

棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶的乳酸乳球菌表达

黄建飞, 成丽丽, 李娜, 司丽芳, 罗立新

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 构建棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶食品级分泌表达载体并在乳酸乳球菌MG1363 (*L.lactis* MG1363) 中实现表达。通过PCR扩增*L.lactis* MG1363基因组中分泌信号肽Usp45、质粒pLEB590的乳链菌肽(Nisin)抗性基因NisI和质粒pPIC9k-AbgI的棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶基因AbgI, PCR方法连接后获得片段Usp45-AbgI-NisI, 将其克隆到质粒pMD19中, CaCl₂法转化到*E.coli* DH5 α , 测序鉴定后将该片段连接到大肠杆菌-乳酸菌穿梭质粒pMG36e中并转化到*E.coli* XL1-Blue, 得重组子*E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI。通过PCR方法敲除质粒pMG36e-Usp45-AbgI-NisI中红霉素抗性基因以构建食品级分泌载体pMG36N-Usp45-AbgI-NisI, 将其电转到*L.lactis* MG1363中。转化子*E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI能将 β -葡萄糖苷酶分泌到胞外使七叶苷平板显色, *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI能在20 IU/mL Nisin上生长, 经RT-PCR验证 β -葡萄糖苷酶在乳酸乳球菌中实现表达。表明分泌型表达载体构建成功, 为在乳酸乳球菌中实现食品级活性表达奠定基础。

关键词: 棘孢曲霉; β -葡萄糖苷酶; 大肠杆菌; 分泌表达; 乳酸乳球菌

文章编号: 1673-9078(2014)5-33-37

Food-grade Expression of β -Glucosidase from *Aspergillus aculeatus* in *Lactococcus lactis*

HUANG Jian-fei, CHENG Li-li, LI Na, SI Li-fang, LUO Li-xin

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The food-grade secretion expression vector of β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus* was constructed and expressed in *Lactococcus lactis* MG1363. Secretion signal peptide *Usp45* from the *L. lactis* MG1363 genome, Nisin resistance genes *NisI* from plasmid pLEB590 and *AbgI* from plasmid pPIC9k-AbgI were amplified by PCR and ligated to construct the Usp45-AbgI-NisI fragment. The fragment was subcloned into plasmid pMD19 and then transformed into *E.coli* DH5 α by CaCl₂ method. It was identified by sequencing and inserted into the *E.coli*-Lactic acid bacteria shuttle vector pMG36e. The recombinant strain *E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI was obtained by transformation. Food-grade secretion expression vector pMG36N-Usp45-AbgI-NisI, in which erythromycin resistance gene of plasmid pMG36e-Usp45-AbgI-NisI was knocked out by PCR method, was constructed and then electrotransformed into *L. lactis* MG1363. β -Glucosidase produced by *E.coli* XL1-Blue was active on the chromogenic substrate aesculin. *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI could grow on the plates containing 20IU/mL Nisin. β -Glucosidase expressed in *L.lactis* MG1363 was verified by RT-PCR.

Key words: *Aspergillus aculeatus*; β -glucosidase; *Escherichia coli*; secretion expression; *Lactococcus lactis*

β -葡萄糖苷酶 (β -Glucosidase, EC 3.2.1.21) 是一类能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应配基的水解酶, 广泛存在于植物、昆虫、酵母、木霉、曲霉及细菌体内^[1], 除水解作用外还具有转糖苷作用并合成烷基糖苷^[2]。棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*No. F-50) 具有3种 β -Glucosidase, 其中 β -Glucosidase-1、-2不仅对可溶性纤维低聚糖如纤维三糖至纤维六糖, 而且对平均聚合度为20不溶性纤

维低聚糖有活性。 β -Glucosidase-1促进无定型纤维的水解, 产物只有葡萄糖^[3], 广泛用于纤维素类物质的降解。已有大量研究报道利用 β -Glucosidase水解释放茶叶等饮料中的香气成分, 改善茶汁、果汁、酒类等的风味, 提高饮料的品质^[4]。棘孢曲霉 β -Glucosidase-1具有水解活性强以及产物单一特点被广泛关注, 在毕赤酵母中表达比较成熟, 这主要是由于对毕赤酵母的研究比较透彻以及属于真核生物, 具有一套完整的修饰系统。但在毕赤酵母中的表达需要甲醇诱导, 限制其在食品领域的应用。

乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*) 是一类可发酵碳水化合物并产生大量乳酸的革兰阳性细菌的统称, 被公

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 广东省农业攻关计划项目 (2006B20501001)

作者简介: 黄建飞 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子技术及发酵

通讯作者: 罗立新 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 微生物学及发酵

认为安全的食品级微生物 (generally regarded as safe, GRAS)。作为乳酸菌的模式菌乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, *L.lactis*)，其脂脂亚种MG1363的完整基因组测序在2007年就已完成，一系列基于*L.lactis*的表达系统已经构建，某些异源蛋白、细胞因子和酶以各种形式得到表达^[5]，为其在食品工业、生物制药和疫苗研究领域奠定基础^[6]。分泌型表达具有避免被胞内蛋白酶降解的优点而深受重视，*L.lactis*中主要胞外蛋白的分泌信号肽Usp45是由27个氨基酸组成的短肽，广泛用于异源蛋白在*L.lactis*中分泌表达^[7]。

乳链菌肽 (Nisin) 由部分乳酸乳球菌乳酸亚种 (*L.lactis* subsp.*lactis*) 产生。成熟的 Nisin 分子含有 34 个氨基酸，对大多数革兰氏阳性菌起抑制作用，是一种高效无毒的食品添加剂。目前研究发现乳酸乳球菌抗 Nisin 主要有下面两种机制：一种是 Nisin 产生菌携带的编码 Nisin 抗性基因 *nisI*^[8]，另一种是有些乳酸乳球菌自身不产 Nisin，但具有编码 Nisin 的抗性基因 *nsr*^[9]。*L.lactis*MG1363 对 Nisin 比较敏感，在 20 IU/mL Nisin 中可完全抑制其生长。pMG36e 是乳酸菌-大肠杆菌穿梭载体，广泛用于外源基因在乳酸菌中的异源表达，但质粒中所携带的红霉素抗性基因限制了其在食品领域的应用。本实验首次尝试将棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶-1 克隆到质粒 pMG36e 中，用食品级筛选标记 *NisI* 来代替 pMG36e 中红霉素筛选标记以构建食品级分泌载体进行食品级表达。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

菌种 *E.coli* DH5 α 、*E.coli* XL1-Blue、*L.lactis* MG1614和质粒pLEB590、pPIC9k-AbgI，为本实验室保存；菌株*L.lactis* MG1363和质粒pMG36e，由Jan.Kok教授惠赠；克隆载体pMD19-T，购自大连Takala公司；大肠杆菌采用LB培养基，37 °C振荡培养；*L.lactis* MG1363和*L.lactis* MG1614采用GM17培养基 (M17培养基，0.5%葡萄糖)，30 °C静置培养；氨基青霉素和红霉素在大肠杆菌中的使用浓度分别为100 μ g/mL和200 μ g/mL，红霉素和乳链菌肽在*L.lactis* MG1363中使用的浓度分别为5 μ g/mL和20 IU/mL。

1.2 主要试剂和材料

限制性内切酶XbaI、BglII、SphI、XhoI、ClaI，PrimeSTAR聚合酶，T4DNA连接酶，DNA Marker，Trizol试剂和PrimeScript RT reagent Kit购自Takala公司。质粒抽提试剂盒，DNA回收纯化试剂盒以及基因组提取盒为Promega公司提供。电击杯购自BioRad公司。试验中所用引物见表1 (其中P7与P8一对引物为敲除质粒pMG36e中红霉素基因所设计，下划线序列为酶切位点)，由Invitrogen公司合成，其它化学试剂均为分析纯。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
Usp45	P1: GCTCTAGAACCGAACTTAATGGGAGG (XbaI)	136
	P2: GAAGATCTAGCGTAAACACCTGACAACG (BglII)	
AbgI	P3: GAAGATCTATGGATGAACTGGCGT (BglII)	2545
	P4: CCATCGATTTATTGCACCTTCG (ClaI)	
NisI	P5: CCATCGATCTTAAGGAGGGAAGAGGAAATGA (ClaI)	830
	P6: ACATGCAATGCATCCCTAGTTTCTACCTTCG (SphI)	
	P7: CCGCTCGAGGTTAAGGGATGCATAAACTG (XhoI)	
	P8: CCGCTCGAGTATAACCCTCTTAATTTGGT (XhoI)	

1.3 基因片段扩增

根据GenBank (Accession: M60178.1) 公布的*L.lactis* MG1363Usp45基因序列和GenBank (Accession: X76884) 公布的NisI基因序列设计引物P1、P2和P3、P4，并分别以*L.lactis* MG1363基因组和质粒pLEB590为模板扩增得到Usp45和NisI。AbgI由质粒pPIC9k-AbgI为模板，引物P5和P6扩增所得。PCR产物分别回收纯化，先用BglII单酶切Usp45和AbgI，经T4 DNA连接酶

连接后用P1和P4为引物扩增得片段Usp45-AbgI，再用ClaI单酶切Usp45-AbgI和NisI并用T4 DNA连接酶连接，最后用P1和P6扩增得到Usp45-AbgI-NisI。将扩增产物胶回收纯化，克隆到载体pMD19-T，CaCl₂法转化到*E.coli* DH5 α 感受态细胞，经蓝白斑筛选、菌落PCR和质粒单、双酶切鉴定后将阳性克隆子送到Invitrogen公司测序。

1.4 表达载体的构建

测序正确的片段经 XbaI 和 SphI 双酶切与同样处理的 pMG36e 质粒相连, T4 DNA 连接酶过夜连接后将连接产物转化到感受态 *E.coli* XL1-Blue 中并涂于 200 $\mu\text{g/mL}$ LB 平板上进行筛选。将阳性转化子提质粒进行单酶切、双酶切及 PCR 扩增鉴定, 得阳性菌株 *E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI。

1.5 葡萄糖苷酶活性检测

葡萄糖苷酶活性检测采用七叶苷平板法。具体步骤如下: 挑取 *E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 和 *E.coli* XL1-Blue 于七叶苷平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 观察平板上颜色变化。

1.6 食品级分泌载体和重组乳酸菌的构建及筛选

以载体 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 为模板, P7 和 P8 为引物扩增得到缺失一部分红霉素抗性基因的片段, 使红霉素抗性基因不能得到正确表达而达到红霉素抗性失活效果, 并用 XhoI 内切酶处理片段两端, 最后用 T4 DNA 连接酶过夜连接得到食品级分泌载体 pMG36N-Usp45-AbgI-NisI, 将该载体和 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 电转到 *L.lactis* MG1363 感受态细胞, *L.lactis* MG1363 感受态细胞的制备见参考文献^[10]。电转化条件为: 2000 V, 200 Ω , 电容 25 μF , 时间 5 ms。电击后用 SGM17MC 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 复苏培养 2 h, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d, 涂布在含有终浓度为 20 IU/mL Nisin 和七叶苷的 GM17 平板上, 对照涂布于含有七叶苷的 5 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素或 20 IU/mL Nisin GM17 上。

1.7 SDS-PAGE 及酶活的测定

乳酸乳球菌细胞组分的制备: 上清液和细胞分开处理, 过夜培养的乳酸菌乳球菌 (相同 OD₆₀₀ 值) 2 mL 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 r/min, 离心 10 min 收集菌体, 上清液用 0.22 μm 过滤器过滤; 菌体以 PBS 洗涤菌体沉淀二次, 重悬于 1/40 体积的 PBS 中。超声破碎条件为超声 5 s, 间隔 8 s, 功率 30%, 持续 10 min。将所得的上清液和细胞破碎液加入三氯甲烷 (终浓度为 15%) 使其组分沉淀, 最后用预冷的丙酮洗涤, 沉淀部分重悬于 TE 缓冲液中, 取部分用于 SDS-PAGE^[11]。

β -葡萄糖苷酶酶活测定方法多采用以 pNPG 为底物的比色法, 反应体系的体积为 500 μL , 适当稀释的酶液或细胞破碎液与 5 mmol/L pNPG 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 反应结束后加入 500 μL 1.0 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 于 405 nm 测定吸光值。将每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚

(p-nitrophenol) 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)^[2]。

1.8 RT-PCR 验证

将 *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI、*L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 和 *L.lactis* MG1363 接种到 GM17 液体培养基中, 采用 Trizol 法提取菌体内的总 RNA, 用试剂盒 gDNA Eraser 去除 RNA 中基因组 DNA, 并以此为模板反转录合成 cDNA, 再用 cDNA 为模板, P3、P4 和 P5、P6 为引物扩增基因 AbgI 和 NisI。

2 结果与讨论

2.1 Usp45-AbgI-NisI 片段的构建

AbgI 和 NisI 基因片段经 PCR 扩增在 1% 琼脂糖电泳检测, 所得产物片段分别约为 2545 bp 和 830 bp, Usp45 基因片段在 2% 琼脂糖电泳检测, 得到的片段约为 150 bp, 三片段都符合预期长度。将这三片段基因连接组成 Usp45-AbgI-NisI 并 T-A 克隆转化到 *E.coli* DH5 α 中, 采用菌落 PCR 可得 3500 bp 左右片段, 跟理论大小一样 (如图 1)。

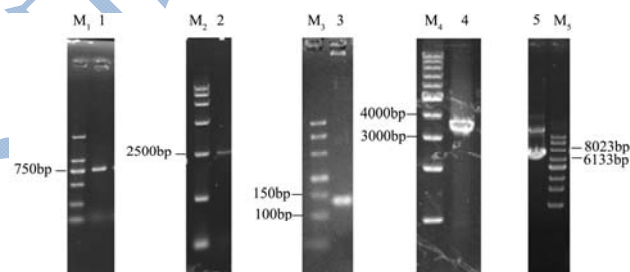


图 1 PCR 产物片段及质粒 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR fragments and plasmid pMG36e-Usp45-AbgI-NisI

注: M₁, DL 2000 Marker; Lane 1, NisI; M₂, DL 15000 Marker; Lane 2, AbgI; M₃, DL 500 Marker; Lane 3, Usp45; M₄, 1 kb Ladder Marker; Lane 4, Usp45-AbgI-NisI; M₅, Supercoiled Marker; Lane 5, plasmid pMG36e-Usp45-AbgI-NisI。

2.2 质粒 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 构建

Usp45-AbgI-NisI 经测序与 NCBI 上序列一致, XbaI 和 SphI 双酶切质粒 pMG36e 和 pMD19-Usp45-AbgI-NisI, 用 T4 DNA ligase 连接得到 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI, 将质粒转化到 *E.coli* XL1-Blue 中, 采用 PCR、质粒提取以及单、双酶切来鉴定, 表明已成功构建表达载体 (如图 1)。pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 翻译偶联调控片段各元件组成见图 2。


```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
ATG GCA ATC GTT TCA GCA GAA AAA TTC GTA ATT CGA GCT CGC CCG GGG ATC
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
GAT CCT CTA GAA CCG AAC TTA ATG GGA GGAAAA ATTA AAA GAA CAG TT
stop
[ TGA ] AAAAA AAG ATT ATCTCA GCT ATTTAATG TCT ACAGTG ATACTT TCT GCT
M K K K I I S A I L M S T V I L S A
GCA GCCCG TTG TCAGGT GTT TAC GCTAGATCT ATGGATGAA
A A P L S G V Y A
    
```

图2 质粒 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 翻译偶联调控片段各元件组成

Fig.2 Nucleotide sequences of the translational coupling regulation fragment in vector pMG36e-Usp45-AbgI-NisI

注: ATG 示质粒 pMG36e 起始密码子, ATG 示信号肽 Usp45 起始密码子, [TGA] 示质粒 pMG36e 小肽的终止密码, 载体小肽密码子以阿拉伯数字标出, 信号肽氨基酸序列用单字母缩写形式表示, 双底线示 SD 序列, 波浪线示酶切位点。

2.3 七叶苷平板活性检测

过夜培养的阳性转化子能够使七叶苷平板变色, 而阴性对照菌周围不显色 (如图 3), 表明载体 pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 构建成功并能在 *E.coli* XL1-Blue 中实现活性表达。

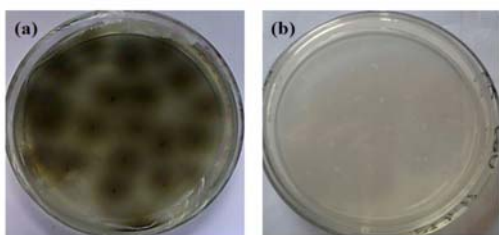


图3 LB 培养基中 β-葡萄糖苷酶的活性检测

Fig.3 Detection of enzyme activity performed by β-glucosidase in LB medium

注: a: 菌株 *E.coli* XL1-Blue/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI; b: 菌株 Strain *E.coli* XL1-Blue。

2.4 食品级分泌载体和重组乳酸菌的构建及筛选

食品级分泌载体 pMG36N-Usp45-AbgI-NisI 构建成功, 大小为 6800 bp 左右 (去除红霉素抗性基因 300 bp), 跟理论大小一致 (如图 5)。 *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI 转化子能够在 20 IU/mL Nisin 的 GM17 平板上生长但不显色而且不能在 5 μg/mL 红霉素平板上生长, *L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 转化子能够在 5 μg/mL 红霉素和 20 IU/mL Nisin 的 GM17 平板上生长但不显色, 阴性对照子 *L.lactis* MG1363 不能在 5 μg/mL 红霉素或 20 IU/mL Nisin 的 GM17 平板上生长且不显色。

2.5 SDS-PAGE 和酶活的测定

采用乳酸乳球菌胞内蛋白和上清液进行 7.5% SDS-PAGE, 上清液胶图很少条带主要由于乳酸乳球菌自身很少分泌胞外蛋白且重组乳酸乳球菌没有将 β-葡萄糖苷酶 (大约 133 kDa) 分泌到胞外, 在该位置处不见条带, 可能由于胞外蛋白酶水解。乳酸菌破壁所获得的胞内蛋白 SDS-PAGE 如图 4, 由于 pMG36e 质粒在乳酸菌中拷贝数较低且是组成型启动子, 导致 β-葡萄糖苷酶表达量较低。

酶活的测定条件主要是根据棘孢曲霉的 β-葡萄糖苷酶而设定的, 将阴性对照 *L.lactis* MG1363 和阳性转化子 *L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 的胞内蛋白进行酶活测定都不见颜色变化, 说明棘孢曲霉的 β-葡萄糖苷酶在胞内没有形成酶活, 可能未正确折叠或修饰, 阴性对照 *L.lactis* MG1363 中自身的 β-葡萄糖苷酶可能在该条件下失活。

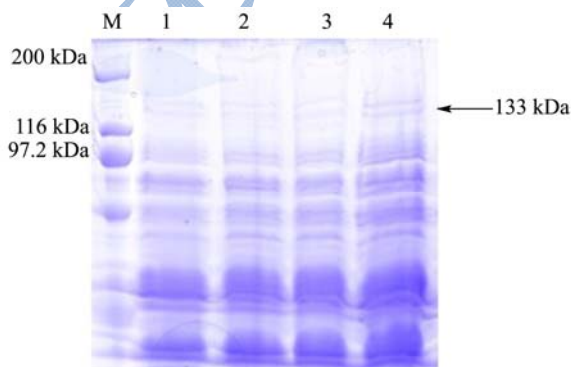


图4 SDS-PAGE 检测胞内 β-葡萄糖苷酶产物

Fig4 Analysis of cellular β-glucosidase product by SDS-PAGE

注: M, Molecular weight marker; Lane 1, The cellular protein of *L.lactis* MG1363; Lane 2, The cellular protein of *L.lactis* MG1363/ pMG36e; Lane 3, The cellular protein of *L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI; Lane 4, The cellular protein of *L.lactis* MG1363 /pMG36N-Usp45-AbgI-NisI.

2.6 RT-PCR

如图 5 所示, 以提取 *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI、*L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 和 *L.lactis* MG1363 的 RNA 为模板, 扩增出 AbgI 和 NisI 基因, 条带大小正确, 说明 AbgI 和 NisI 基因得到了表达。

转化子 *L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI 和 *L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI 不能够使平板上七叶苷变色, 表明 β-葡萄糖苷酶未被分泌到胞外。转化子破壁后也不见酶活, 可能是该酶没有正确折叠或正确修饰导致。另外经 SDS-PAGE 跑胶后不易发现

胞内 β -葡萄糖苷酶和乳链菌肽蛋白条带,可能是pMG36e质粒在乳酸菌中拷贝数较低导致。目前质粒在乳酸乳球菌中拷贝数极低很难通过观察质粒凝胶电泳来判断,一般采用取适量提取质粒为模板进行PCR或拿PCR产物测序鉴定,因此可通过提高拷贝数以及高拷贝质粒如pIL253来提高蛋白表达量^[12]。目前用该质粒在乳酸菌中表达真核基因的报道较少,主要由于乳酸菌缺少拼接以及可能缺少修饰功能如糖基化,从真核细胞中获得的基因很难在原核细胞中正确表达,因此,我们所用 β -葡萄糖苷酶是通过逆转录得的cDNA,不含有内含子^[13]。另乳酸乳球菌含有较低的GC值,可以采用密码子优化来提高异源蛋白表达量^[14],最后通过一些基因修饰以及侧链的修饰来实现其生物活性。

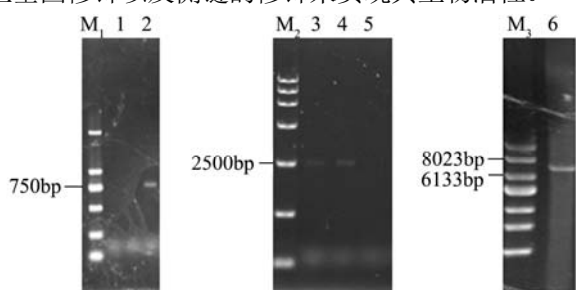


图5 RT-PCR产物NisI、AbgI和载体pMG36N-Usp45-AbgI-NisI凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of NisI、AbgI by RT-PCR products and vector pMG36N-Usp45-AbgI-NisI

注: M₁为DL2000 Marker; M₂为DL15000 Marker,泳道1, 5为阴性对照*L.lactis* MG1363 RT-PCR产物,泳道2, 3为*L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI RT-PCR产物,泳道4为*L.lactis* MG1363/pMG36e-Usp45-AbgI-NisI RT-PCR产物; M₃为Supercoiled Marker,泳道6为食品级分泌载体pMG36N-Usp45-AbgI-NisI。

3 结论

成功构建载体pMG36e-Usp45-AbgI-NisI并能够在*E.coli* XL1-Blue中实现 β -葡萄糖苷酶活性表达。所得食品级分泌表达菌株*L.lactis* MG1363/pMG36N-Usp45-AbgI-NisI能够表达 β -葡萄糖苷酶和NisI蛋白且能够抗20 IU/ml Nisin。下一步通过基因修饰有望在*L.lactis* MG1363实现 β -葡萄糖苷酶活性表达并运用于食品领域。

参考文献

[1] James R, Ketudat Cairns, Asim Esen. β -Glucosidases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67: 3389-3405
[2] 韦斌如,刘端玉,韩双艳,等. 棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶1在毕赤酵母中的表达及烷基糖苷的催化合成[J]. 高等学校化学学

报, 2012, 7(33): 1498-1504

- WEI Bin-ru, LIU Duan-yu, HAN Shuang-yan, et al. Expression of *Aspergillus aculeatus* β -Glucosidase 1 gene in *Pichia pastoris* and its application on the synthesis of alkyl glucoside [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2012, 7(33): 1498-1504
- [3] Reichihiro Sakamoto, Jinshu Kanamoto, Motoo Arai, et al. Purification and physicochemical properties of three β -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* No. F-50 [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49: 1275-1281
- [4] 李远华. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29: 421-425
LI Yuan-hua. The research progress of β -glucosidase [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2002, 29: 421-425
- [5] Udo Wegmann, Aldert Zomer, Girbe Buist, et al. Complete genome sequence of the prototypelactic acidbacterium *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363 [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189: 3256-3270
- [6] Yves Le Loir, Vasco Azevedo, Sergio C Oliveira, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production [J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4: 2
- [7] Martien van Asseldonk, Willem M de Vos, Guus Simons. functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α -amylase [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1993, 240: 428-434
- [8] T Takala, P Saris. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisI [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: 467-471
- [9] Xiaobo Liang, Zhizeng Sun, Jin Zhong, et al. Adverse effect of nisin resistance protein on nisin-induced expression system in *Lactococcus lactis* [J]. Microbiological Research, 2010, 165: 458-465
- [10] Helge Holo, Ingolf F Nes. High-frequency transformation, by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55: 3119-3123
- [11] Nanyan Noreen, Wei Yeng Hooi, Ali Baradaran, et al. *Lactococcus lactis* M4, a potential host for the expression of heterologous proteins [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 28
- [12] Arno Wegkamp, Wietske van Oorschot, Willem M de Vos, et al. Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis* [J].

- Applied and Environmental Microbiology, 2007: 2673-2681
- [13] Prithy Rupa, Vicente Moneero, Bruce N Wilkie. Expression of bioactive porcine interferon-gammaby recombinant Lactococcus lactis [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 129: 197-202
- [14] Igor Mierau, Michiel Kleerebezem. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68: 705-717

现代食品科技