

β -1,4-葡聚糖内切酶基因在大肠杆菌中分泌表达

李湘玉¹, 刘秦华¹, 李君凤¹, 白晰¹, T. Desta¹,
王思然¹, 董志浩¹, 白云峰², 邵涛^{*1}

(1. 南京农业大学 饲草调制加工与贮藏研究所, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 循环农业研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 采用重叠延伸 PCR 合成技术将乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 分泌蛋白基因序列 *usp45* (81 bp) 和瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) β -1,4-葡聚糖内切酶成熟蛋白序列 *egl3* (657 bp) 连接成融合基因 *usp45-egl3*, 构建了分泌型重组质粒 pMG36e-*usp45-egl3* 及重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3*。分析重组大肠杆菌的表达效果及表达产物降解纤维素的能力。结果表明, 重组大肠杆菌 DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 经 14 h 培养能分泌酶活为 226 mU/mL 的 β -1,4-葡聚糖内切酶, 并有效地降解了羧甲基纤维素钠。其中分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解羧甲基纤维素钠生成还原糖的速率为 2.35 mg/(h·mL)。

关键词: 瑞氏木霉; β -1,4-葡聚糖内切酶; 大肠杆菌; 分泌表达

中图分类号: S 816.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)03-0309-07

Research of β -1,4-endoglucanase Gene Secreting Expression in *Escherichia coli*

LI Xiangyu¹, LIU Qinhua¹, LI Junfeng¹, BAI Xi¹, T. Desta¹, WANG Siran¹,
DONG Zhihao¹, BAI Yunfeng², SHAO Tao^{*1}

(1. Institute of Ensiling and Processing of Grass, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Circular Agriculture Research Center, Jiangsu Province Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study constructed a secretive recombinant plasmid pMG36e-*usp45-egl3* and *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* with a fusion gene *usp45-egl3* connected by the secreted protein gene sequence of *usp45* (81 bp) from *Lactococcus lactis* and the coded mature-protein gene sequence of *egl3* (657 bp) from *Trichoderma reesei* by the method of overlapping extension PCR. After analyzing the expressive effect of recombinant *Escherichia coli* and evaluate the capability of secreted β -1,4-endoglucanase degrading fiber. The results showed that the recombinant *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* could secrete β -1,4-endoglucanase with activity of 226 mU/mL after culture 14 h and effectively degrade sodium carboxymethylcellulose. The rate of β -1,4-endoglucanase

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20130694); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130097120053); 江苏省自主创新项目(CX(15)1003)。

* 通信作者: 邵涛(1963—), 男, 浙江宁波人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事草业科学方面的研究。E-mail: taoshaolan@163.com

引用本文: 李湘玉, 刘秦华, 李君凤, 等. β -1,4-葡聚糖内切酶基因在大肠杆菌中分泌表达[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 309-315.

degrading sodium carboxymethylcellulose into reducing-sugar was 2.35 mg/(h·mL).

Keywords: *Trichoderma reesei*, β -1,4-endoglucanase, *Escherichia coli*, secretion expression

瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)是高效产纤维素酶的真菌^[1],其产生的纤维素酶具有酶系完全、活性高、胞外分泌、便于分离和提纯等优点,被广泛应用于食品、医药、饲料和化工原料等领域^[2]。根据催化反应功能的不同,纤维素酶可分为内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡聚糖苷酶。内切葡聚糖酶中的 β -1,4-葡聚糖内切酶,可在纤维素长链内部随机切割 β -1,4-葡聚糖苷键^[3],使纤维素结构松散,同时又能水解产生一定量的纤维二糖和葡萄糖^[4-5]。编码瑞氏木霉分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶的基因有*egl1*、*egl2*、*egl3*、*egl4*和*egl5*^[4],其中对*egl1*、*egl2*和*egl3*基因的研究较多^[5-9]。目前,我国构建的 β -1,4-葡聚糖内切酶基因工程大肠杆菌产酶活性低^[7-8]。

pMG36e是目前应用较多的一个组成型表达载体,由启动子p32及其下游的部分开放阅读框、多克隆位点和来自乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2)蛋白酶基因(*prtP*)的转录终止子以及pWV01复制子和来自于质粒pE194的红霉素抗性基因*Emr*构成的表达载体,质粒大小为3.6 kb,能够在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的细胞内表达^[9]。与胞内表达相比,分泌型表达使目的蛋白更易纯化和提取,因而深受重视^[4]。乳酸乳球菌的信号肽基因*usp45*部分序列使其具有蛋白分泌功能^[11-12]。有文献报道将另一基因与目的基因进行融合表达的方法有益于目的基因正确表达^[13-14]。因此,将*usp45*部分序列与瑞氏木霉*egl3*基因编码的成熟蛋白序列进行融合,并采用质粒pMG36e有助于构建出能分泌活性 β -1,4-葡聚糖内切酶的基因工程大肠杆菌,但至今尚未发现有类似的报道。

本研究旨在构建分泌型重组质粒pMG36e-*usp45-egl3*,获取重组大肠杆菌*E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3*,并检测其分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的表达效果,为瑞氏木霉的 β -1,4-葡聚糖内切酶基因分泌型原核表达提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ;购于北京鼎国昌盛生物公司;表达型质粒载

体pMG36e:购于上海瑞楚生物科技公司;pGH质粒:购于上海捷瑞生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶*Sma* I和*Xba* I、T4 DNA连接酶、PCR试剂、蛋白质Marker:均购于TaKaRa公司;DNA Marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒:购于OMEGA公司;引物:由上海英潍捷基生物科技有限公司合成;PBS缓冲液、SDS-PAGE浓缩胶(5 g/dL)和分离胶(12 g/dL)的制备参考TaKaRa商品目录进行(S-1);其他试剂:均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基及培养条件 LB培养基的组成为:1 g/dL蛋白胨,1 g/dL NaCl,0.5 g/dL酵母粉,pH 7.0,121 °C灭菌15 min后备用。37 °C振荡培养;抗生素的质量浓度:氨苄青霉素100 μ g/mL、红霉素300 μ g/mL和250 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 *usp45-egl3* 融合基因的合成 根据GenBank乳酸乳球菌*usp45*基因编码(基因收录号:M60178)信号肽的序列和瑞氏木霉的*egl3*基因(基因收录号:AB003694)中编码成熟蛋白质的序列,委托上海捷瑞生物工程有限公司采用重叠延伸PCR合成技术合成上游带有*Sma* I酶切位点、下游带有*Xba* I酶切位点的*usp45-egl3*融合基因。

1.2.2 *usp45-egl3* 融合基因中各构成基因的相似性分析 *usp45-egl3*融合基因克隆到载体pGH中,热激法转化到*E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落,经菌体PCR(上游引物:GCAAGCTTGCATGCTGTCAGGTCGACTCTAGATTAGTTGATAGA;下游引物:CGTTTCAGCAGAAAAATTCGTAATTCGAGCTC;PCR程序是:95 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,59 °C退火20 s,72 °C延伸1 min,30个循环,72 °C保持10 min)、*Xba* I单酶切,*Sma* I和*Xba* I双酶切鉴定后将阳性克隆子送到上海英潍捷基生物科技有限公司测序,并与文献基因进行序列比对,分析相似性。

1.2.3 分泌型表达质粒的构建 将测序正确的*usp45-egl3*片段和pMG36e质粒进行*Sma* I和*Xba* I酶切。用T4 DNA连接酶将酶切后的*usp45-egl3*和pMG36e质粒过夜连接。将连接产物转化到感受

态 *E. coli* DH5 α 中并涂于含有 300 μ g/mL 红霉素的 LB 固体培养基进行筛选。阳性转化子经菌体 PCR 扩增、提取质粒进行双酶切鉴定,获得阳性菌株 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3*。

1.2.4 重组大肠杆菌表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果 采用刚果红染色法和羧甲基纤维素钠糖化力法^[15],评价重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果。过夜培养重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3*、*E. coli* DH5 α /pMG36e-*egl3* 和 *E. coli* DH5 α /pMG36e 后,分别接种上述菌液 1 μ L 到含有 0.5% 羧甲基纤维素钠的 LB 固体培养基中培养 36 h。将平板上的菌落冲洗后,加入 0.1% 刚果红溶液覆盖平板表面,室温下染色 20 min 后倒掉刚果红溶液,加入适量 1 mol/L 的 NaCl 室温下脱色反应 20 min,观察菌落周围是否有水解圈。接种 200 μ L 重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 于 100 mL 含 250 μ g/mL 红霉素的 LB 液体培养基中。37 $^{\circ}$ C 培养 6、8、10、12、14、16、18 h 后,取 1 mL 菌液,8 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,获得菌体和上清液。向菌体加入 1 mL PBS 缓冲液,冰浴中破碎菌体,获得菌体粗酶液。以 1% 羧甲基纤维素钠为底物,加入上清液或菌体粗酶液 200 μ L,在 pH 6.0 的醋酸缓冲液中 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min,用相应煮沸失活的样品为对照,在波长为 520 nm 下测定其吸光值。

β -1,4-葡聚糖内切酶的酶活性: β -1,4-葡聚糖内切酶每分钟水解羧甲基纤维素钠产生 1 μ mol 还原糖的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.2.5 重组大肠杆菌分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解纤维素的能力 采用羧甲基纤维素钠糖化力法评价重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解纤维素的能力。取重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 产 β -1,4-葡聚糖内切酶稳定期 (12、14、16 h) 的菌液 1 mL,8 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,获得上清液。采用羧甲基纤维素钠糖化力法^[15],分析重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 分泌到细胞外的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解羧甲基纤维素钠产生还原糖的速率。

1.2.6 β -1,4-葡聚糖内切酶电泳鉴定 DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 在 LB 液体培养基中培养 14 h 至对数中期,10 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集上

清液。三氯乙酸法在滤液中加入 1/4 体积的 10% 的三氯乙酸,充分混匀,冰浴 1 h 后,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,收集沉淀。用预冷的丙酮将沉淀洗涤 3 次,12 000 r/min 离心 15 min,倒掉丙酮,在通风厨中挥发残余的丙酮。取适量的去离子水将沉淀或菌体重悬,加等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液,混匀,于沸水中煮沸 10 min,离心。各取 10 μ L 上清液和菌体样品液,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。

2 结果与分析

2.1 *usp45-egl3* 融合基因中各构成基因的相似性分析

如图 1,*usp45-egl3* 融合基因经 T-A 克隆后测序,各构成基因与对应的文献基因的相似性均为 100%,长度分别为 81 bp 和 657 bp,无碱基突变。

2.2 分泌型表达质粒的构建及验证

将测序正确的片段和质粒经 *Sma* I 和 *Xba* I 酶切后连接,转化至 *E. coli* DH5 α 。经菌体 PCR 鉴定后,提取质粒,再用 *Xba* I 单酶切,*Sma* I 和 *Xba* I 双酶切验证,结果见图 2。*Xba* I 单酶切片段为一条,约 4 200 bp,*Sma* I 和 *Xba* I 双酶切片段断为两条条带。其中相对分子质量较小的酶切片段大小与带酶切位点的融合基因 *usp45-egl3* 一致。pMG36e-*usp45-egl3* 表达载体经测序后表明,DNA 序列无误,即分泌型表达载体构建成功。

2.3 重组大肠杆菌产 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性分析

从图 3 可见,重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 菌株在 0.5% 羧甲基纤维素钠培养基上呈现清晰的水解圈,而 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*egl3* 和 *E. coli* DH5 α /pMG36e 周围均未见水解圈,说明重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 分泌了活性 β -1,4-葡聚糖内切酶。综上所述,成功获得了分泌表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 菌株。如表 1,重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 菌培养 14 h 后,其产生 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性达到最高。 β -1,4-葡聚糖内切酶分泌到细胞外的活性为 226 mU/mL,分泌到细胞内的活性为 535 mU/mL。

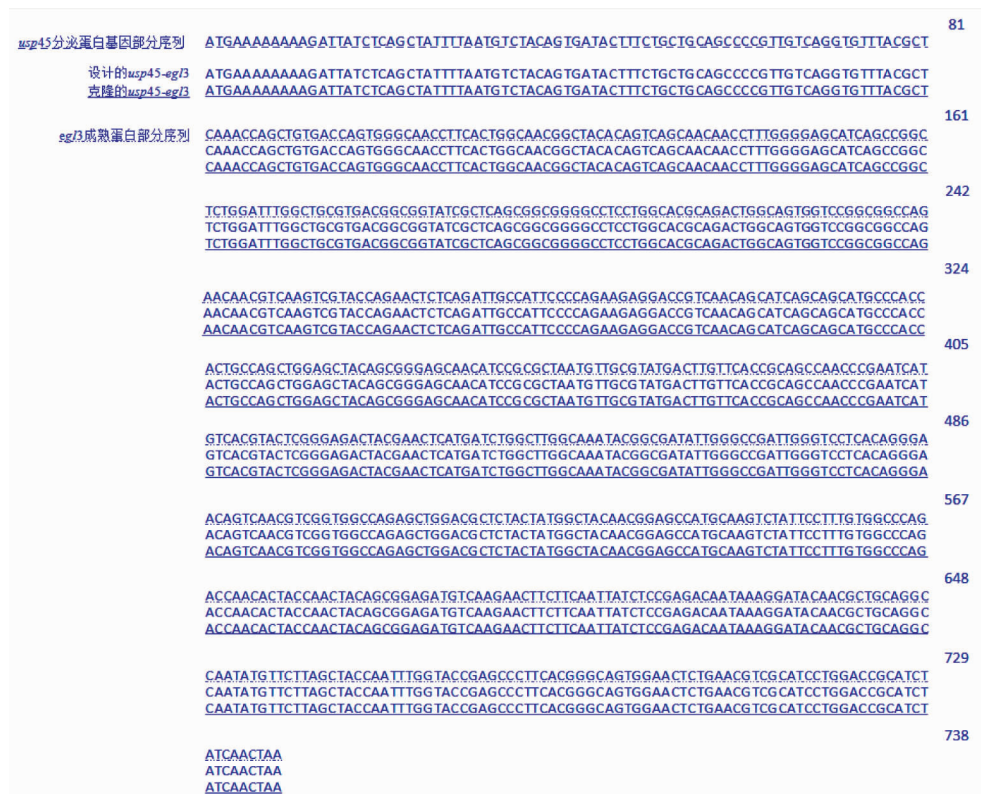
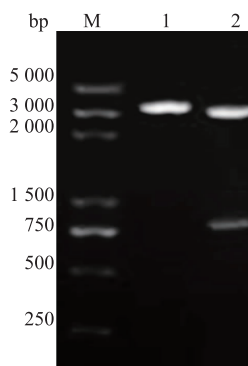


图1 克隆的usp45-egl3基因序列与文献基因的相似性

Fig. 1 Similarity of cloned usp45-egl3 sequence with reference gene

2.4 重组大肠杆菌表达产物电泳分析

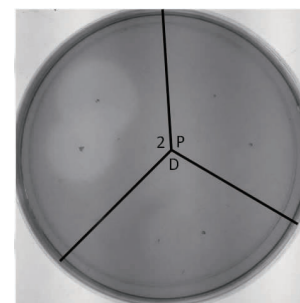
对重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-usp45-egl3 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,重组大肠杆菌菌体和上清液均可见一条大小约 25 000 的蛋白质条带,相对分子质量与理论值一致,但菌体的 β -1,4-葡聚糖内切酶含量比上清液多,见图 4。



M: Maker; 1: *Xba* I 酶切; 2: *Sma* I 和 *Xba* I 酶切

图2 pMG36e-usp45-egl3 的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion of plasmid pMG36e-usp45-egl3



2: *E. coli* DH5 α /pMG36e-usp45-egl3; D: *E. coli* DH5 α /pMG36e;
P: *E. coli* DH5 α /pMG36e-egl3。

图3 重组大肠杆菌在羧甲基纤维素钠 LB 培养基上表达 β -1,4-葡聚糖内切酶的效果

Fig. 3 Effect of recombinant *E. coli* DH5 α /pMG36e-usp45-egl3 expressing β -1,4-endoglucanase on the sodium carboxymethylcellulose-LB medium

表1 重组大肠杆菌分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性

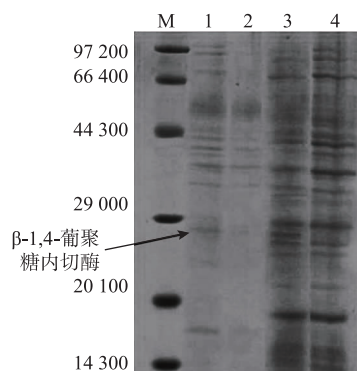
Table 1 Activity of recombinant *E. coli* DH5 α /pMG36e-usp45-egl3 secreting β -1,4-endoglucanase

培养时间/h	β -1,4-葡聚糖内切酶的活性/(mU/mL)	
	细胞外	细胞内
6	92	208
8	137	336

续表 1

培养时间/h	β -1,4-葡聚糖内切酶的活性/(mU/mL)	
	细胞外	细胞内
10	168	497
12	203	512
14	226	535
16	219	529
18	193	468

注:相应煮沸失活的样品为对照。



M: Maker; 1: *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 的胞外蛋白; 2: 对照 *E. coli* DH5 α /pMG36e 的胞外蛋白; 3: *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 的细胞破碎沉淀; 4: 对照 *E. coli* DH5 α /pMG36e 的细胞破碎沉淀。

图 4 重组大肠杆菌表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* expressing protein

2.5 β -1,4-葡聚糖内切酶降解纤维素的能力分析

从图 5 可见,培养 12、14、16 h 后,重组大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* 产生的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解羧甲基纤维素钠生成还原糖的速率分别为 2.07、2.53、2.45 mg/(h·mL), 平均速率为 2.35 mg/(h·mL)。

3 讨论

β -1,4-葡聚糖内切酶是纤维素酶的重要成分,能随机切割纤维素内部使纤维素结构松散,释放一定量的水溶性碳水化合物,已经被广泛地应用于工业领域,如棉麻纺织品的处理、饲料添加剂和加酶洗涤剂的生产等。近年来,国内学者发现大肠杆菌分泌表达真核生物的 β -1,4-葡聚糖内切酶基因 *egl1* 和 *egl2* 较困难,表达产物的分子结构均不正确^[7-8],不能折叠成天然的活性蛋白,一般聚集成不溶性的包涵体^[7]。蛋白质融合表达是一种有效促进

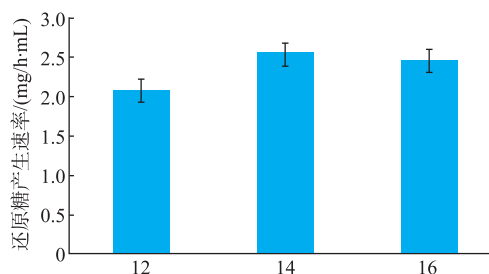


图 5 重组大肠杆菌在不同培养时间分泌到细胞外的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解羧甲基纤维素钠生成还原糖的速率

Fig. 5 Rate of β -1,4-endoglucanase secreted by recombinant *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3* degrading sodium carboxymethylcellulose as reducing-sugar

蛋白质正确折叠的方法^[14]。作者利用大肠杆菌表达 *egl3* 基因时,去除了其信号肽序列,并将 *usp45* 部分序列与 *egl3* 基因成熟蛋白编码序列进行融合,表达了具有活性的 β -1,4-葡聚糖内切酶;而未融合 *usp45* 的重组大肠杆菌不具有降解纤维的能力,即 *usp45* 基因部分序列融合目的基因能正确引导大肠杆菌表达出有活性的目的蛋白,这与 Vanasseldonk 等^[11]研究结果一致。

pMG36e 是一个能够在多个宿主中进行复制的质粒,目前已经发现的宿主有大肠杆菌、乳酸乳球菌和部分乳杆菌^[10],已经在大肠杆菌和乳酸乳球菌中表达了溶菌酶基因和超氧化物歧化酶基因^[16-17]。pMG36e 是细胞内表达载体,在细胞外表达还需要大肠杆菌可识别的信号肽序列^[10]。本研究采用的 *usp45* 信号肽基因部分序列来源于乳酸乳球菌,能被大肠杆菌识别,使连接其 C 端的蛋白质跨越细胞壁^[18],避免了目的蛋白被细胞内的蛋白酶降解^[19],但有研究表明,*usp45* 的分泌效率有时不佳或蛋白质停留在细胞壁上而无活性^[20],其原因可能是与表达蛋白的性质有关。本试验中重组大肠杆菌的菌体在 SDS-PAGE 上形成了较明显的条带,而上清液中的蛋白质条带则相对较弱,说明表达的蛋白质与信号肽可能有一定的拮抗,这与张秋香等^[21]利用 *usp45* 基因表达目的基因的结果一致。朱双杰等研究表明,超高压、保压时间等均影响纤维素酶活^[22],如何提高 *egl3* 在细胞外的表达和酶活性,还有待进一步研究。

Okada 等^[6]发现大肠杆菌中表达 *egl3* 基因的活

性约 25 mU/mL,且不能分泌到细胞外。王瑾等^[7]发现内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌中虽有表达,但无活性。作者直接利用 *egl3* 成熟蛋白编码区域,避开了信号肽和内含子的影响,同时融合分泌蛋白基因部分序列 *usp45*,成功地实现了在大肠杆菌中克隆,并将该序列酶切、连接到 pMG36e 中,转化至大肠杆菌并分泌表达了 β -1,4-葡聚糖内切酶,蛋白质相对分子质量约为 25 000,在 0.5%的羧甲基纤维素钠 LB 中形成了明显的降解圈,说明成功构建了分泌型表达载体, β -1,4-葡聚糖内切酶在细胞内的表达活性为 535 mU/mL, β -1,4-葡聚糖内切酶在细胞外的

表达活性为 226 mU/mL,细胞外分泌的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解羧甲基纤维素钠生成还原糖的速率为 2.35 mg/(h·mL)。与 Okada 等^[6]的结果相比较,表达活性提高达 30.44 倍。

4 结 语

成功构建了重组大肠杆菌株 *E. coli* DH5 α /pMG36e-*usp45-egl3*,实现了 β -1,4-葡聚糖内切酶基因 *egl3* 在大肠杆菌中分泌表达,分泌到细胞外的 β -1,4-葡聚糖内切酶降解了羧甲基纤维素钠,细胞外分泌 β -1,4-葡聚糖内切酶的活性为 226 mU/mL。

参考文献:

- [1] WU Hong, NONG Xiang, ZHANG Qi, et al. Purification of β -endoglucanase in *T. reesei* QM9414 and its enzymological study[J]. **Journal of Yunnan University**, 2009(3):316-320.(in Chinese)
- [2] NEVALAINEN K M H, TEOA V S J. Enzyme production in industrial fungi:molecular genetics strategies for integrate strain improvement[J]. **Applied Mycological Biotechnology**, 2003(3):241-259.
- [3] LIU Gaolei, HU Die, WU Minchen, et al. Co-expression of endoglucanase and xylanase in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(3):253-259.(in Chinese)
- [4] LU Min, WANG Shuaihao, Dlyuan, et al. Cloning and expression of cellulase genes[J]. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, 2012, 24(6):1013-1018.(in Chinese)
- [5] XIAO Zhizhuang, WANG Ting, WANG Tianhong, et al. Cloning and expression of trichoderma reesei endoglucanase III(*egl III*) gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2001(4):391-396.(in Chinese)
- [6] OKADA H, TADA K, SEKIYA T, et al. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 64(2):555-563.
- [7] WANG Jin, WU Mincheng, ZHOU Chengyan. Expressions of endoglucanase II gene (*eg II*) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2008(3):110-114.(in Chinese)
- [8] LUO Jun, GONG Xiaoyan, WEI Wei, et al. Expression of recombinant trichoderma reesei endoghzcanease II in *Escherichia coli* and properties of the recombinant enzyme[J]. **Journal of Nanjing Normal Universty:Natural Science Edition**, 2009(3):92-98.(in Chinese)
- [9] OKADA K, ONODERA T, OGASAWARA W, et al. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 81(4):681-689.
- [10] DING Yinyin, MA Huiqin, ZOU Fanglei, et al. Application of pMG36e lactic acid bacteria vector[J]. **China Biotechnology**, 2009(11):106-111.(in Chinese)
- [11] YE Fei, LI Chang, REN Dayong, et al. Cloning and prokaryotic expression of *usp 45* gene of *Lactococcus lactis* 1.2472 [J]. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, 2014(7):36-41.(in Chinese)
- [12] VANASSELONK M, DEVOS W M, SIMONS G. Functional-analysis of the *Lactococcus-Lactis Usf45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase[J]. **Molecular and General Genetics**, 1993, 240(3):428-434.
- [13] HUANG Jianfei, CHENG Lili, LI Na, et al. Expression of β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus* in *Lactococcus lactis* [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2014, 30(5):33-37.(in Chinese)
- [14] ZHANG Feifei, WANG Ruiqing, ZHU Yupeng, et al. Construction of *Escherichia Coli* fusion expression vectors[J]. **Journal of Nanjing Normal University**, 2013, 36(3):97-102.(in Chinese)

- [15] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Analysis Chemistry**, 1959, 31(3):426-428.
- [16] CORTHESEY B, BORIS S, ISLER P, et al. Oral immunization of mice with *lactic acid bacteria* producing *Helicobacter pylori* Urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*[J]. **Journal of Infectious Diseases**, 2005, 192(8): 1441-1449.
- [17] VANDEGUCHTE M, VANDERVOSSSEN J M B M, KOK J, et al. Construction of a *Lactococcal* expression vector-expression of Hen Egg-White Lysozyme in *Lactococcus-Lactis* subsp *lactis*[J]. **Applied And Environmental Microbiology**, 1989, 55(1):224-228.
- [18] ZHANG W, WANG C, HUANG C Y, et al. Construction and secretory expression of beta-galactosidase gene from *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactococcus lactis*[J]. **Biomedical And Environmental Sciences**, 2012, 25(2):203-209.
- [19] VANASSELTON M, RUTTEN G, OTEMAN M, et al. Cloning of *Usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MG1363[J]. **Gene**, 1990, 95(1):155-160.
- [20] RAVN P, ARNAU J, MADSEN S M, et al. Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*[J]. **Microbiology -Sgm**, 2003, 149(8):2193-2201.
- [21] ZHANG Qiuxiang, HOU Huili, LU Yin, et al. Preparation and immunogenicity of streptococcus suis oral vaccine in mice[J]. **China Biotechnology**, 2013(7):25-30. (in Chinese)
- [22] ZHU Shuangjie, PAN Jian, YANG Junjie, et al. Effect of ultrahigh pressure processing on the activities of cellulose in *C. militaris*. *Tuice*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 31(1):62-66. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟发布花生及其制品中黄曲霉毒素总量最大限量风险评估报告

2018年2月8日,欧洲食品安全局(EFSA)发布 10.2903 / j.efsa.2018.5175 文件,就影响人类公共卫生的角度,就将即食和作为食品成分花生及其制品中黄曲霉毒素总量最大限量由 $4\mu\text{g/kg}$ 增加到 $10\mu\text{g/kg}$ 时进行风险评估。

黄曲霉毒素总(AFT)由黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 组成,其中 B1 最常见,分析显示:黄曲霉毒素主要在花生、坚果、干果、大米等进口食品中检出,加热、烘烤等可减少含量水平,即使是黄曲霉毒素高度污染的花生样本在提取食用油的过程中含量也能降低到 1 微克/千克以下。根据评估,黄曲霉毒素 B1、G1 致癌,B2 致癌性的证据有限,G2 的致癌性证据不足,计算的癌症风险表明,最大限量的增加将使风险进一步增加 1.6-1.8 倍。为此,评估小组建议在评估对可能增加的公共卫生风险的影响时,需要了解由于超过现行限量而未运往欧盟的货物的污染水平,以评估限量。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 欧盟发布花生及其制品中黄曲霉毒素总量最大限量风险评估报告 [EB/OL]. (2018-2-11). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=56548>

澳新拟批准一种新资源食品并发布一类植物提取物新规范

2018年2月5日,澳新食品标准局(FSANZ)发布了 37-18 号通告,FSANZ 已接受并完成对 A1156 和 A1157 号申请的行政评估。

拟批准 A1156 号申请:将 SHO 红花转基因株系 26 和 40 作为食品来源,这类转基因红花的种子具有高产油酸的特性。

拟批准 A1157 号申请:发布酶生物合成法提取瑞鲍迪甙 M(甜叶菊的一种提取物)的新规范。

向公众征求意见通道拟定于 7 月初到 8 月中旬开放,期限为 6 周。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 澳新拟批准一种新资源食品并发布一类植物提取物新规范 [EB/OL]. (2018-2-7). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=56496>