

研究报告

基于启动子和信号肽优化提高谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达

毛泽敬^{1,2,3}, 张祖政⁴, 陈铭^{1,2,3}, 望松柏^{1,2,3}, 牛硕^{1,2,3}, 余华顺^{1,2,3}, 张彦^{1,2,3}, 郑贤良^{*1,2,3}

1 安琪酵母股份有限公司, 湖北 宜昌 443003

2 酵母功能湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443003

3 农业微生物挖掘与利用全国重点实验室, 湖北 宜昌 443003

4 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

毛泽敬, 张祖政, 陈铭, 望松柏, 牛硕, 余华顺, 张彦, 郑贤良. 基于启动子和信号肽优化提高谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1536-1549.

MAO Zejing, ZHANG Zuzheng, CHEN Ming, WANG Songbai, NIU Shuo, YU Huashun, ZHANG Yan, ZHENG Xianliang. Promoter and signal peptide optimization increases the secretory expression of glutaminase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1536-1549.

摘要: 【背景】谷氨酰胺酶(glutaminase)是一种能够催化 L-谷氨酰胺水解生成 L-谷氨酸和氨的酶, 在食品、医药等领域有重要的应用价值。【目的】研究不同启动子和信号肽对谷氨酰胺酶分泌表达的影响、构建能高效分泌表达谷氨酰胺酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)工程菌株, 提高谷氨酰胺酶的产量。【方法】选用枯草芽孢杆菌 SCK6 作为表达宿主, 构建带有不同启动子和信号肽的谷氨酰胺酶表达载体及重组菌株, 分析不同基因元件对谷氨酰胺酶表达及分泌的影响, 筛选最优启动子和信号肽, 组合优化, 构建高效分泌表达谷氨酰胺酶的工程菌株。【结果】实现了谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达, 在以 P_{HpaII} - P_{aprE} 为启动子、YndA 为信号肽的条件下, 摇瓶发酵胞外最高酶活达到 6.7 U/mL。【结论】通过对启动子、信号肽关键基因元件进行筛选组合, 构建了一株高效分泌表达谷氨酰胺酶的菌株, 为酶的高效分泌表达提供了一种有效的方法。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 谷氨酰胺酶; 启动子; 信号肽; 分泌表达

资助项目: 山东省重点研发计划(2022CXGC020712)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2022CXGC020712).

*Corresponding author. E-mail: zhengxl@angelyeast.com

Received: 2023-07-19; Accepted: 2023-11-17; Published online: 2024-01-04

Promoter and signal peptide optimization increases the secretory expression of glutaminase in *Bacillus subtilis*

MAO Zejing^{1,2,3}, ZHANG Zuzheng⁴, CHEN Ming^{1,2,3}, WANG Songbai^{1,2,3}, NIU Shuo^{1,2,3}, YU Huashun^{1,2,3}, ZHANG Yan^{1,2,3}, ZHENG Xianliang^{*1,2,3}

1 Angel Yeast Limited Company, Yichang 443003, Hubei, China

2 Hubei Provincial Key Laboratory of Yeast Function, Yichang 443003, Hubei, China

3 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Yichang 443003, Hubei, China

4 College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

Abstract: [Background] Glutaminase is an enzyme which can catalyzes the hydrolysis of L-glutamine to L-glutamic acid and ammonia, and it has been well used in the food and medicine fields. [Objective] To study the influences of different promoters and signal peptides on the secretory expression of glutaminase and construct recombinant *Bacillus subtilis* strains with efficient secretory expression of glutaminase to improve the production of glutaminase. [Methods] *B. subtilis* SCK6 was selected as the host, and the glutaminase expression vectors and recombinant strains with different promoters and signal peptides were constructed. The effects of different gene elements on the expression and secretion of glutaminase were studied, and the optimal promoter and signal peptide were selected and combined to construct an efficient and robust glutaminase-producing strain. [Results] A recombinant strain with efficient secretory expression of glutaminase was constructed. With P_{HpaII}-P_{aprE} as the promoter and YndA as the signal peptide, the strain showed the extracellular glutaminase activity reaching 6.7 U/mL in shake flask fermentation. [Conclusion] By screening and combining the promoter and signal peptide, we constructed a recombinant strain with robust production of glutaminase, providing an effective method for the efficient secretory expression of enzymes.

Keywords: *Bacillus subtilis*; glutaminase; promoter; signal peptide; secretory expression

谷氨酰胺酶(glutaminase)是一种能够催化 L-谷氨酰胺水解生成 L-谷氨酸和氨的酶,广泛存在于细菌、丝状真菌和酵母等微生物细胞中^[1]。谷氨酰胺酶在食品、医药等领域有重要的应用价值^[2-3]。在食品工业上,谷氨酰胺酶可以应用在酱油的生产中,将酱油中的谷氨酰胺水解为谷氨酸,增加酱油的鲜味,同时减少酱油发酵过程中焦谷氨酸的生成,大幅度提高酱油的品质^[4-6];在医药领域中,谷氨酰胺酶在碱性条件下可以催化 L-谷氨酰胺和乙胺合成茶氨酸,茶氨酸具有保护神经、降低血压和抗肿瘤等多种有益的生理

功能^[7]。2015 年以前,工业上生产谷氨酰胺酶主要以用野生菌,如黄色微球菌、芽孢杆菌和曲霉等进行发酵为主,但产量通常不理想,提升酶活的策略也主要集中在发酵条件优化方面^[2,8-9]。2015 年以后,陆续出现采用分子生物学和基因工程技术构建酶活提升、性能优化的谷氨酰胺酶工程菌种的研究^[10-13]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种革兰氏阳性好氧细菌,被美国食品药品监督管理局认定为一般认为安全的(generally recognized as safe, GRAS)菌株。枯草芽孢杆菌具有强大的蛋

白分泌能力和相对完善的载体/宿主系统,是一种优良的工业酶制剂表达宿主。菌株 SCK6 是枯草芽孢杆菌 1A751 的衍生菌株,具有较高的转化效率,适合 pDG1730、pHT01 等多种芽孢杆菌载体的高效转化^[14],成功表达过塔格糖-6-磷酸酶、磷酸塔格糖异构酶等多种外源蛋白^[15-16],因此可以选择枯草芽孢杆菌 SCK6 作为谷氨酰胺酶分泌表达的宿主菌,采用分子生物技术手段构建能分泌表达谷氨酰胺酶的工程菌株。整合信号肽和启动子工程技术是实现谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中高效分泌表达较为有效的手段^[17-20]。

启动子是位于结构基因 5'上游且能与 RNA 聚合酶发生特异性识别和结合的一段 DNA 序列,是蛋白高效表达的重要调控元件。P₄₃、P_{HpaII}和 P_{amyQ}等均为常用的组成型强启动子,能高效启动普鲁兰酶、淀粉酶等多种外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达^[21-23]。另外有研究表明,与单启动子相比,双启动子可以显著增强基因转录^[24]。启动子并非越强越好,须根据特定的目的基因、宿主等条件进行具体筛选。另据报道,信号肽与蛋白质的转运密切相关,针对外源蛋白基因建立信号肽库,筛选与目的蛋白匹配度最高的信号肽已成为提高外源蛋白分泌量的有效手段^[25]。目前,商业化含有枯草芽孢杆菌 173 种 Sec 途径信号肽的杂合文库产品能大大简化最优信号肽的筛选工作。陈龙军等以该文库为基础构建 α -环糊精酶的信号肽文库,筛选获得 9 条表达 α -环糊精酶效率高的信号肽,以 citH 信号肽引导分泌效率最高,重组菌株胞外 α -环糊精酶活力最高达到野生菌株的 14 倍左右^[26]。

根据文献^[27]报道,不同来源的谷氨酰胺酶性质差别较大,研究发现来源于芽孢杆菌的谷氨酰胺酶具有一定的耐盐性,更适合在食品领域特别是酱油生产上的应用。因此,本研究以枯草芽孢杆菌 SCK6 为表达宿主,选择来源于解淀粉芽

孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) UMAF6639 的谷氨酰胺酶基因 *Bagls*,研究不同启动子和信号肽对谷氨酰胺酶分泌表达的影响,构建能高效分泌表达谷氨酰胺酶的枯草芽孢杆菌工程菌株,为谷氨酰胺酶的产业化生产及开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

枯草芽孢杆菌 SCK6、大肠杆菌 TOP10 和载体 pMA5 为本实验室保存;pUC-*Bagls*、pUC-P_{amyQ}-P_{HpaII}、pUC-P_{spovG}-P_{hag}-P_{yvyD}、pUC-P_{aprE}-P_{HpaII}和 pUC-P_{HpaII}-P_{aprE}载体委托武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成构建。枯草芽孢杆菌表达载体 pBE-S DNA 为宝日医生物技术(北京)有限公司产品。本研究中用到的引物见表 1。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0,固体培养基另添加琼脂粉 18.0,pH 7.0。摇瓶发酵培养基(g/L):蛋白胨 12.0,酵母粉 24.0,KH₂PO₄ 2.3,K₂HPO₄·3H₂O 21.5,甘油 10.0,pH 7.5。LBS 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0,山梨醇 90.0,pH 7.0。电转培养基(g/L):山梨醇 90.0,甘露醇 92.5,甘油 100.0。转化复苏培养基(g/L):山梨醇 90.0,甘露醇 70.0,蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0。

1.3 主要试剂和仪器

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒和分泌型蛋白质表达系统 *B. subtilis* Secretory Protein Expression System 试剂盒(含有 SP DNA mixture 和 pBE-S DNA 质粒),宝日医生物技术(北京)有限公司产品;NEBuilder[®]高保真 DNA 组装预混液试剂盒,New England Biolabs 公司;BM2000 DNA Marker、DL8000 DNA Marker、50×TAE Buffer 和 6×TriDye DNA/RNA Loading

表 1 试验所用引物

Table 1 All the primers used in this study

引物名称	序列
Primer name	Sequence (5'→3')
P1	GGCCGGTGCACATATGATGAAAAAAAAAAAAAT
P2	GTGATAAACTACCGCATCATTTTCCCATTTTAAAG
P3	TGATGCGGTAGTTTATCAC
P4	CATATGTGCACCGGCC
M1	CGCGTCCC TCTCCTT TTGCTTAAGT TCAGAGTAG
E1	GGCCGGTGCACATATGGAGCTCGGTACCCTCG AG
P5	TGGGTCTACTAAAATAT
P6	ATGCCTGACATCATAGGTT
P7	CAGTTCTAATGTGTAATGAGGTTCCGATTCATCTAT
P8	ACTACCTTAGTGAATCTCATCATATGTAAATCGCTCCTT
P9	CAGTTCTAATGTGTAATGAGGTTCTTTTCTGTATG
P10	ACTACCTTAGTGAATCTCATACGCGTCCCTC
P11	CAGTTCTAATGTGTAATGAGACGGACAATATTTTG
P12	CATAGTAGTTCACCACCTTTTCC
P13	CAGTTCTAATGTGTAATGAGTGAAGTAAAAGTGAT
P14	CATTGTTTTGTTCCCTCCCTGAATATG
P15	CAGTTCTAATGTGTAATGAGGATCAATTGGTTTCTT
P16	CATCAAAGAACGCCTCCCTTTTAT
P17	CAGTTCTAATGTGTAATGAGGGCGGCGTTCTGTTTCTGC
P18	ACTACCTTAGTGAATCTCATTCTTGACACTCCTTATTTGA
P19	GGGAAAAATGAGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGC
P20	CTCATTACACATTAGAACTGCGAATCCATCTTCAT
P21	ATGAGATTCACCTAAGGTAGTTGG
P22	GCTTGAGCTCGACTCTAGAGGATCCTCATTTTCC
P23	ATTGCCAGTCGGGGATAT
P24	GTGCCTTTCGTGACACGTTT

Buffer, 北京博迈德基因技术有限公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、L-谷氨酰胺和香柏油等, 北京索莱宝科技有限公司; PCR 纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit, OMEGA 公司; 高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒, 北京擎科新业生物技术有限公司; SurePAGE 蛋白预制胶、5×Sample Buffer、Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder、Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard, 南京金斯瑞生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。PCR 仪、核酸电泳仪、蛋白电泳仪、凝胶成像系统和电穿孔仪, Bio-Rad

公司; 超净工作台, 益世科(上海)企业发展有限公司; 生化培养箱, 莱特(南通)科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 生物传感分析仪, 深圳市西尔曼科技有限公司。

1.4 不同信号肽表达载体的构建

利用枯草芽孢杆菌的 173 种信号肽基因序列和大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pBE-S DNA 构建含不同信号肽的谷氨酰胺酶重组表达载体文库。谷氨酰胺酶基因序列(登录号为 BAMY6639_00855)获取自 NCBI, 由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 命名为 pUC-Bagls。

以 pUC-Bagls 质粒为模板, 使用 P1/P2 为引

物对进行 PCR 扩增获得 *Bagls* 基因序列; 以 pBE-S DNA 质粒为模板, 利用 P3/P4 为引物进行 PCR 扩增获得载体骨架基因序列, PCR 反应条件和体系按照 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书操作。利用 PCR 纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit 回收纯化 PCR 产物; 按照 NEBuilder[®]高保真 DNA 组装预混液试剂盒说明书将两个片段的回收产物进行组装连接, 得到连接产物。采用化学转化法将连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 用含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素抗性的 LB 平板和菌落 PCR 筛选阳性克隆, 菌落 PCR 反应条件和体系参考 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书操作。利用高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒提取阳性转化子质粒, 质粒送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序, 测序正确的重组质粒命名为 pBE-*Bagls*。

以 pBE-*Bagls* 质粒为模板, 在信号肽 AprE 上下游分别设计反向引物 M1 和 E1, 对该表达载体进行线性化 PCR 扩增, PCR 反应条件和体系按照 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书操作。利用 PCR 纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit 回收纯化 PCR 产物; 按照 NEBuilder[®]高保真 DNA 组装预混液试剂盒说明书操作将回收的线性载体片段与 SP DNA mixture 进行组装连接得到连接产物。将连接产物与大肠杆菌 TOP10 感受态细胞混匀孵育进行转化, 转化产物涂布于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜至长出单菌落。收集平板上长出的所有单菌落转接到同一个摇瓶中, 培养基为含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素抗性的液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜约 12 h, 利用高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒提取培养物中的质粒, 该质粒为含有不同信号肽的混合重组质粒, 即为谷氨酰胺酶信号肽表达载体文库 pBE-SP-*Bagls*。

1.5 不同启动子表达载体的构建

选用 8 种高效率启动子进行表达载体的构建, 分别为单启动子 P_{HpaII} 、 P_{aprE} 、 P_{spovG} 、 P_{hag} 、 P_{yyvD} 和 P_{amyQ} , 以及双启动子 P_{aprE} - P_{HpaII} 、 P_{HpaII} - P_{aprE} 。以 pBE-S DNA、pUC- P_{aprE} - P_{HpaII} 和 pUC- P_{HpaII} - P_{aprE} 质粒为模板, 使用 P9/P10、P9/P8 和 P7/P10 为引物 PCR 扩增获得启动子 P_{aprE} 以及双启动子 P_{aprE} - P_{HpaII} 和 P_{HpaII} - P_{aprE} 基因序列; 以 pUC- P_{amyQ} - P_{HpaII} 质粒为模板, 分别使用 P7/P8 和 P17/P18 为引物 PCR 扩增获得启动子 P_{HpaII} 和 P_{amyQ} 基因序列; 以 pUC- P_{spovG} - P_{hag} - P_{yyvD} 质粒为模板, 分别使用 P11/P12、P13/P14 和 P15/P16 为引物 PCR 扩增获得启动子 P_{spovG} 、 P_{hag} 和 P_{yyvD} 基因序列; 以 pMA5 质粒为模板, 使用 P19/P20 引物 PCR 扩增获得相对应的载体骨架基因序列; 以筛选到的含有最优信号肽的质粒为模板, 使用 P21/P22 为引物 PCR 扩增获得含有最优信号肽的 *Bagls* 基因序列。PCR 反应条件和体系按照 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书操作。利用 PCR 纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit 回收纯化 PCR 产物; 按照 NEBuilder[®]高保真 DNA 组装预混液试剂盒说明书将对应的 3 个片段的回收产物进行组装连接。采用化学转化法将连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 用含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素抗性的 LB 平板和菌落 PCR 筛选阳性克隆, 菌落 PCR 反应条件和体系参考 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书。利用高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒提取阳性转化子质粒, 质粒送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序, 测序正确的重组质粒分别命名为 pMA5-g1、pMA5-g2、pMA5-g3、pMA5-g4、pMA5-g5、pMA5-g6、pMA5-g7 和 pMA5-g8。

1.6 重组菌株的构建

感受态细胞的制备: 接种枯草芽孢杆菌 SCK6 于 2 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min

培养过夜。取 1 mL 过夜培养物接入 100 mL LBS 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 OD_{600} 至 0.8 以上。将菌液冰水浴 10 min, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用 50 mL 预冷的电转培养基重悬菌体, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 去上清, 继续用预冷的电转培养基漂洗 4 次。将洗涤后的菌体重悬于 2.5 mL 电转培养基中, 分装即得到 SCK6 感受态细胞。

转化: 采用电转化方法将 1.4 的混合重组质粒电转化至 SCK6 感受态细胞中, 得到转化产物, 转化产物涂布于含 100 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜(约 12 h)至转化子出现, 经菌落 PCR 验证得到携带不同信号肽的重组菌株。将 1.5 的 8 种重组质粒分别与枯草芽孢杆菌 SCK6 感受态细胞混匀, 电击转化至 SCK6 细胞中, 得到转化产物, 将转化产物涂布于含 100 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜(约 12 h)至转化子出现, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 得到携带不同启动子的重组菌株 SG-1、SG-2、SG-3、SG-4、SG-5、SG-6、SG-7 和 SG-8。

1.7 重组谷氨酰胺酶的表达

96 深孔板发酵: 将 1.6 得到的重组菌接种于装有含 100 mg/L 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基的 96 深孔板中, 37 °C、800 r/min 振荡培养 12 h, 按 1% 接种量将种子液接种至装有含 100 mg/L 卡那霉素抗性的发酵培养基的 96 深孔板中, 37 °C、800 r/min 振荡培养 48 h, 收集发酵液于 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液用于测定胞外酶活。

250 mL 摇瓶发酵: 将含有不同质粒的重组菌各接入装有 50 mL 含 100 mg/L 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 8 h, 按 2% 的接种量将种子

液接种至装有 100 mL 含 100 mg/L 卡那霉素抗性的发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 90 h。收集发酵液于 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液用于测定胞外酶活和蛋白检测。

1.8 酶活力测定方法

采用生物传感器法^[28]检测谷氨酰胺酶酶活: 吸取 1.0 mL 酶液于试管, 在 37 °C 水浴中保温 5 min; 加 1.0 mL 谷氨酰胺底物溶液, 立即计时在 37 °C 水浴中反应; 准确反应 10 min 后, 加 1.0 mL 0.75 mol/L 高氯酸溶液, 混匀, 冰浴 1 min; 再加 1.0 mL 0.75 mol/L 氢氧化钠溶液, 混匀得混合液; 在检测谷氨酸之前配制好生物传感分析仪所需缓冲液, 并定标; 分别取得到的酶促反应混合液和空白对照混合液 25 μ L 进样检测谷氨酸含量, 最后计算谷氨酰胺酶酶活。本研究一个酶活力单位(U)定义为: 在 37 °C 下每分钟催化谷氨酰胺生成 1 μ g 谷氨酸所需的谷氨酰胺酶量。

1.9 SDS-PAGE 分析

取 25 μ L 发酵上清液至离心管中, 加入 5 μ L 上样电泳缓冲液, 沸水中煮沸 10 min, 冷却后 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液作为电泳上样品。采用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 30 min 后取出分离胶, 用考马斯亮蓝染色 1 h, 用脱色液脱色后凝胶成像系统检测条带。

1.10 数据处理

数据采用软件 Minitab 21.3.1.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建流程

基于不同基因表达元件优化的谷氨酰胺酶表达载体构建流程示意图如图 1 所示。

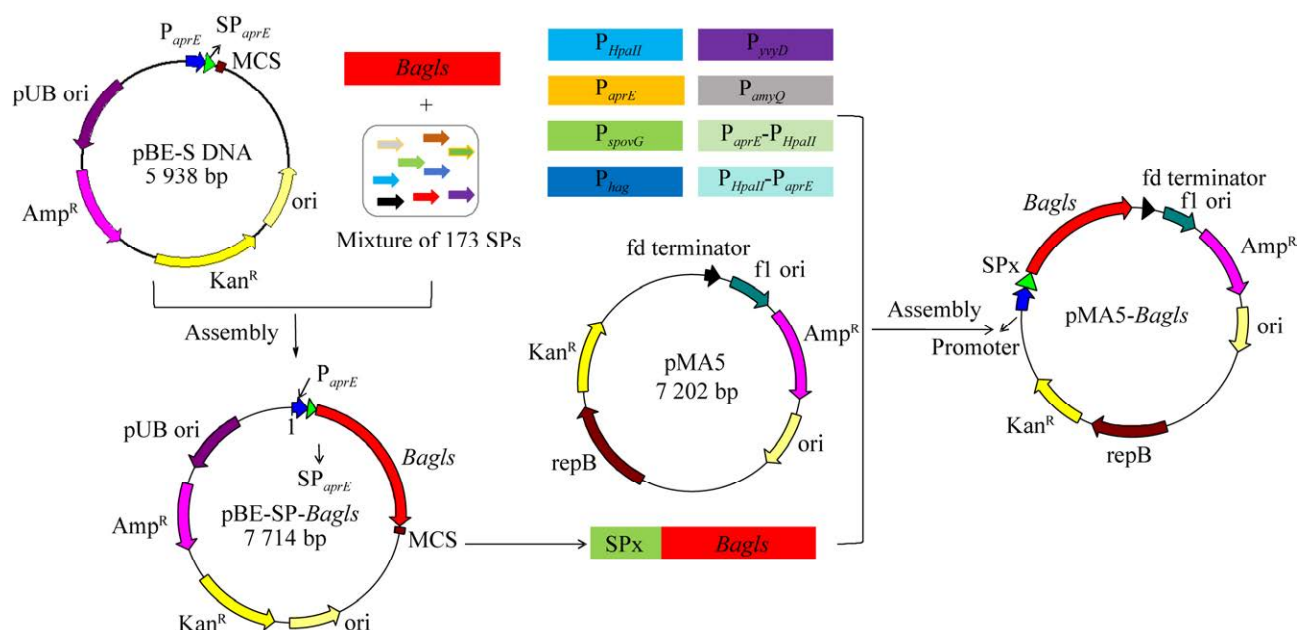


图1 谷氨酰胺酶表达载体构建示意图

Figure 1 Schematic diagram of construction of glutaminase expression vectors.

2.2 不同信号肽重组菌株的构建

SP DNA mixture 包含能编码 173 种枯草芽孢杆菌分泌信号肽的 DNA 片段, 本文采用 Gibson 组装的方法将线性载体 pBE-*Bagls* 与 SP DNA mixture 进行组装连接获得谷氨酰胺酶信号肽表达载体文库 pBE-SP-*Bagls*。电转化 SCK6 抗性平板共筛选到 317 个转化子, 随机挑取筛选平板上生长的 10 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定引物对为 P5/P6, 对应 PCR 产物大小在 480 bp 左右, 菌落 PCR 验证结果见图 2, 检测目的基因条带大小与预期相符。

PCR 产物回收送测序, 测序结果经比对检测出 7 种不同信号肽序列。说明筛选平板上长出的大部分单菌落为阳性转化子, 并且不同信号肽序列在转化子中有一定的分布, 携带不同信号肽的重组谷氨酰胺酶菌株成功构建。

2.3 不同信号肽对谷氨酰胺酶表达的影响

将 317 株重组谷氨酰胺酶菌株进行孔板发酵, 发酵上清液酶活检测结果热图如图 3 所示, 其中颜色越深表明检测酶活越高, 颜色越浅表

明酶活越低。白色代表未检测到酶活。经酶活检测初筛, 得到 28 株酶活相对较高的谷氨酰胺酶重组菌株。将初筛得到的 28 株菌株进行摇瓶发酵, 发酵 90 h 胞外酶活检测结果如图 4 所示。

根据上述摇瓶发酵结果, 2、65、119、128、149、154、155、237、240 和 254 号重组菌株发酵液酶活相对较高。选择这 10 株菌株进行 PCR 扩增检测, 测序鉴定对应的信号肽序列, 序列结果如表 2 所示。

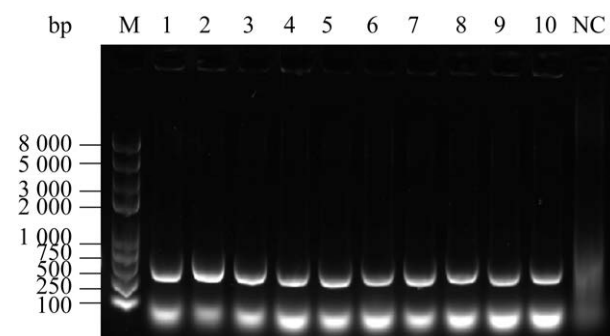


图2 菌落 PCR 验证 M:DL8000 DNA Marker; 1-10: 1-10 号转化子的 PCR 验证; NC: 阴性对照

Figure 2 Colony PCR confirmation. M: DL8000 DNA Marker; 1-10: PCR confirmation for 1-10 transformants; NC: Negative control.

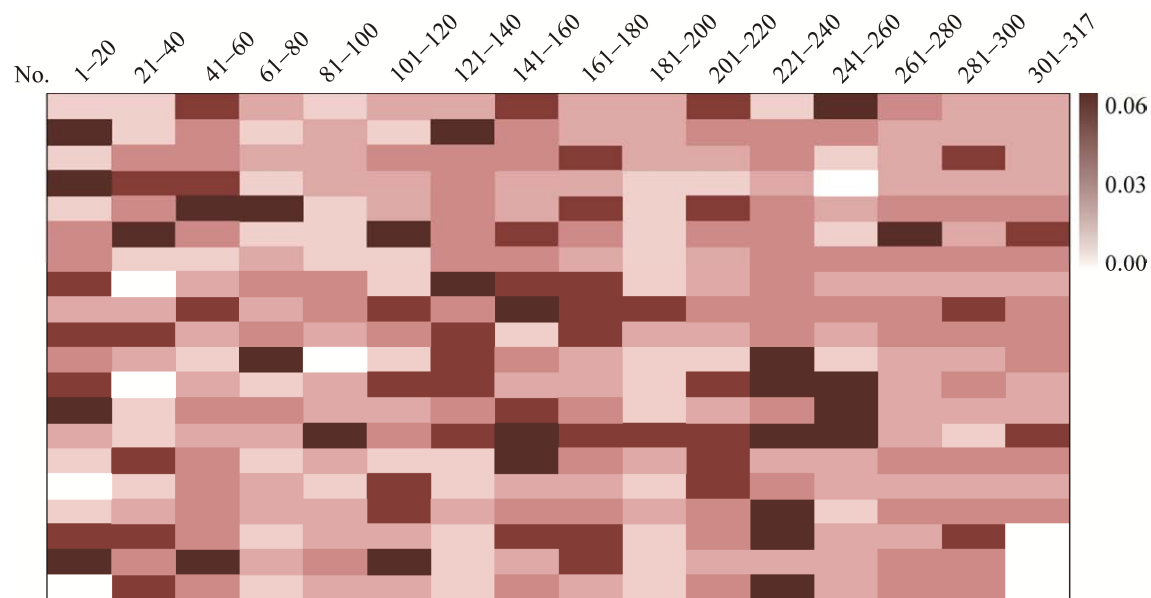


图 3 重组菌株酶活初筛结果热图
Figure 3 Heat map analysis of enzyme activity of recombinant strains.

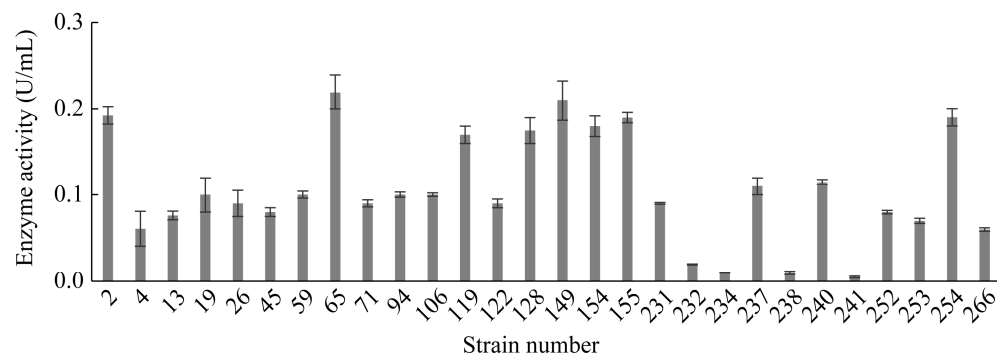


图 4 不同重组菌株摇瓶发酵胞外酶活
Figure 4 Extracellular enzyme activity of different recombinants.

表 2 信号肽氨基酸序列表
Table 2 Amino acid sequence of signal peptide

菌株序号	信号肽名称	信号肽氨基酸序列
Strain No.	Signal peptide	Signal peptide amino acid sequence
2, 119, 128, 254	AprE	VRSKKLWISLLFALTLLIFTMAFSNMSAQA
65	YndA	MRFTKVVGFLSVLGLAAVFPLTAQA
149	YwqO	MKFLLSVIAGLLILALYLFWKVQPPVWI
154, 155	YjcM	MKKELLASLVCLSLSPVSTNEVFA
237, 240	AmyE	MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASA

经检测, 摇瓶发酵酶活较高菌株分别含有 AprE、YndA、YwqO、YjcM 和 AmyE 这 5 种信号肽。参考酶活数据选择 2、65、149、155 和 240 号重组菌株再次进行摇瓶发酵, 含空载体的菌株作为空白对照 CK, 发酵 90 h 胞外酶活检测结果如图 5 所示, 发酵上清液蛋白电泳检测结果如图 6 所示。

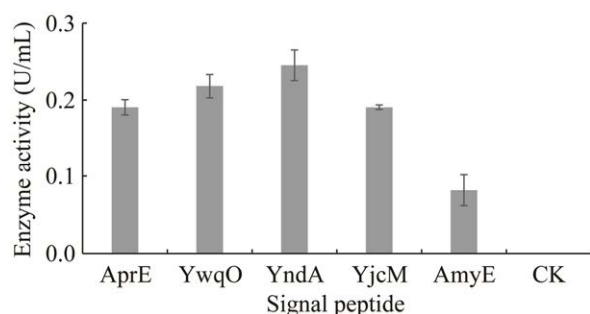


图 5 不同信号肽对酶分泌表达的影响

Figure 5 Effects of different signal peptides on enzyme secretory expression.

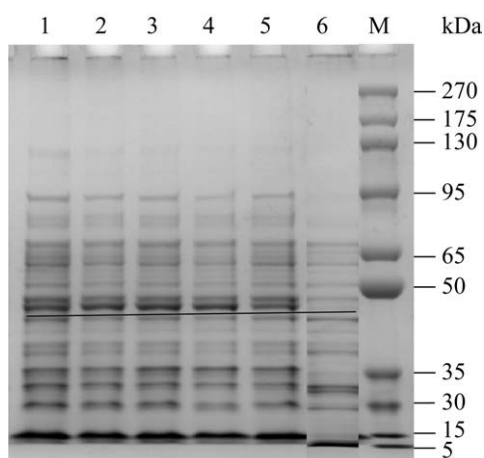


图 6 含不同信号肽重组菌株发酵液 SDS-PAGE 结果 M: 蛋白标准分子量; 1: AprE; 2: YwqO; 3: YndA; 4: YjcM; 5: AmyE; 6: 对照. 直线所示为目的蛋白

Figure 6 SDS-PAGE analysis for strains with different signal peptides. M: Protein marker; 1: AprE; 2: YwqO; 3: YndA; 4: YjcM; 5: AmyE; 6: Control. Straight line shows target protein.

由图 5 可知, 酶活最高菌株为携带信号肽 YndA 的 65 号菌株, 胞外活性达 (0.24 ± 0.02) U/mL; 其次为携带信号肽 YwqO 的 149 号菌株, 胞外活性为 (0.22 ± 0.02) U/mL; 携带信号肽 AprE 的 2 号菌株和携带信号肽 YjcM 的 155 号菌株胞外酶活相当, 在 0.19 U/mL 左右, 略低于 149 号菌株的酶活; 酶活最低的菌株为携带信号肽 AmyE 的 240 号菌株, 胞外活性仅为 (0.08 ± 0.02) U/mL, 是 65 号菌株酶活的三分之一。由图 6 可知, 与无目的基因的对照菌株相比, 5 株重组菌株的发酵上清液在 45 kDa 左右出现明显目标蛋白条带, 与预期的蛋白相对分子质量一致。通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白含量检测及 SDS 蛋白电泳检测, 携带信号肽 YndA 的 65 号菌株(图 6)发酵液目的蛋白含量较高, 与酶活检测数据基本一致。

通过对图 4、5 和 6 的分析表明, 枯草芽孢杆菌重组菌株对于谷氨酰胺酶的分泌表达水平受信号肽种类的影响, 不同信号肽介导下重组菌株谷氨酰胺酶的分泌表达水平差距较大。相较而言, 信号肽 YwqO 和信号肽 YndA 可以较好地介导谷氨酰胺酶的分泌表达, 其中信号肽 YndA 效果最好。因此, 选择 YndA 作为信号肽来开展后续的研究工作。

2.4 不同启动子重组菌株的构建

选择信号肽 YndA 融合到不同启动子之后, 构建含不同启动子的重组载体, 重组载体质粒转化 SCK6, 用引物对 P23/P24 进行菌落 PCR 验证, 扩增得到大小正确的目的基因条带, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 7, 成功构建了含不同启动子的重组菌株 SG-1、SG-2、SG-3、SG-4、SG-5、SG-6、SG-7 和 SG-8。

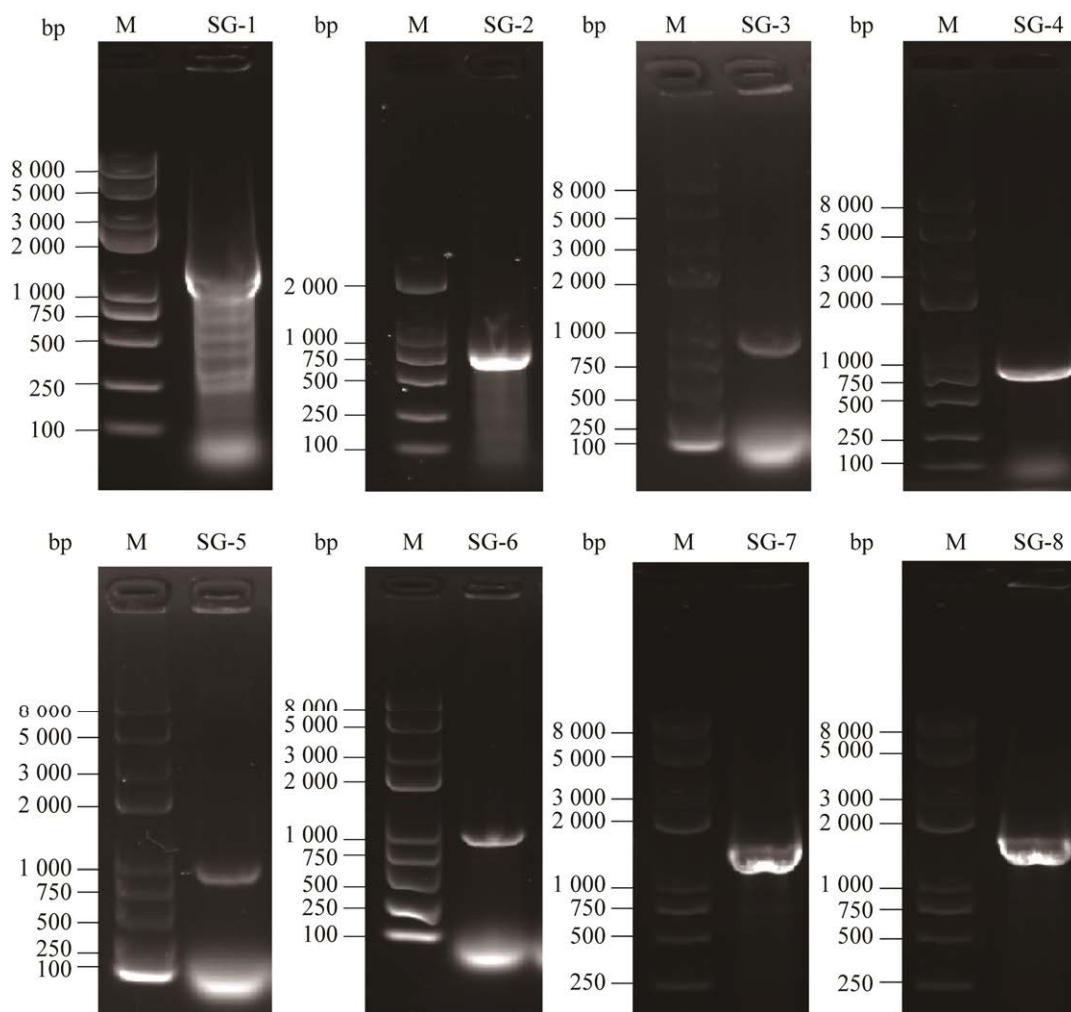


图 7 重组菌株 PCR 验证

Figure 7 PCR confirmation of recombinant strains. M: DNA Marker; SG-1: 1 412 bp; SG-2: 824 bp; SG-3: 933 bp; SG-4: 949 bp; SG-5: 951 bp; SG-6: 961 bp; SG-7: 1 606 bp; SG-8: 1 606 bp.

2.5 不同启动子对谷氨酰胺酶表达的影响

本研究在信号肽为 YndA 的基础上选用 8 种不同启动子进行试验。构建的 8 株含不同启动子的重组菌株进行摇瓶发酵，含空载体的菌株作为空白对照 CK，发酵 90 h 胞外酶活检测结果如图 8 所示，发酵上清液蛋白电泳检测结果如图 9 所示，酶活检测结果与 SDS-PAGE 结果基本一致。

通过对图 8 和图 9 的分析表明，枯草芽孢杆菌重组菌株谷氨酰胺酶的表达水平受启动子种类的影响，不同启动子介导的重组菌产谷氨酰胺

酶差异较大，6 种单启动子中，以 P_{HpaII} 介导的重组菌株在表达谷氨酰胺酶时效果最好，胞外活性达 (4.52 ± 0.01) U/mL，为启动子 P_{yyd} 介导的重组菌株胞外活性 (1.09 ± 0.02) U/mL 的 4.5 倍左右；启动子 P_{aprE} 其次，胞外活性为 (2.94 ± 0.01) U/mL。以上结果表明启动子 P_{HpaII} 和启动子 P_{aprE} 能促进谷氨酰胺酶基因在枯草芽孢杆菌的表达。推测可能是由于启动子 P_{HpaII} 和启动子 P_{aprE} 与信号肽 YndA 之间的适配性较好，从而提升酶的表达量。

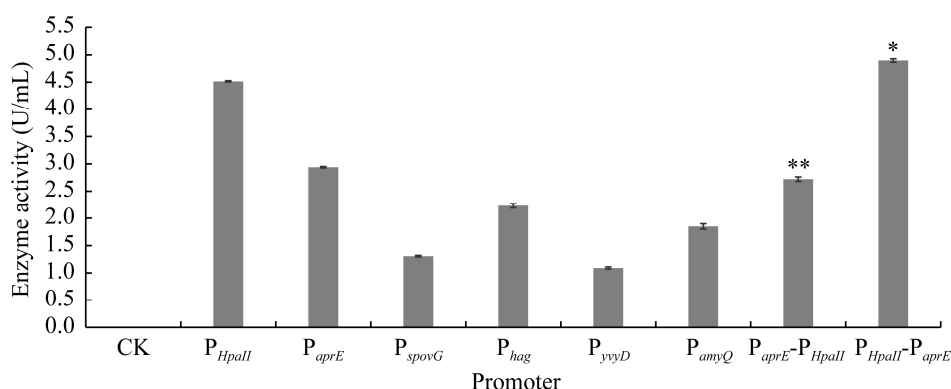


图8 不同启动子对酶表达的影响 显著性分析采用 two-sample *t*-test 方法,与 P_{HpaII} 组相比, **: $P < 0.01$; 与 P_{aprE} 组相比, *: $P < 0.05$

Figure 8 Effects of different promoters on enzyme expression. Statistical analysis was performed with two-sample *t*-test, **: $P < 0.01$ vs. P_{HpaII} group; *: $P < 0.05$ vs. P_{aprE} group.

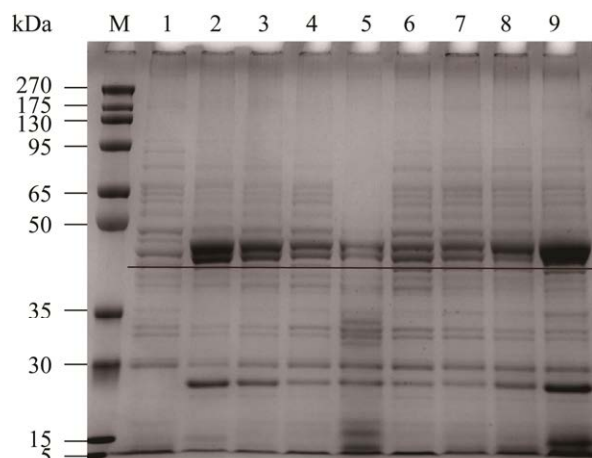


图9 含不同启动子重组菌株发酵液 SDS-PAGE 结果 M: 蛋白标准分子量; 1: 对照; 2: P_{HpaII} ; 3: P_{aprE} ; 4: P_{spovG} ; 5: P_{hag} ; 6: P_{yvyD} ; 7: P_{amyQ} ; 8: $P_{aprE}-P_{HpaII}$; 9: $P_{HpaII}-P_{aprE}$. 直线所示为目的蛋白

Figure 9 SDS-PAGE analysis for strains with different promoters. M: Protein marker; 1: Control; 2: P_{HpaII} ; 3: P_{aprE} ; 4: P_{spovG} ; 5: P_{hag} ; 6: P_{yvyD} ; 7: P_{amyQ} ; 8: $P_{aprE}-P_{HpaII}$; 9: $P_{HpaII}-P_{aprE}$. Straight line shows target protein.

选择谷氨酰胺酶产量高的两株菌的重组表达载体, 构建双启动子表达载体和重组菌株。根据发酵检测结果可知, 双启动子 $P_{aprE}-P_{HpaII}$ 介导的重组菌株酶活为 (2.72 ± 0.04) U/mL, 显著低于对应单启动子 P_{HpaII} 介导的重组菌株酶活 (4.52 ± 0.01) U/mL ($P < 0.01$); 而双启动子 $P_{HpaII}-P_{aprE}$

介导的重组菌株酶活为 (4.90 ± 0.03) U/mL, 是对应的单启动子 P_{aprE} 介导的重组菌株酶活 (2.94 ± 0.01) U/mL 的 1.6 倍, 酶活显著上升 ($P < 0.05$)。表明一定连接顺序的双启动子对谷氨酰胺酶的表达有增强作用, 同时启动子被串联时, 也可能会彼此形成干扰或竞争, 从而影响酶的表达量。

2.6 最优重组菌株摇瓶发酵验证

通过对启动子和信号肽的筛选, 得到分泌表达谷氨酰胺酶酶活最高的重组菌株 SG-8, 将 SG-8 进行摇瓶发酵, 在不同发酵时间点取样, 发酵液进行生物量 (OD_{600}) 和酶活测定, 绘制发酵生物量和酶活曲线, 结果如图 10 所示。

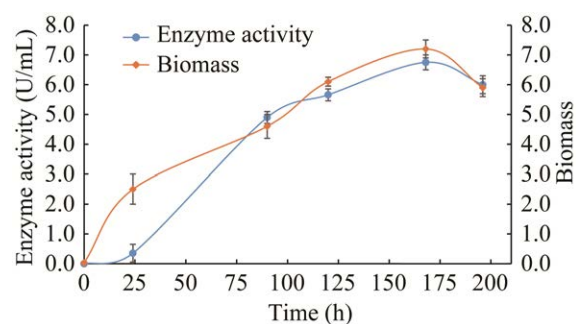


图10 重组菌 SG-8 摇瓶发酵生物量和酶活曲线
Figure 10 The biomass and enzyme activity curve of recombinant SG-8 shake flask fermentation.

根据结果可知,在发酵前期,重组菌的生物量和发酵上清液酶活都在不断上升,在发酵 168 h 左右时均达到最高值,生物量峰值为 7.2;酶活峰值为 6.7 U/mL,继续发酵生物量和酶活均开始下降,分析可能是培养基营养耗尽,细胞进入衰亡阶段。

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌因其安全性和高分泌特性,已被广泛用作外源蛋白表达宿主。菌株 SCK6 是一种具有较高转化效率的枯草芽孢杆菌,本研究选择枯草芽孢杆菌 SCK6 作为宿主菌表达解淀粉芽孢杆菌来源的谷氨酰胺酶,实现了谷氨酰胺酶的分泌表达。

基于对枯草芽孢杆菌表达和分泌外源蛋白的机理研究,目前已经开发多种策略用于提升外源蛋白的分泌表达量,如筛选表达元件^[29-30]、优化分泌途径^[31-32]、改善全局碳氮代谢网络调控^[33]、抑制细胞自溶^[34]等。外源蛋白的表达与特定信号肽之间存在着明显的适配性,本研究选择 173 种不同信号肽来介导谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达,结果表明不同信号肽对重组枯草芽孢杆菌分泌表达谷氨酰胺酶的水平影响很大。启动子是影响外源基因表达的重要调控元件,本研究选用 6 种不同启动子,结果表明不同启动子介导谷氨酰胺酶的表达效果不同,另外与单启动子相比,一定顺序的双启动子更能促进酶的高效表达。本研究结果表明在双启动子 P_{HpalI} - P_{aprE} 介导下,融合信号肽 YndA 对谷氨酰胺酶的表达效果最好。

谷氨酰胺酶是一种重要的蛋白加工用酶,在食品等领域具有重要的应用价值。本研究通过信号肽筛选和启动子优化组合,成功构建了一株高效分泌表达谷氨酰胺酶的枯草芽孢杆菌重组菌株,摇瓶发酵胞外酶活最高达 6.7 U/mL,高于目前专

利报道的摇瓶发酵表达水平 6.04 U/mL^[35],是已报道同等条件下分泌表达谷氨酰胺酶的最高水平。本研究为提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌表达提供了重要策略,为谷氨酰胺酶的产业化及酶的后续产品开发奠定了基础。

REFERENCES

- [1] DURTHI CP, POLA M, RAJULAPATI SB, KOLA AK, KAMAL MA. Versatile and valuable utilization of amidohydrolase L-glutaminase in pharma and food industries: a review[J]. Current Drug Metabolism, 2020, 21(1): 11-24.
- [2] 罗科丽, 彭喜春, 晏日安. 微生物谷氨酰胺酶的研究进展[J]. 中国调味品, 2010, 35(11): 30-34.
LUO KL, PENG XC, YAN RA. Advances on microbe glutaminase[J]. China Condiment, 2010, 35(11): 30-34 (in Chinese).
- [3] AMOBONYE A, SINGH S, PILLAI S. Recent advances in microbial glutaminase production and applications-a concise review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39(7): 944-963.
- [4] WAKAYAMA M, YAMAGATA T, KAMEMURA A, BOOTIM N, YANO S, TACHIKI T, YOSHIMUNE K, MORIGUCHI M. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(9): 383-390.
- [5] YUZUKI M, MATSUSHIMA K, KOYAMA Y. Expression of key hydrolases for soy sauce fermentation in *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(1): 92-94.
- [6] ARYUMAN P, LERTSIRI S, VISESSANGUAN W, NIAMSIRI N, BHUMIRATANA A, ASSAVANIG A. Glutaminase-producing *Meyerozyma* (*Pichia*) *guilliermondii* isolated from Thai soy sauce fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 192: 7-12.
- [7] 浦荷芳. 硝基还原假单胞菌谷氨酰胺酶基因的克隆、表达及其在 L-茶氨酸酶法合成中的应用[D]. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 2012.
PU HF. Cloning and expression of glutaminase gene from nitro-reducing *Pseudomonas* sp. and its application in enzymatic synthesis of L-theanine[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2012 (in Chinese).
- [8] SATHISH T, UPPULURI KB, VEERA BRAMHA

- CHARI P, KEZIA D. Sequential optimization methods for augmentation of marine enzymes production in solid-state fermentation: L-glutaminase production a case study[M]//Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part I-Production of Enzymes. Amsterdam: Elsevier, 2016: 95-114.
- [9] SINGH P, SHERA SS, BANIK J, BANIK RM. Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of L-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305[J]. Bioresource Technology, 2013, 137: 261-269.
- [10] BASKARAN R, BANDIKARI R, ZUO W, QIAN JX, LIU ZD. Enhanced thermostability of halo-tolerant glutaminase from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 by immobilization onto nano magnetic cellulose sheet and its application in production of glutamic acid[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 1256-1263.
- [11] ZHANG X, XU ZY, LIU S, QIAN K, XU MJ, YANG TW, XU JZ, RAO ZM. Improving the production of salt-tolerant glutaminase by integrating multiple copies of *mglu* into the protease and 16S rDNA genes of *Bacillus subtilis* 168[J]. Molecules, 2019, 24(3): 592.
- [12] 徐朝阳, 张显, 徐美娟, 杨奎伟, 饶志明. 耐盐性谷氨酰胺酶在 *Bacillus subtilis* 168 中的整合表达[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(6): 1673-1689.
- XU ZY, ZHANG X, XU MJ, YANG TW, RAO ZM. Over-expression of salt-tolerant glutaminase by integration of *mglu* genes in *Bacillus subtilis* 168[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(6): 1673-1689 (in Chinese).
- [13] LIU S, RAO SQ, CHEN X, LI JH. Enhanced salt-tolerance of *Bacillus subtilis* glutaminase by fusing self-assembling amphipathic peptides at its N-terminus[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 996138.
- [14] 李信志, 卢争辉, 周玉玲, 李世宇, 张桂敏. 枯草芽孢杆菌 SCK6 超级感受态的制备和转化条件优化[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 692-698.
- LI XZ, LU ZH, ZHOU YL, LI SY, ZHANG GM. Preparation and transformation optimization for super competent *B. subtilis* SCK6 cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(4): 692-698 (in Chinese).
- [15] 施鼎宸. 枯草芽孢杆菌生产健康糖的细胞工厂构建及发酵工艺研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2023.
- SHI DC. Biosynthesis of healthy sugar by metabolic engineered *Bacillus subtilis*[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [16] 叶静. 枯草芽孢杆菌 T7 表达系统构建[D]. 天津: 天津商业大学硕士学位论文, 2022.
- YE J. Construction of T7 expression system of *Bacillus subtilis*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Commerce, 2022 (in Chinese).
- [17] SONG YF, NIKOLOFF JM, FU G, CHEN JQ, LI QG, XIE NZ, ZHENG P, SUN JB, ZHANG DW. Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158447.
- [18] YAO DB, HAN XD, GAO HH, WANG B, FANG ZM, LI H, FANG W, XIAO YZ. Enhanced extracellular production of raw starch-degrading α -amylase in *Bacillus subtilis* through expression regulatory element modification and fermentation optimization[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 1-14.
- [19] CAI D, WEI X, QIU Y, CHEN Y, CHEN J, WEN Z, CHEN S. High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 704-712.
- [20] YANG XY, RAO Y, ZHANG MX, WANG JQ, LIU WY, CAI DB, CHEN SW. Efficient production of L-asparaginase in *Bacillus licheniformis* by optimizing expression elements and host[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1096-1106.
- [21] NIU JF, YAN RX, SHEN J, ZHU XY, MENG FQ, LU ZX, LU FX. Cis-element engineering promotes the expression of *Bacillus subtilis* type I L-asparaginase and its application in food[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6588.
- [22] 葛春蕾. 高效分泌表达纳豆激酶的重组枯草芽孢杆菌的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017.
- GE CL. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for high-level secretory expression of nattokinase[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese).
- [23] 张康. 枯草芽孢杆菌菌株改造、启动子优化和普鲁兰酶的高效制备研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG K. Modification of *Bacillus subtilis* strain, promoter optimization and high-level expression of pullulanase[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese).
- [24] 张玲, 王男, 金吕华, 林荣, 杨海麟. 双启动子促进亮

- 氨酸脱氢酶在 *Bacillus subtilis* 中表达及发酵研究[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(12): 21-31.
- ZHANG L, WANG N, JIN LH, LIN R, YANG HL. To promote the expression of leucine dehydrogenase in *Bacillus subtilis* via dual-promoter and fermentation research[J]. China Biotechnology, 2018, 38(12): 21-31 (in Chinese).
- [25] BROCKMEIER U, CASPERS M, FREUDL R, JOCKWER A, NOLL T, EGGERT T. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 362(3): 393-402.
- [26] 陈龙军, 林陈强, 贾宪波, 方宇, 张慧, 陈济琛. 信号肽筛选优化提高耐热 α -环糊精酶在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 福建农业学报, 2022, 37(3): 414-422.
- CHEN LJ, LIN CQ, JIA XB, FANG Y, ZHANG H, CHEN JC. Enhanced thermophilic α -cyclodextrin glycosyltransferase expression by optimizing target signal peptide in *Bacillus subtilis*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(3): 414-422 (in Chinese).
- [27] 叶茂, 张远平, 邓毛程. 一种耐盐性谷氨酰胺酶在高盐稀态酱油酿造过程中的应用研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(7): 5-7, 17.
- YE M, ZHANG YP, DENG MC. The application effect of a novel salt-tolerant L-glutaminase in soy sauce liquid fermentation with high-salt process[J]. China Condiment, 2014, 39(7): 5-7, 17 (in Chinese).
- [28] 郭建, 樊君, 罗雯, 豆剑伟, 李范宇. 一种基于生物传感仪快速测定米曲霉谷氨酰胺酶活的方法: CN111378716A[P]. 2020-07-07.
- GUO J, FAN J, LUO W, DOU JW, LI FY. Method for rapidly determining enzyme activity of *Aspergillus oryzae* glutamine based on biosensor: CN111378716A[P]. 2020-07-07 (in Chinese).
- [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] HAN LC, CHEN QQ, LUO J, CUI WJ, ZHOU ZM. Development of a glycerol-inducible expression system for high-yield heterologous protein production in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): e0132222.
- [31] 白雷雷, 马然静, 杨绍梅, 班睿. 过表达 TatAdCd 转位酶对枯草芽孢杆菌脂肪酶分泌的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 2-8.
- BAI LL, MA RJ, YANG SM, BAN R. Effect of TatAdCd translocases overexpression on the secretion of lipase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 2-8 (in Chinese).
- [32] QUESADA-GANUZA A, ANTELO-VARELA M, MOURITZEN JC, BARTEL J, BECHER D, GJERMENSEN M, HALLIN PF, APPEL KF, KILSTRUP M, RASMUSSEN MD, NIELSEN AK. Identification and optimization of PrsA in *Bacillus subtilis* for improved yield of amylase[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 158.
- [33] CAO HJ, VILLATORO-HERNANDEZ J, WEME RDO, FRENZEL E, KUIPERS OP. Boosting heterologous protein production yield by adjusting global nitrogen and carbon metabolic regulatory networks in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 143-152.
- [34] CHEN XW, PENG Z, JI XM, ZHANG J. Reducing cellular autolysis of *Bacillus subtilis* to improve keratinase production[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(10): 3106-3113.
- [35] 张霞, 袁肖杰, 许伟, 刘扬. 一种枯草芽孢杆菌及其在谷氨酰胺酶生产中的应用: CN114806988A[P]. 2022-07-29.
- ZHANG X, YUAN XJ, XU W, LIU Y. *Bacillus subtilis* and application thereof in production of glutaminase: CN114806988A[P]. 2022-07-29 (in Chinese).