

## 研究报告



## 碱性蛋白酶 SubC 在枯草芽孢杆菌中的高效异源表达

李怡欣<sup>1,2</sup> 付刚<sup>2</sup> 马媛媛<sup>\*1</sup> 张大伟<sup>\*2,3</sup>

1 天津大学化工学院 天津 300072

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308

3 中国科学院大学 北京 100049

**摘要:**【背景】碱性蛋白酶是工业用酶中占比最大的酶类,广泛应用于清洁、食品、医疗等行业。近期研究发现碱性蛋白酶在产生物活性肽方面有巨大潜力,这将进一步拓宽其在保健食品领域中的应用。【目的】利用枯草芽孢杆菌异源表达地衣芽孢杆菌来源的碱性蛋白酶 SubC。【方法】通过筛选 3 种枯草芽孢杆菌宿主菌株(*Bacillus subtilis* 1A751、MA07、MA08)和 6 种信号肽(AmyE、AprE、NprE、Pel、YddT、YqoM),同时优化诱导剂浓度、发酵培养基和发酵时长,最终得到最优重组菌株 MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub>。【结果】重组菌株 MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub> 的胞外酶活力为  $3.33 \times 10^3$  AU/mL,胞外蛋白分泌量为胞内可溶蛋白表达量的 4 倍,与携带野生型信号肽的对照组菌株 WT 相比,酶活提高了 73.4%。【结论】异源碱性蛋白酶 SubC 在枯草芽孢杆菌中成功表达,为碱性蛋白酶 SubC 的表达和在保健食品领域的工业化应用提供了理论基础。

**关键词:** 碱性蛋白酶, 枯草芽孢杆菌, 信号肽

Efficient heterologous expression of alkaline protease SubC in *Bacillus subtilis*LI Yixin<sup>1,2</sup> FU Gang<sup>2</sup> MA Yuanyuan<sup>\*1</sup> ZHANG Dawei<sup>\*2,3</sup>

1 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Background] Alkaline protease is the enzyme with the largest proportion among industrial enzymes and is widely used in cleaning, food, medical and other industries. Recent studies have found that alkaline protease has great potential in the production of biologically active peptides, which will further broaden its application in the field of health food. [Objective] In this study, *Bacillus subtilis* was used to heterologously express the alkaline protease SubC derived from *Bacillus licheniformis*. [Methods] By

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901001); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capability Improvement Action Project (TSBICIP-KJGG-004-03)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-22-24828749

E-mail: MA Yuanyuan: myy@tju.edu.cn; ZHANG Dawei: zhang\_dw@tib.cas.cn

**Received:** 28-12-2020; **Accepted:** 08-02-2021; **Published online:** 15-03-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0901001); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-KJGG-004-03)

**\*通信作者:** Tel: 022-24828749

E-mail: 马媛媛: myy@tju.edu.cn; 张大伟: zhang\_dw@tib.cas.cn

**收稿日期:** 2020-12-28; **接受日期:** 2021-02-08; **网络首发日期:** 2021-03-15

screening three kinds of *Bacillus subtilis* host strains (*B. subtilis* 1A751, MA07 and MA08) and six kinds of signal peptides (AmyE, AprE, NprE, Pel, YddT and YqM), as well as optimizing the inducer concentration, fermentation medium and fermentation duration, we finally obtained the optimal recombinant strain MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub>. **[Results]** The extracellular enzyme activity of the recombinant strain MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub> was  $3.33 \times 10^3$  AU/mL. Secretory expression level is four times more than that of intracellular soluble protein expression. Compared with the control group WT, the enzyme activity increased by 73.4%. **[Conclusion]** The heterologous alkaline protease SubC was successfully expressed in *Bacillus subtilis*, which provided a theoretical basis for the expression of alkaline protease SubC and its industrial application in the field of health food.

**Keywords:** alkaline protease, *Bacillus subtilis*, signal peptide

碱性蛋白酶是指在碱性条件下(pH 9.0–11.0)能够水解蛋白质肽键的酶,是一类内切蛋白酶,催化残基为丝氨酸,在清洁、食品、医疗等多个工业领域有很高的应用价值<sup>[1-2]</sup>。随着碱性蛋白酶在工业上的广泛应用,特殊功能蛋白酶的需求日益增加,近期研究发现碱性蛋白酶在生物活性肽生产方面有巨大潜力,进一步拓宽了碱性蛋白酶在保健食品领域中的应用。Borrajó 等<sup>[3]</sup>最新研究表明,与其他蛋白酶相比,SubC 是最有效的释放生物活性肽的蛋白酶。SubC 蛋白酶水解不同蛋白质可以产生不同生物活性肽,这些肽具有抗氧化性<sup>[4]</sup>、血管紧张素 I 转换酶抑制<sup>[5]</sup>、金属结合<sup>[6]</sup>、抗糖尿病、抗炎和抗菌等活性<sup>[7]</sup>,以及可改善功能肽食品的感官和营养特性<sup>[8]</sup>。

芽孢杆菌属的细菌是工业上公认的用于生产细胞外蛋白的微生物。由于可获得相对便宜的大规模生产系统,芽孢杆菌属的细菌被广泛应用生产胞外蛋白<sup>[9]</sup>。目前,主要生产碱性蛋白酶的芽孢杆菌及研究对象有地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)等<sup>[10]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是革兰氏阳性细菌的模式菌,其不产生内毒素且有较强的蛋白分泌能力,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证为安全菌株(Generally Recognized as Safe, GRAS)<sup>[11]</sup>。此外,枯草芽孢杆菌的分泌表达系统具有一套高效的信号肽和分子伴

侣系统,在蛋白表达过程中不易形成包涵体,可以通过改造使目标蛋白产物大量分泌到培养基中,从而促进其分离和纯化<sup>[12-13]</sup>。枯草芽孢杆菌生长速率快、培养周期短,在大规模发酵过程中可以快速生长到高细胞密度。然而该表达系统也存在许多不足,致使表达水平较低<sup>[14]</sup>,但通过强启动子、转录终止子、各种分泌信号肽和分子伴侣的最佳组合可实现高水平的蛋白表达<sup>[15-16]</sup>。

Zhou 等<sup>[17]</sup>对地衣芽孢杆菌 2709 中与泡沫形成有关的天然 *lchAC* 和编码胞外粘多糖的 *eps* 簇进行了遗传修饰,同时通过筛选不同模块质粒和基因组基因座中最有效的表达系统进一步优化了碱性蛋白酶基因(*aprE*)的表达,最终结果表明酶活与野生型菌株相比显著提高了 62.19%。张若兰等<sup>[18]</sup>在酿酒酵母 *Whu2d* 中实现了碱性蛋白酶的异源表达,结果表明工程菌发酵液中碱性蛋白酶的酶活比出发菌株高 55.2%。Degering 等<sup>[19]</sup>对来源于地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的上百种信号肽进行了筛选和研究,发现地衣芽孢杆菌几丁质酶的信号肽 dBli00338 可以大幅度提高碱性蛋白酶的分泌表达量。

本研究选用枯草芽孢杆菌作为宿主菌株异源表达地衣芽孢杆菌来源的碱性蛋白酶,通过筛选宿主菌株和信号肽及优化发酵条件等手段提高碱性蛋白酶 SubC 在枯草芽孢杆菌中的表达,以期实现重组碱性蛋白酶 SubC 的工业化生产,从而拓宽其在生物活性肽领域的广泛应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

菌株、质粒及引物序列的相关特性分别列于表 1–3。

1.1.2 主要试剂和仪器

麦芽糖，上海麦克林生化科技有限公司；质粒小提试剂盒、柱式 PCR 胶回收试剂盒，Omega 公司；DNA 聚合酶 Primer STAR Mix，TaKaRa 公司；一步克隆试剂盒 (ClonExpress® II)、2×Taq PCR

Master Mix，南京诺唯赞生物科技有限公司。

PCR 仪，Eppendorf 公司；凝胶成像系统，Bio-Rad 公司；可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司；叠加摇床，上海智城分析仪器有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基及 LB 固体培养基的配制参见参考文献[20]。2×SR 培养基(g/L): 酵母粉 50.0, 蛋白胨 30.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0。MXR 培养基(g/L): 酵母粉 24.0, 酸水解酪素 12.0, 树胶 4.0, 甘油 4.0, PBS 100.0。牛奶平板培养基(g/L): 脱脂奶粉 20.0, 琼脂 20.0。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Description	Source
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>F-φ80lacZ, ΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, endA1, recA1, gyrA96, endA1, thi-1, relA1</i>	Invitrogen
<i>Bacillus subtilis</i> 1A751	<i>eglSΔ102 bglT/bglS ΔEV aprE nprE his</i>	BGSC
MA07	<i>ΔyvdK</i>	Lab stock
MA08	<i>ΔmalL</i>	Lab stock
1A751-subC <sub>ori</sub>	1A751 containing pMATE-subC <sub>ori</sub>	This work
1A751-subC <sub>opt</sub>	1A751 containing pMATE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA07-subC <sub>ori</sub>	MA07 containing pMATE-subC <sub>ori</sub>	This work
MA07-subC <sub>opt</sub>	MA07 containing pMATE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-subC <sub>ori</sub>	MA08 containing pMATE-subC <sub>ori</sub>	This work
MA08-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-AmyE-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-AmyE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-AprE-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-AprE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-NprE-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-NprE-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-Pel-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-Pel-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-YddT-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-YddT-subC <sub>opt</sub>	This work
MA08-YoqM-subC <sub>opt</sub>	MA08 containing pMATE-YoqM-subC <sub>opt</sub>	This work

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pMATE	<i>E. coli/B. subtilis</i> shuttle vector, pMA5 derivative, P <sub>malA</sub> , Amp <sup>R</sup> , Kana <sup>R</sup>	Lab stock
pMATE-subC <sub>ori</sub>	pMATE derivative, <i>subC<sub>ori</sub></i>	This work
pMATE-subC <sub>opt</sub>	pMATE derivative, <i>subC<sub>opt</sub></i>	This work
pMATE-AmyE-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>AmyE</sub>	This work
pMATE-AprE-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>AprE</sub>	This work
pMATE-NprE-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>NprE</sub>	This work
pMATE-Pel-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>Pel</sub>	This work
pMATE-YddT-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>YddT</sub>	This work
pMATE-YoqM-subC <sub>opt</sub>	pMATE-subC <sub>opt</sub> derivative, SP <sub>YoqM</sub>	This work

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Product (bp)
subC <sub>ori</sub> -F	AATTTATCAAGGAGGTCGTCATATGATGCGCAAAAAAAGCTTCTG	1 143
subC <sub>ori</sub> -R	TTCCCCCTAGCTAATTTTCGTTTTTATTATTGAGCGGCAGCTTCGAC	
subC <sub>opt</sub> -F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGATGCGCAAAAAAAGCTTCTG	1 137
subC <sub>opt</sub> -R	TCCCCCTAGCTAATTTTCGTTTAAATTACTGGGCGGCAGCTTCA	
subC-vector.F	TTTAAACGAAAATTAGCTAGGGGGAA	7 451
subC-vector.R	ATGACGACCTCCTTGATAAATTTTAC	
YddT.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGAGAAAGAAAAGAGTTATTACTTGTGTTATGG CTG	84
YddT.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCTGCAGAAGCGTAACCTGCAGGTAA	
AmyE.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTC	81
AmyE.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCTCCTGCCAGAACCAAATGAAACA	
AprE.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTG	87
AprE.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCAGCCTGCGCAGACATGTTGC	
NprE.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTGCTGTCG	81
NprE.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCAGCCTGAACACCTGGCAGGC	
Pel.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGAAAAAAGTGATGTTAGCTACGGCTTTGTT	63
Pel.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCTGCGTTCGCGCCAGCTGGA	
YoqM.F	TTTATCAAGGAGGTCGTCATATGAAATTAAGAAAAAGTATTGACTGGTTCTGTT	75
YoqM.R	ACGTTCTTGGCTGGTTGGGCAGCGAATGCAGGAGAAGCAGAA	
subC <sub>opt</sub> -SP vector.F	GCCCAACCAGCCAAGAACGT	8 453
subC <sub>opt</sub> -SP vector.R	ATGACGACCTCCTTGATAAATTTTACAATTCCAT	

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及验证

将 NCBI 中公布的地衣芽孢杆菌来源的碱性蛋白酶 SubC (CAB56500.1)序列进行化学合成和密码子优化。根据合成的 *subC<sub>ori</sub>* 序列设计引物 subC<sub>ori</sub>-F 和 subC<sub>ori</sub>-R, 对目的基因 *subC<sub>ori</sub>* 进行扩增并对 PCR 产物进行胶回收。pMATE 质粒是将 pMA5 质粒的原始组成型启动子 P<sub>HpaII</sub> 替换为麦芽糖诱导型启动子 P<sub>malA</sub><sup>[21]</sup>。pMATE 表达载体使用同样方法进行构建并用胶回收试剂盒纯化回收, 将目的基因片段 *subC<sub>ori</sub>* 与表达载体 pMATE 通过试剂盒进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 转化菌液涂布到含氨苄西林(Amp) 100 μg/mL 的 LB 平板筛选阳性克隆, 完成重组质粒 pMATE-subC<sub>ori</sub> 的构建。用这种方法也构建重组质粒 pMATE-subC<sub>opt</sub>。

1.2.2 重组菌的构建

将重组质粒采用 Spizizen 盐化学转化法分别转入枯草芽孢杆菌 1A751、MA07 和 MA08, 通过菌落 PCR 验证阳性转化子, 重组菌株 1A751-subC、MA07-subC 和 MA08-subC 均按照文献[20]中所述方法进行构建。

1.2.3 不同信号肽重组质粒的构建

以 pMATE-subC<sub>opt</sub> 重组质粒为模板进行 PCR, 将原信号肽从质粒上去除, 命名为 pMATE-subC<sub>opt</sub>-dp; 然后设计 6 组信号肽引物, 以 pMATE-subC<sub>opt</sub>-dp 为模板进行 PCR, 通过 Gibson Assembly 无缝克隆方法克隆至 pMATE-subC<sub>opt</sub>-dp (图 1), 得到 6 个质粒, 分别为 pMATE-subC-AprE、pMATE-subC-Pel、pMATE-subC-NprE、pMATE-subC-AmyE、pMATE-subC-YoqM、pMATE-subC-YddT。信号肽相关信息如表 4 所示。

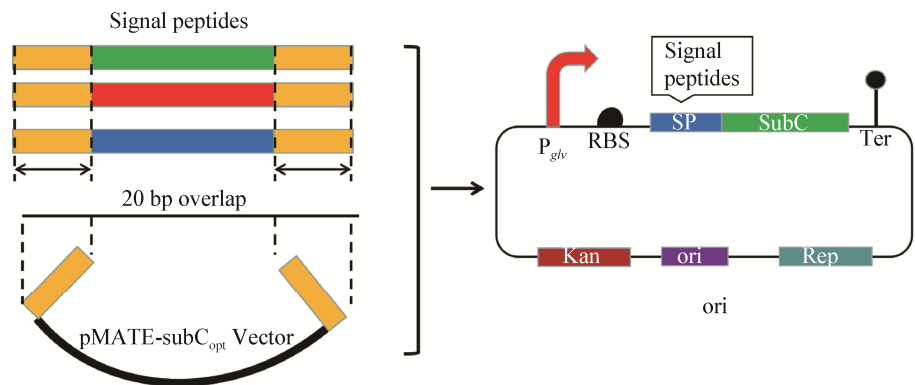


图 1 信号肽表达载体构建方法  
Figure 1 Construction method of signal peptides

表 4 信号肽的相关信息  
Table 4 Information on the selected signal peptides

SP	Amino acid sequences	Length	D score	pI value
SubC	MMRKKSFVLGMLTAFMLVFTMAFSDSASA	29	0.128	9.99
Pel	MKKVMLATALFLGLTPAGANA	21	0.258	10.81
NprE	MGLGKKLSVAVAASFMSLSISLPGVQA	27	0.225	10.00
YddT	MRKKRVITCVMAASLTLSLLPAGYASA	28	0.282	10.89
YoqM	MKLRKVLTGSVLSLGLLVSPAFA	25	0.339	11.82
AmyE	MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAG	28	0.278	11.17
AprE	MRSKKLWISLLFALTIFTMAFSNMSAQA	30	0.430	11.17

1.2.4 重组蛋白诱导表达

所有重组菌株在 LB 琼脂平板和 LB 液体培养基(培养基中加入相应抗生素)中活化(37 °C、220 r/min 培养 14–16 h)。将活化的重组菌株接种到装有 2×SR 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中(1%接种量), 每种菌株做 2 个平行, 37 °C 培养 48–60 h。重组菌株均在零时诱导, 诱导物麦芽糖在摇瓶中的终浓度为质量分数 1%、3%、6%、9%。摇瓶培养根据参考文献[20]进行操作。

1.2.5 SDS-PAGE 分析

取发酵液于 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 加入 5×Loading Buffer 后在沸水中煮 20 min, 室温下冷却。采用 12.5%的 PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备凝胶。电泳结束后, 添加 0.25%考马斯亮蓝染色液染色 2 h, 脱色后用凝胶成像系统拍照记录。

1.2.6 碱性蛋白酶的酶活测定

采用 Suc-AAPF-pNA assay 方法测定蛋白酶酶活<sup>[22]</sup>。酶活单位定义为: 在 37 °C 和 pH 8.5 条件下, 每分钟水解 0.1 mmol/L 的 Suc-AAPF-pNA 溶液释放

的对硝基苯胺(pNA)在 405 nm 处吸光值的增加为 1 个酶活单位, 以 AU/min 表示。

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶 SubC 基因的密码子优化与克隆

对 NCBI 数据库中的碱性蛋白酶编码序列 *subC* (来源于 *Bacillus licheniformis* CAB56500.1)进行密码子优化, 优化后的 *subC* 序列的 GC 含量从 51% 变为 57%。优化的 *subC* 碱基序列(命名为 *subC<sub>opt</sub>*)与野生型 *subC* 序列(命名为 *subC<sub>ori</sub>*)的相似度为 79.67%。以全基因合成的 *subC<sub>ori</sub>* 和 *subC<sub>opt</sub>* 序列为模板, 通过 PCR 扩增获得目的基因片段。通过组内已有的蛋白表达研究, 选择麦芽糖诱导的启动子 *P<sub>malA</sub>* 代替 pMA5 的组成型启动子 *P<sub>HpaII</sub>*<sup>[21]</sup>, 替换后的质粒命名为 pMATE。分别将 2 个目的基因通过 Gibson Assembly 无缝克隆方法克隆至质粒 pMATE 的诱导型麦芽糖启动子 *P<sub>malA</sub>* 序列下游, 获得重组表达载体 pMATE-*subC<sub>ori</sub>* 和 pMATE-*subC<sub>opt</sub>*。质粒构建过程中 DNA 电泳结果如图 2 所示。

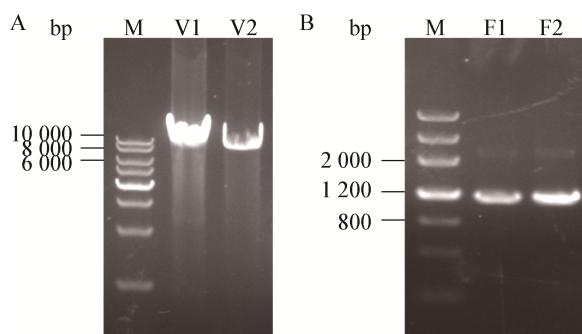


图2 质粒构建 DNA 电泳图

Figure 2 Electrophoretic diagram of DNA

注: M: DNA Marker。A: 线性化质粒 pMATE; B: 碱性蛋白酶编码基因 *subC<sub>ori</sub>* (F1)和 *subC<sub>opt</sub>* (F2)

Note: M: DNA Marker. A: Linearized plasmid pMATE; B: Alkaline protease encoding genes *subC<sub>ori</sub>* (F1) and *subC<sub>opt</sub>* (F2)

## 2.2 重组菌株的构建与鉴定

将测序正确的质粒 pMATE-*subC<sub>ori</sub>* 和 pMATE-*subC<sub>opt</sub>* 采用 Spizizen 化学转化方法分别转入 *B. subtilis* 1A751。为了能快速、直观地筛选阳性单克隆菌株,采用牛奶平板进行筛选。将枯草芽孢杆菌 1A751 感受态细胞稀释后,加入浓度为 0.1% (质量体积分数)的麦芽糖诱导剂,涂于含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素和 5% (质量体积分数)脱脂牛奶的 LB 筛选板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,菌落周围有透明圈的转化子为阳性转化子(图 3A),通过菌落 PCR 做进一步验证,得到重组菌株 1A751-*SubC<sub>ori</sub>* 和

## 1A751-*SubC<sub>opt</sub>*

从牛奶平板可以初步看出, pMATE-*subC<sub>ori</sub>* 和 pMATE-*subC<sub>opt</sub>* 这 2 种重组质粒在宿主菌株 *B. subtilis* 1A751 中均能表达,但表达水平有差异,其中转入 pMATE-*subC<sub>opt</sub>* 质粒的表达菌株具有更明显的透明圈。将菌株 1A751-*SubC<sub>opt</sub>* 和 1A751-*SubC<sub>ori</sub>* 活化,接入装有 3% (质量体积分数)浓度麦芽糖诱导剂和 25 mL 2 $\times$ SR 培养基的 250 mL 三角瓶中进行摇瓶发酵,发酵周期为 50 h。对发酵液上清进行酶活检测,采用 Suc-AAPF-pNA 作为蛋白酶酶活测定的底物,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.6 的条件下与稀释  $10^4$  倍后的蛋白酶粗酶液反应 5 min,然后通过酶标仪测定  $A_{405}$  的吸光度。如图 3B 所示,1A751-*SubC<sub>opt</sub>* 的酶活是 1A751-*SubC<sub>ori</sub>* 酶活的 1.74 倍。因此后续实验采用 pMATE-*subC<sub>opt</sub>* 重组质粒进行发酵及优化工作。

## 2.3 重组菌产碱性蛋白酶 SubC 发酵条件的优化

### 2.3.1 不同宿主菌株对产酶的影响

选取 MATE 表达系统宿主 *B. subtilis* 1A751、MA07 和 MA08 作为宿主细胞进行蛋白酶的表达水平验证分析,其中 MA08 表达强度最大。将 pMATE-*subC<sub>opt</sub>* 质粒采用 Spizizen 化学转化方法分别转入 *B. subtilis* 1A751、MA07 和 MA08,采用牛奶平板法初步验证不同宿主细胞的表达强度。从牛奶平板可以初步看出(图 4A),重组质粒在 3 种宿

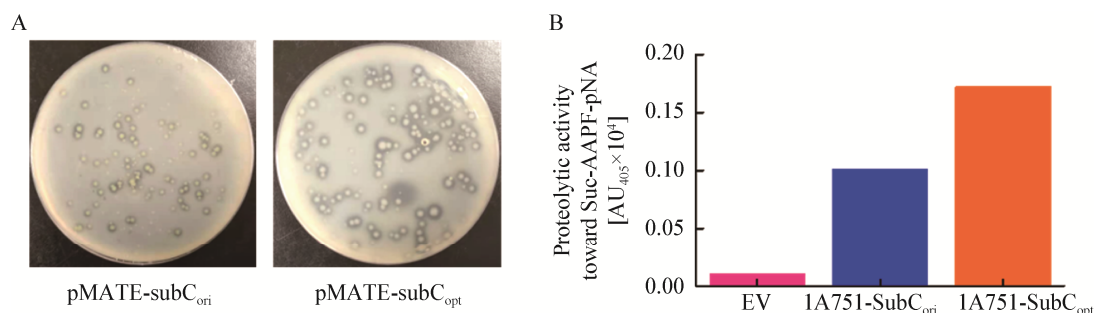


图3 不同密码子优化的碱性蛋白酶酶活分析

Figure 3 Analysis of alkaline protease activity with different codon optimization

注: A: 2 种不同密码子(*subC<sub>opt</sub>* 和 *subC<sub>ori</sub>*)优化的碱性蛋白酶的牛奶平板初筛; B: 2 种不同密码子的碱性蛋白酶酶活性分析(EV: 转入空载体的出发菌株)

Note: A: Two different codons (*subC<sub>opt</sub>* and *subC<sub>ori</sub>*) optimized alkaline protease milk plate; B: Two different codons of alkaline protease enzyme activity (EV: Original strain transferred into empty vector)



主菌株中的表达情况有较明显差异, 其中 MA08 菌株具有更明显的透明圈。

将菌株 1A751-SubC<sub>opt</sub>、MA07-SubC<sub>opt</sub>、MA08-SubC<sub>opt</sub> 活化, 在 2×SR 培养基中进行摇瓶发酵, 0 h 加入 3% (质量体积分数) 麦芽糖进行诱导, 50 h 对发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析及酶活性检测。由图 4B 明显观测到 3 种宿主菌株均能成功表达目标蛋白, 而且与理论预测的蛋白分子量大小(27.5 kD)一致。其中, 采用 MA08 宿主菌株表达的碱性蛋白酶酶量更大且酶活性更强(图 4C), 由此可以比较得出 3 种宿主菌株的表达强度为 MA08>MA07>1A751, 这与预期的宿主细胞的表达强度相符。

### 2.3.2 诱导剂浓度对产酶的影响

在上述实验基础上, 选择表达强度最大的宿主菌株 MA08 进行下一步摇瓶发酵优化。为了探究不同诱导剂浓度对碱性蛋白酶分泌的影响, 选择质量体积分数分别为 1%、3%、6%、9% 的 4 种不同浓度麦芽糖进行诱导。在 37 °C 培养条件下, 将 1%、3%、6%、9% 的麦芽糖分别加入到 250 mL 摇瓶中诱导表达 50 h。发酵完成后将 4 种不同麦芽糖浓度下的胞外培养基上清进行酶活分析, 由图 5 分析可知, 3% (质量体积分数) 浓度麦芽糖诱导的蛋白表达强度大于其他 3 种诱导浓度, 而且当麦芽糖浓度高于 3% (质量体积分数) 时, 随着麦芽糖浓度的提高, 酶活呈递减趋势。

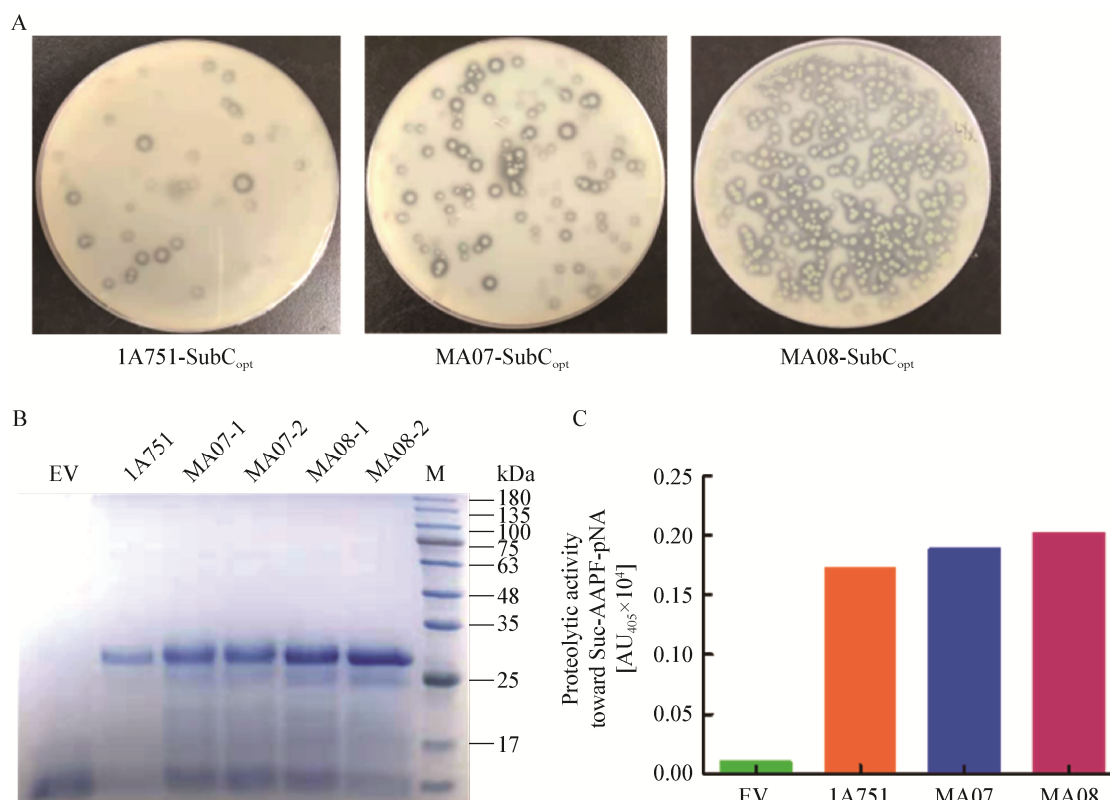


图 4 碱性蛋白酶 SubC 在 3 种宿主细胞中的胞外分泌表达情况分析

Figure 4 Analysis of extracellular secretion and expression of alkaline protease SubC in three host cells

注: A: 3 种不同宿主菌株表达碱性蛋白酶的牛奶平板初筛; B: 50 h 发酵液上清 SDS-PAGE(M: 蛋白 Marker); C: 酶活性分析(EV: 转入空载体的出发菌株)

Note: A: Primary screening of milk plates expressing alkaline protease from three different host strains; B: SDS-PAGE of 50 h fermentation broth supernatant (M: Protein Marker); C: Enzyme activity analysis (EV: Original strain transferred into empty vector)

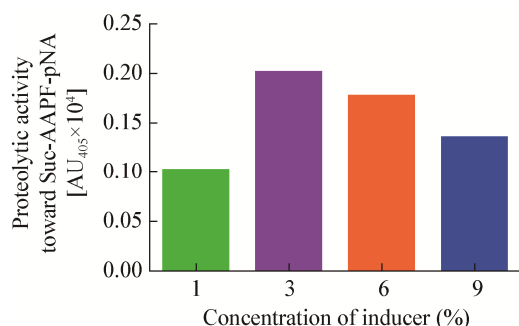


图5 碱性蛋白酶 SubC 在 4 种不同浓度诱导剂下的酶活性分析

Figure 5 Analysis of enzyme activity of alkaline protease SubC under four different concentrations of inducer

### 2.3.3 发酵培养基对产酶的影响

发酵培养基中营养成分的组成和比例是微生物生长和产酶过程中的重要影响因素。选择 2×SR 培养基和 MXR 培养基作对比, 考察不同发酵培养基对产酶的影响。MXR 培养基与 2×SR 相比, 碳源含量丰富而氮源相对含量较低。结果如图 6 所示, 摇瓶培养 50 h, 以 2×SR 为发酵培养基的菌株, 其蛋白酶几乎全部分泌至胞外且表达量较高。以 MXR 为发酵培养基, 菌体不进行蛋白酶的外泌, 胞内也只有少量蛋白酶存在, 说明 MXR 培养基的高碳源和低氮源的组成成分和比例不利于枯草芽孢杆菌生产碱性蛋白酶。

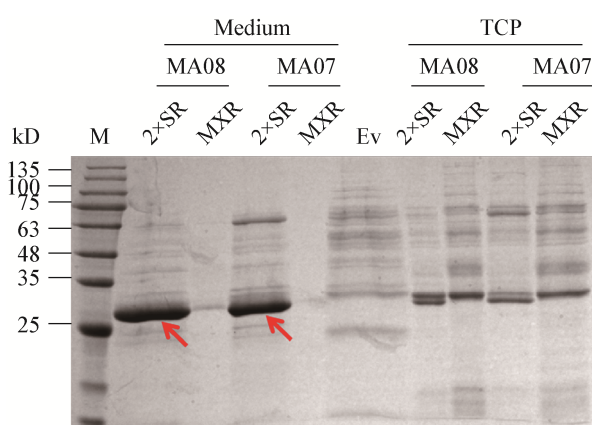


图6 碱性蛋白酶 SubC 在不同培养基的胞外和全菌表达情况的 SDS-PAGE 分析

Figure 6 SDS-PAGE analysis of extracellular and whole cell expression of alkaline protease SubC in different media

Note: M: Protein Marker

### 2.3.4 胞内蛋白可溶性分析

选取发酵培养基为 2×SR, 3% (质量体积分数) 麦芽糖诱导 50 h 的发酵液作为样品进行细胞破碎, 对胞内可溶(s)及包涵体(p)部分进行了 SDS-PAGE 分析(图 7)。结果表明蛋白酶的可溶性表达情况较好, 未见包涵体, 因此目前限制分泌效率的瓶颈因素主要为信号肽序列的匹配, 筛选合适的信号肽是进一步提高分泌表达效率的关键。

## 2.4 不同信号肽对碱性蛋白酶 SubC 分泌的影响

### 2.4.1 不同信号肽重组菌株碱性蛋白酶酶活验证

选择 6 种潜力较大的信号肽序列(AmyE、AprE、NprE、Pel、YddT、YoqM)作为初步筛选对象, 利用 Gibson Assembly 的方式将目的信号肽序列替换野生型信号肽序列。将构建完成的 6 株信号肽重组菌株, 采用 LB 培养基作为种子培养基, 发酵培养基采用 2×SR 培养基并添加 50 μg/mL 卡那霉素和 3%麦芽糖诱导物, 于 250 mL 摇瓶中发酵 50 h 进行后期的酶活测定工作。采用 Suc-AAPF-pNA 作为蛋白酶酶活测定的底物, 从图 8 酶活检测结果可以看出, 与携带野生型信号肽的对照组菌株 WT 相比, 只有 AmyE 和 YoqM 信号肽菌株表现出酶活提高, 其中 AmyE 信号肽菌株酶活提高最为显著, 提高幅度为 73.4%, 说明 AmyE 信号肽在促进 SubC 蛋白酶表达及分泌效率方面具有更好的效果。

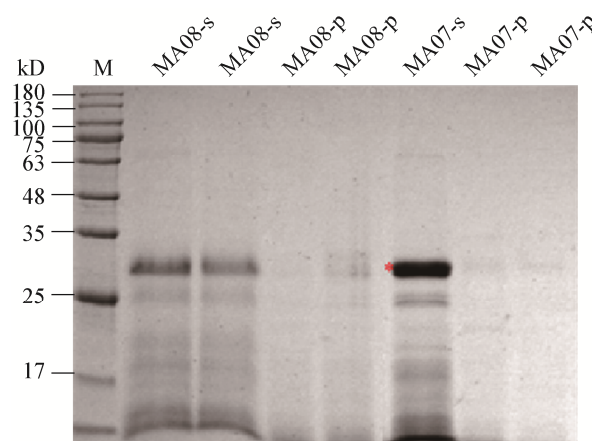


图7 蛋白酶表达菌株的胞内 SDS-PAGE 分析

Figure 7 Intracellular SDS-PAGE analysis of protease expressing strains

Note: M: Protein Marker



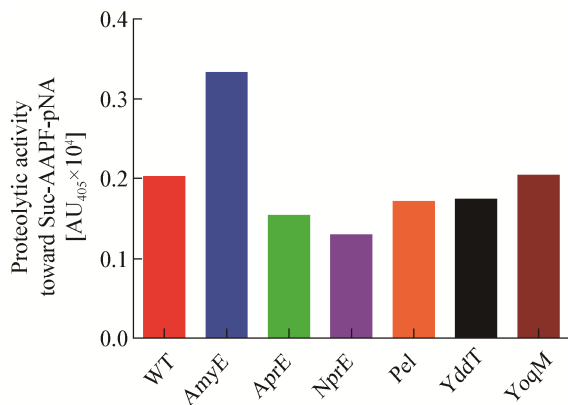


图 8 不同信号肽菌株的发酵上清液碱性蛋白酶酶活对比结果

Figure 8 Comparison results of alkaline protease activity in fermentation supernatant of different signal peptide strains

在此基础上,进一步对携带 WT 和 AmyE 信号肽菌株的胞内外蛋白酶酶活进行了对比,结果如图 9 所示。从图 9 中可以看出, AmyE 菌株的胞内和胞外酶活均高于对照组,其胞内酶活为胞外酶活的 54%, 对照组胞内酶活为胞外酶活的 59%, 说明 AmyE 信号肽对提高蛋白酶向胞外的转运效率具有促进作用,同时结果也表明仍有较多的蛋白酶留存在胞内。

进一步,将发酵周期延长至 60 h,观察胞外发酵液酶活是否能够进一步提升。结果显示延长发酵时间并未对发酵液上清的酶活有提升作用,其中 AmyE 作为之前最高的发酵酶活菌株在 60 h 时其发酵液酶活与 50 h 相比下降了 21.6% (图 10)。

#### 2.4.2 信号肽性质与分泌效率之间的相关性

为了探索信号肽序列特性与分泌效率之间的相关性,根据分泌效率(培养基中的 SubC 碱性蛋白酶酶活)和 6 种信号肽序列的特性进行不同的分析。使用 SignalP 4.1 Web 和 ExPASy Compute pI/Mw 工具计算 SubC 天然信号肽和枯草芽孢杆菌的 6 种信号肽的 D 值和 pI 值,并针对碱性蛋白酶 SubC 的酶活性作图以探究它们之间的相关性。图 11 结果表明,高效能信号肽的分泌效率与 D 值或 pI 值之间并未发现直接相关性。

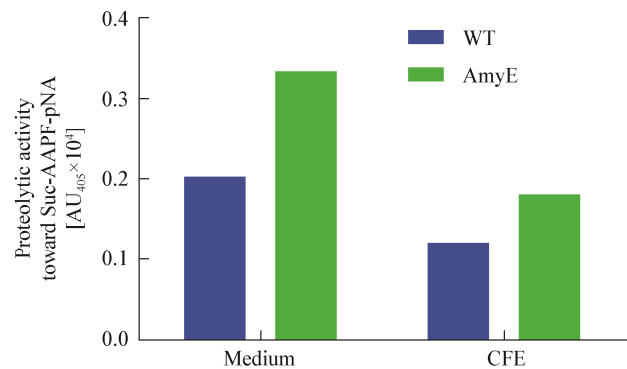


图 9 发酵菌株胞内及培养基中碱性蛋白酶酶活对比结果

Figure 9 Comparison results of alkaline protease activity in intracellular and medium of fermentation strains

注: Medium: 胞外酶活; CFE: 胞内酶活

Note: Medium: Extracellular enzyme activity; CFE: Intracellular enzyme activity

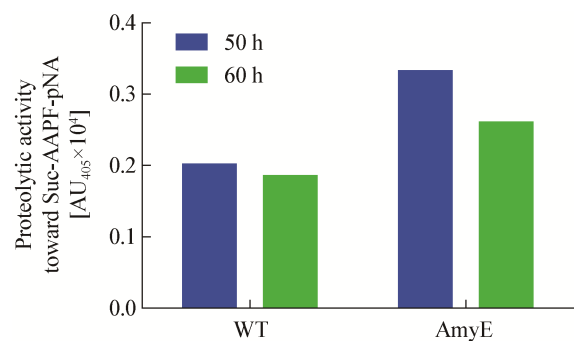


图 10 50 h 和 60 h 发酵上清液碱性蛋白酶酶活对比结果

Figure 10 Comparison results of alkaline protease activity in fermentation supernatant at 50 h and 60 h

### 3 讨论与结论

目前芽孢杆菌生产碱性蛋白酶在国内的研究总体趋势较好,利用基因工程和蛋白质工程可以对菌株及酶基因序列进行定向改造,进而使其达到更高的发酵酶活水平及最适的酶学特性。但国内仍然面临着菌种单一、作用范围窄、性能不足等问题,无法达到国际先进水平。在大规模工业生产应用中,碱性蛋白酶仍然主要依赖进口<sup>[23-24]</sup>。因此,开发新型碱性蛋白酶进一步提升产能、拓宽应用市场是当前研究的重点<sup>[25-26]</sup>。

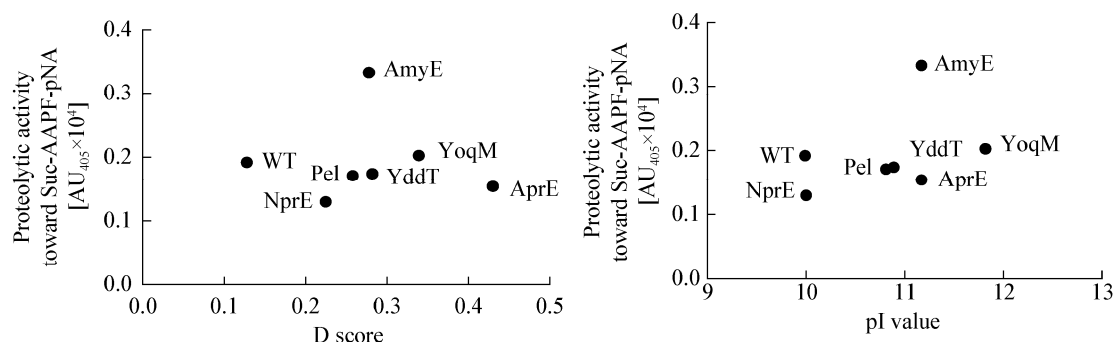


图 11 6 个信号肽的 D 值和 pI 值与 SubC 碱性蛋白酶分泌效率之间的相关性分析

Figure 11 Correlation analysis between D score and pI value of 6 signal peptides and secretion efficiency of SubC alkaline protease

培养基的组成成分和发酵周期均会影响微生物的生长和产物的生产。曹春红等<sup>[27]</sup>通过优化发酵培养基碳源、氮源的种类和浓度,同时优化发酵时长,使酶活有显著提高,同时降低生产成本。本研究将 2×SR 培养基和 MXR 培养基作对比,发现 MXR 培养基不适合菌株生长,我们猜测过量的碳源供应会引起营养阻遏,微生物不再向胞外分泌过量的蛋白酶,体现了微生物细胞具有环境适应性和代谢经济性。同时发现发酵周期过长会使酶活降低,可能是由于在摇瓶发酵条件下,发酵周期过长导致培养基中的营养物质不断被消耗,在营养物质匮乏的条件下菌株可能以自身产生的蛋白酶为底物进行降解,会导致酶活损失或枯草芽孢杆菌产的一些杂酶对蛋白酶产生一定的降解。

在枯草芽孢杆菌蛋白表达系统中,通过筛选和优化异源蛋白的前导信号肽,可以实现目标蛋白的胞外分泌<sup>[28]</sup>。由于不同物种信号肽的差异,异源分泌蛋白的天然信号肽与枯草芽孢杆菌内源分泌系统的相容性不一定最佳。Degering 等<sup>[19]</sup>对来源于枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的信号肽做了大量的研究,最终发现在地衣芽孢杆菌几丁质酶的信号肽 dBli00338 和枯草芽孢杆菌的信号肽 sYbdN 的指导下,枯草芽孢杆菌 TEB1020 和地衣芽孢杆菌 H402 中碱性蛋白酶的分泌和表达会大幅度提升。本实验根据组内已有的研究<sup>[12-13]</sup>,发现在 6 种潜力较高的信号肽中,来源于枯草芽孢杆菌的信号肽 AmyE 使

酶活有了明显提高,同时对胞内蛋白进行 SDS-PAGE 分析发现仍有大量蛋白酶未分泌到胞外。虽然已经有许多关于信号肽特征的研究<sup>[29-31]</sup>,但是仍然没有快速简单的方法来鉴定最适特定蛋白质的信号肽。为此,我们利用计算软件探究信号肽 D 值和 pI 值与蛋白分泌之间的相关性,结果表明它们之间无线性相关性,不能通过软件分析快速筛选得到目标蛋白的最适信号肽。因此我们分析,通过对信号肽进行建库,扩大信号肽的筛选范围,进行高通量筛选或同时优化蛋白转运元件和分子伴侣的方法会对提高分泌效率有较大帮助。

通过优化地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因密码子,本研究成功构建了碱性蛋白酶 SubC 表达菌株 1A751-subC,实现了碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的异源表达;然后,通过宿主菌株的选择和最佳信号肽的添加,构建了碱性蛋白酶 SubC 表达菌株 MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub>,进一步提高了枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶 SubC 的胞外分泌水平;最后,通过优化发酵条件,重组菌株 MA08-AmyE-subC<sub>opt</sub> 的胞外酶活性成功提高到  $3.33 \times 10^3$  AU/mL,其酶活力与携带野生型信号肽的对照组菌株 WT 相比,提高幅度为 73.4%。异源碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的成功表达,为碱性蛋白酶的表达和工业化应用提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a

- bioindustrial viewpoint[J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(7): 561-594
- [2] Vanitha N, Rajan S, Murugesan AG. Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste[J]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2014, 3(6): 36-44
- [3] Borrajo P, Pateiro M, Gagaoua M, Franco D, Zhang WG, Lorenzo JM. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of porcine liver protein hydrolysates obtained using alcalase, bromelain, and papain[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(7): 2290
- [4] Sutthiwanjampa C, Kim SM. Antioxidant, anti-tyrosinase and immunomodulatory activities of the enzymatic boiled Venus clam hydrolysate[J]. *Chiang Mai Journal of Science*, 2018, 45(1): 249-262
- [5] Xie JH, Du MX, Shen MY, Wu T, Lin LH. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*)[J]. *Food Chemistry*, 2019, 270: 243-250
- [6] Kula E, Kocadag Kocazorbaz E, Moulahoum H, Alpat S, Zihnioğlu F. Extraction and characterization of novel multifunctional peptides from *Trachinus draco* (greater weever) myofibrillar proteins with ACE/DPP<sub>4</sub> inhibitory, antioxidant, and metal chelating activities[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(5): e13179
- [7] Karami Z, Peighambari SH, Hesari J, Akbari-Adgerani B, Andreu D. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100450
- [8] Tacias-Pascacio VG, Morellon-Sterling R, Siar EH, Tavano O, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Use of alcalase in the production of bioactive peptides: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 2143-2196
- [9] Song YF, Nikoloff JM, Zhang DW. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7): 963-977
- [10] Liu YH, Wang HB, Liu FF, Zhang HT, Qin HM, Lu FP. The research and development of microbial alkaline protease[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2017, 32(2): 1-6,12 (in Chinese)  
刘逸寒, 王洪彬, 刘夫锋, 张会图, 秦慧民, 路福平. 微生物碱性蛋白酶的研究与开发[J]. *天津科技大学学报*, 2017, 32(2): 1-6,12
- [11] Zuber P, Healy JM, Losick R. Effects of plasmid propagation of a sporulation promoter on promoter utilization and sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(2): 461-469
- [12] Fu G, Liu JL, Li JS, Zhu BW, Zhang DW. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(50): 13141-13151
- [13] Li DD, Fu G, Tu R, Jin ZX, Zhang DW. High-efficiency expression and secretion of human FGF21 in *Bacillus subtilis* by intercalation of a mini-cistron cassette and combinatorial optimization of cell regulatory components[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 17
- [14] Zhang K, Su LQ, Duan XG, Liu LN, Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 32
- [15] Liu DY, Mao ZT, Guo JX, Wei LY, Ma HW, Tang YJ, Chen T, Wang ZW, Zhao XM. Construction, model-based analysis, and characterization of a promoter library for fine-tuned gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1785-1797
- [16] Liu X, Wang H, Wang B, Pan L. High-level extracellular protein expression in *Bacillus subtilis* by optimizing strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 151: 72-77
- [17] Zhou CX, Zhou HY, Li DK, Zhang HT, Wang HB, Lu FP. Optimized expression and enhanced production of alkaline protease by genetically modified *Bacillus licheniformis* 2709[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 45
- [18] Zhang RL, Liu QG, Wang M, Wang K, Zhu TH. Expression and application of *Bacillus subtilis* alkaline protease gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(7): 76-81 (in Chinese)  
张若兰, 刘庆国, 王敏, 汪琨, 朱廷恒. 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因在酿酒酵母中的表达和应用[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(7): 76-81
- [19] Degering C, Eggert T, Puls M, Bongaerts J, Evers S, Maurer KH, Jaeger KE. Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6370-6376
- [20] Chen JQ. The heterologous expression of  $\alpha$ -amylase, regulatory element optimization and identification of secretion bottleneck[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2015 (in Chinese)  
陈景奇.  $\alpha$ -淀粉酶的异源表达、调控元件优化和分泌瓶颈鉴定[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2015
- [21] Yue J, Fu G, Zhang DW, Wen JP. A new maltose-inducible high-performance heterologous expression system in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(8): 1237-1244

- [22] Thiele M, Davari MD, König, Melanie, Isabell H, Niklas J, Garakani M, Tayebbeh, Ljubica V, Joerg F, Ulrich S. Enzyme-polyelectrolyte complexes boost the catalytic performance of enzymes[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(11): 10876-10887
- [23] Gurumalles P, Alagu K, Ramakrishnan B, Muthusamy S. A systematic reconsideration on proteases[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 254-267
- [24] Barzkar N, Homaei A, Hemmati R, Patel S. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks[J]. Extremophiles, 2018, 22(3): 335-346
- [25] Yang JY, Feng YY, Chen XL, Xie BB, Zhang YZ, Shi M, Zhang XY. Family-level diversity of extracellular proteases of sedimentary bacteria from the South China Sea[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2019, 38(12): 73-83
- [26] Gao XL, Yin YY, Yan JK, Zhang JK, Ma HL, Zhou CS. Separation, biochemical characterization and salt-tolerant mechanisms of alkaline protease from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(7): 3359-3366
- [27] Cao CH, Li S, Wang HY, Zhang GM, Cai HY. The *Bacillus amyloliquefaciens* YF03 producing protease optimization of fermentation medium and fermentation conditions[J]. Feed Industry, 2020, 41(10): 23-29 (in Chinese)
- 曹春红, 李爽, 王海燕, 张广民, 蔡辉益. 解淀粉芽孢杆菌 YF03 产蛋白酶发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 饲料工业, 2020, 41(10): 23-29
- [28] Mu DD, Lu JJ, Qiao MQ, Kuipers OP, Zhu J, Li XJ, Yang PZ, Zhao YY, Luo SZ, Wu XF, et al. Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(13): 5533-5543
- [29] Guan CR, Cui WJ, Cheng JT, Liu R, Liu ZM, Zhou L, Zhou ZM. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*[J]. New Biotechnology, 2016, 33(3): 372-379
- [30] Liu YH, Shi CS, Li DK, Chen XJ, Li JL, Zhang YW, Yuan H, Li Y, Lu FP. Engineering a highly efficient expression system to produce BcaPRO protease in *Bacillus subtilis* by an optimized promoter and signal peptide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 903-911
- [31] Wei XT, Zhou YH, Chen JB, Cai DB, Wang D, Qi GF, Chen SW. Efficient expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis*: host strain construction and signal peptide optimization[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 287-295