 *E. coli*-GH44,而 *E. coli*-GH26、*E. coli*-GH10 和 *E. coli*-GH5 的水解圈透明度较不明显。

重组菌 ZMS912 的刚果红染色见图 6,其中“CK”表示对照菌株 ZMS912,信号肽加基因表示重组菌株,如 ZMS912-phoC-GH5 用“C-GH5”表示,ZMS912-phoD-GH5 用“D-GH5”表示,其余以此类推。为方便对比,用圆圈划出了水解圈的范围。在 RM (CMC) 平板中,D-GH44、D-GH6、GH28 和 D-GH28 产生的水解圈直径最大,其次为 C-GH44、C-GH26,只导入 phoC 信号肽产生的水解圈要比只导入 phoD 信号肽的明显。大部分添加了信号肽重组菌的水解圈直径大于对照 ZMS912 菌株,初步表明信号肽对诱导蛋白的分泌是有效的,推断蛋白能够



图 5 重组大肠杆菌刚果红染色图

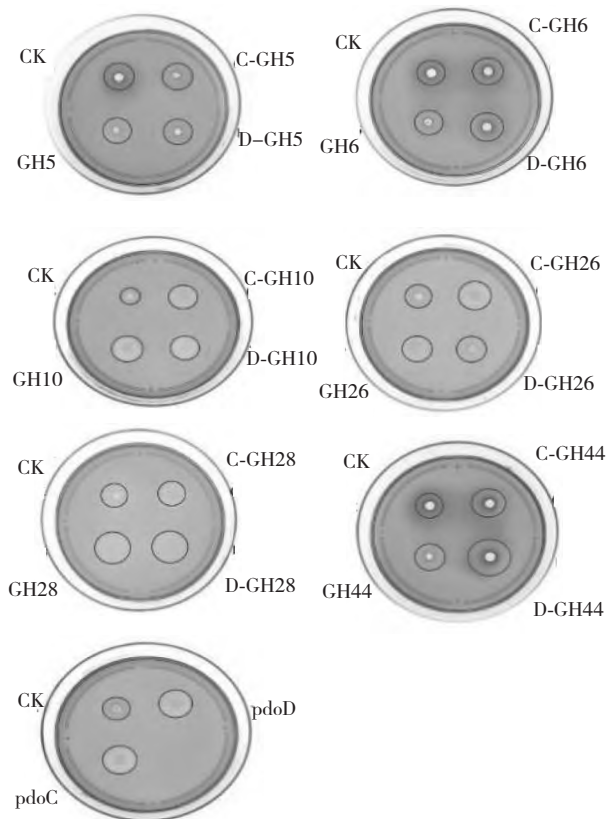


图 6 重组 ZMS912 菌株刚果红染色图

在运动发酵单胞菌中分泌表达。

2.3.2 酶活检测

2.3.2.1 重组大肠杆菌酶活

绘制葡萄糖标准曲线。以 CMC 作为底物,用 DNS 法检测还原糖的产量,从而计算胞内酶活^[20],重组 *E. coli-GH28* 胞内酶活最高为 $12.23 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, *E. coli-GH6* 胞内酶活为 $11.83 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, *E. coli-GH44* 胞内酶活为 $8.97 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, *E. coli-GH10* 胞内酶活为 $8.15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, *E. coli-GH5* 为 $4.89 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, *E. coli-GH26* 胞内酶活为 $4.07 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对照菌株为 $4.35 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 各组间差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.3.2.2 重组 ZMS912 酶活

内切葡聚糖酶活性以 CMC 为底物测定, CMC 降解能反应内切葡聚糖酶的活性, 结果如图 7~8。

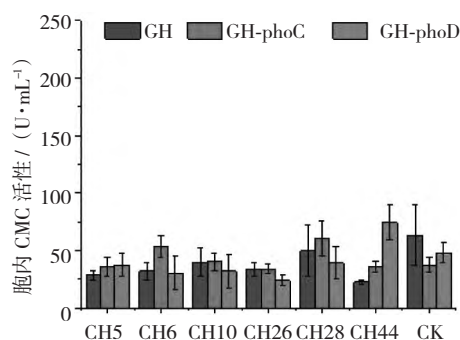


图7 重组 ZMS912 的胞内酶活检测

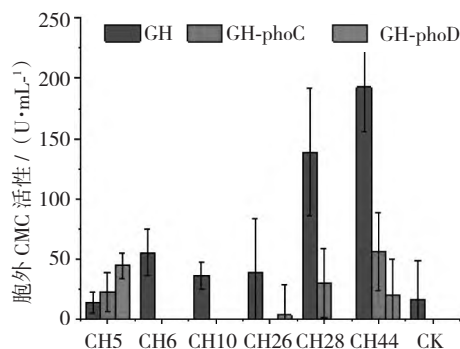


图8 重组 ZMS912 的胞外酶活检测

胞内酶活(见图7)最高的是 ZMS912-GH44D 胞内酶活为 $74.65 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与 ZMS912-GH44、ZMS912-GH44C 在 $p < 0.05$ 时具有显著性差异, ZMS912-GH44D 与 ZMS912-GH6D、ZMS912-GH26D、ZMS912-GH28D 具有显著性差异。

胞外酶活(见图8)最高的是 ZMS912-GH44 为 $192.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相比对照酶活提高了 11 倍, 胞外与总酶活占比 95.16%, ZMS912-GH44 与 ZMS912-GH44C、ZMS912-GH44D 在 $p < 0.05$ 时具有显著性

差异, ZMS912-GH44C 为 $139.19 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相比对照酶活提高了 7.67 倍, 胞外与总酶活占比 79.5%, 有 79.5% 的蛋白实现了分泌。ZMS912-GH28 为 $138.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相比对照酶活提高了 7.64 倍, 胞外与总酶活占比 73.6%, 与 ZMS912-GH28C 在 $p < 0.05$ 时具有显著性差异。ZMS912-GH5D 为 $137.98 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相比对照酶活提高了 7.59 倍, 胞外与总酶活占比 78.49%、ZMS912-GH28C 为 $122.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胞外与总酶活占比 79.06%, ZMS912-GH5C 为 $119.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胞外与总酶活占比 76.82%、ZMS912-GH44D 为 $95.59 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胞外与总酶活占比 64%。含 GH6、GH10、GH26 的重组菌和 ZMS912 出发菌株在添加了信号肽后, 均未检测到胞外酶活。

3 结论

E. coli/BL21-GH6 重组菌的水解圈最为明显, 推测可能与 *GH6* 含纤维二糖酶有关, 其他水解圈相比对照也较为明显。ZMS912 的出发菌株是 *Z. mobilis* ZM4, 其本身含有内切葡聚糖酶基因, 能够低水平分泌少量的酶且酶具有活性^[21], 在革兰氏阴性菌中, 依赖 SecB(II型)的分泌系统将蛋白质跨膜转运, 所产生的蛋白被 N 端信号肽识别, 并在胞浆周围空间释放形成成熟蛋白, 经过进一步的修饰被 II 型分泌装置转移到外膜^[22], 因此在染色的 RM(CMC)平板上出现少许可见的透明圈。ZMS912-GH44C 为 $139.19 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相比对照酶活提高了 7.67 倍, 胞外与总酶活占比 79.5%, 进一步表明 GH44 编码的纤维素酶很可能是分泌型蛋白, 且含有蛋白活性, 这与 GH44 结构预测的结果相吻合。GH44 基因主要编码内切葡聚糖酶, 使产生的纤维素酶大量分泌到重组菌细胞膜外, 酶活比添加了 ZM 内源性信号肽的酶活高, 推测可能是由于基因本身含有信号肽序列的原因, 提高了分泌表达。GH28 主要编码聚半乳糖醛酸酶, 胞外酶活稍高于添加了 phoC 的胞外酶活, 而添加了 phoD 的重组菌检测不到胞外酶活。GH5 基因主要编码纤维素酶和内切 1,4-葡聚糖酶, 加入信号肽使 GH5 的胞外分泌量得到明显提升, 推测可能是由于 GH5 含有的内切葡聚糖酶和 ZMS912 含有的酶种类相同, 在内源信号肽的作用下, 水解 CMC 的能力得到了提升。在含 GH5 的重组菌中, 添加了信号肽 phoD 的序列比 phoC 的诱导效果要好。结果表明不同的信号肽对不同种类的纤维素酶

的诱导表达效果不同。本研究采用质粒 pEZ15A_{sp} 进行异源表达纤维素酶,尚未采用融合基因组的方法进行试验研究,有研究采用质粒 pHW20a 在运动发酵单胞菌中进行异源表达纤维素酶的研究,比融合蛋白表达策略下的分泌量提高 10%。后续可进行两种表达方式的对比,选取更优分泌表达策略。

参考文献:

- [1] SWINGS J, DE L J, The biology of *Zymomonas*[J]. *Bacteriological Reviews*, 1977,41(1): 1-46.
- [2] 蔺玉萍, 张木清, 陈柏铨. 产乙醇运动发酵单胞菌的研究进展[J]. *微生物学报*, 2005,045(3): 472-477.
- [3] ZHANG M, EDDY C, DEANDA K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanogenic *Zymomonas Mobiles*[J]. *Science*, 1995a,267(5195): 240-243.
- [4] ZHANG M, FRANDEN MA, NEWMAN M, et al. Promising ethanologens for xylose fermentation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995b, 51/52(1): 527-536.
- [5] RAJNISH K N, CHOUDHARY G M K, GUNASEKARAN P. Functional characterization of a putative endoglucanase gene in the genome of *Zymomonas mobilis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008,30: 1461-1467.
- [6] LINGER J G, ADNEY W S, DARZINS A. Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6360-6369. DOI: 10.1128/AEM.00230-10.
- [7] 罗紫臣, 纤维素酶的分泌表达及其在生物炼制中的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [8] APEL A K, ALBERTO S L, ANTONIO R G, et al. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions[J]. *Microbiology*, 2007,153(10): 3527-3537.
- [9] GOMEZ P F, INGRAM L O, Cloning, sequencing and characterization of the alkaline phosphatase gene (*phoD*) from *Zymomonas mobilis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995,125(2-3): 237-245.
- [10] REYES L B, SCOPES R K. The use of multifunctional adsorbents to purify membrane-bound phosphatases from *Zymomonas mobilis*[J]. *Bioprocess Separation*, 1991,2(3): 137-146.
- [11] WIEGERT T, SAHM H, SPRENGER G A. Expression of the *Zymomonas Mobilis gfo* gene for NADP-containing glucose: fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia Coli*-Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004,244(1): 107-112.
- [12] 刘新博. 竹虫(*Omphis fuscidentalis*)体内纤维素酶系的酶学性质及分离纯化的初步研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.
- [13] 刘松. 竹虫(*Omphisa fuscidentalis*)肠道微生物多样性及纤维素酶学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [14] GOODMAN A E, ROGERS P L, SKOTNICKI M L. Minimal medium for isolation of auxotrophic *zymomonas* mutants [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982,44(2): 496-498.
- [15] TODHANAKASEM T, SOWATAD A, KANOKRATANA P, et al. Expression and extracellular secretion of endoglucanase and xylanase by *Zymomonas mobilis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 187(1): 239-252.
- [16] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009 6(5): 343-345.
- [17] DUAN G W, WU B, QIN H, et al. Replacing water and nutrients for ethanol production by ARTP derived biogas slurry tolerant *Zymomonas mobilis* strain[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019,12: 124.
- [18] 吴波. 运动发酵单胞菌的限制修饰系统基因突变及 α -淀粉酶基因的分泌表达[D]. 四川: 四川大学, 2011.
- [19] WOOD P J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 1980, 85(2): 271-287.
- [20] KÖNIG J, GRASSER R, PIKOR H et al. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002,374: 80-87.
- [21] TODHANAKASEM T. Evaluation of cellulase production by *Zymomonas mobilis*[J]. *Bioresources*, 2017,12(1): 1165-1178.
- [22] SANDKVIST M. Biology of type II secretion[J]. *Molecular Microbiology*, 2001,40(2): 271-283.