

研究报告



通过优化表达元件及培养基组分提高地衣芽胞杆菌中碱性丝氨酸蛋白酶产量

饶忆 师璐 王豪 熊世颀 蔡冬波 陈守文 李顺意*

湖北大学生命科学学院 湖北省环境微生物工程技术研究中心 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心
湖北 武汉 430062

摘要:【背景】碱性丝氨酸蛋白酶(Subtilisin)是一种具有广泛用途的工业酶制剂。【目的】旨在通过优化启动子、信号肽及培养基组分来提高地衣芽胞杆菌中碱性丝氨酸蛋白酶产量。【方法】以地衣芽胞杆菌 BL10 为出发菌株, 构建了含有 4 种不同类型启动子(P_{bacA} 、P43、 P_{aprE} 和 P_{srfA})及 4 种不同类型信号肽(SP_{Vpr} 、 SP_{SacB} 、 SP_{SacC} 和 SP_{AprE})的碱性丝氨酸蛋白酶表达菌株, 并在获得高产菌株的基础上进行培养基优化。【结果】4 种启动子的表达水平为 $P_{\text{bacA}} > P_{\text{aprE}} > P43 > P_{\text{srfA}}$, 4 种信号肽的分泌效率为 $SP_{\text{AprE}} > SP_{\text{SacC}} > SP_{\text{SacB}} > SP_{\text{Vpr}}$ 。其中, 菌株 BL10/p P_{bacA} -aprE 产生最高的碱性丝氨酸蛋白酶酶活 (275.21 U/mL), 相比于出发菌株 BL10/pHY-aprE (167.98 U/mL)提高了 64%。随后, 通过对发酵培养基成分进行优化并结合正交优化, 获得了一种高产碱性丝氨酸蛋白酶的培养基(g/L): 玉米淀粉 40.0, 豆粕 50.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0, K_2HPO_4 3.0, CaCO_3 1.0。最后, 碱性丝氨酸蛋白酶酶活提高到 747.37 U/mL, 是初始酶活的 4.45 倍。【结论】为工业化高产碱性丝氨酸蛋白酶提供了一种有效策略。

关键词: 地衣芽胞杆菌, 碱性丝氨酸蛋白酶, 启动子, 信号肽, 培养基优化

Enhancement production of subtilisin in *Bacillus licheniformis* by screening promoters and signal peptides and optimization of fermentation medium

RAO Yi SHI Lu WANG Hao XIONG Shi-Jie CAI Dong-Bo CHEN Shou-Wen
LI Shun-Yi*

Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062, China

Abstract: [Background] Subtilisin is an important industrial protease with many applications. [Objective] The aim of this study is to improve the subtilisin production by screening promoters and signal peptides, and optimization of fermentation medium. [Methods] *Bacillus licheniformis* BL10, constructed in our previous research, was served as the host strain for subtilisin production, and four promoters (P_{bacA} , P43, P_{aprE} and P_{srfA}) and four signal peptides (SP_{Vpr} , SP_{SacB} , SP_{SacC} and SP_{AprE}) were screened to improve subtilisin

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (2015CB150505)

*Corresponding author: Tel: 86-27-88666081; E-mail: lisy@hubu.edu.cn

Received: 19-07-2018; Accepted: 29-09-2018; Published online: 19-10-2018

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划) (2015CB150505)

*通信作者: Tel: 027-88666081; E-mail: lisy@hubu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-19; 接受日期: 2018-09-29; 网络首发日期: 2018-10-19

production, and the medium for subtilisin production was further optimized. **[Results]** Based on our results, the expression ratios among these four promoters were $P_{\text{bacA}} > P_{\text{aprE}} > P43 > P_{\text{srfA}}$, and the secretion efficiencies were $SP_{\text{AprE}} > SP_{\text{SacC}} > SP_{\text{SacB}} > SP_{\text{Vpr}}$, respectively. Among these strains, BL10/p P_{bacA} -aprE displayed with the highest subtilisin activity (275.21 U/mL), which was increased by 64% compared with that of BL10/pHY-aprE (167.98 U/mL). Furthermore, the fermentation medium was optimized, and the orthogonal test was further applied to enhance subtilisin production. The maximum subtilisin activity (747.37 U/mL) was obtained in the optimized medium with 40.0 g/L corn starch, 50.0 g/L soybean meal, 4.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g/L K_2HPO_4 , 1.0 g/L CaCO_3 , increased by 4.45-fold compared with that of the initial condition. **[Conclusion]** Collectively, this study provided an effective strategy for enhanced production of subtilisin.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Subtilisin, Promoter, Signal peptide, Fermentation medium optimization

碱性丝氨酸蛋白酶是芽胞杆菌产生的一种蛋白酶。在碱性条件下,其可以水解肽链、酰胺基、酯基,因此被广泛应用在食品、医药、化学工业、废物处理等领域^[1-3]。外源蛋白表达是提高目的蛋白产物的有效策略^[4]。在之前的研究中,多种蛋白酶在不同的宿主菌株中实现了高效表达。其中,Wang等^[5]在 *Saccharomyces cerevisiae* 中成功表达了来源于 *Bacillus subtilis* 中的中性蛋白酶 NprE,并通过研究不同信号肽对 NprE 分泌的影响,显著提高了目的蛋白的产量。刘新育等^[6]从枯草芽胞杆菌 A-109 中克隆到碱性蛋白酶基因(*aprE*),通过插入到表达载体 pET-24a 进而转化至大肠杆菌 BL21 后,分别通过 SDS-PAGE、Western bolt 等实验,获得了具有较高活性的碱性蛋白酶 AprE。

近年来,提高目的蛋白在宿主菌中的表达水平受到了人们的广泛关注,其中表达元件与培养基组分对目的蛋白产量影响较大,通过对一些表达元件(如启动子、信号肽、信号肽酶、信号肽肽酶、分子伴侣等)的优化均可以显著提高目的蛋白的产量^[7-8]。例如,Yu等^[9]利用稳定期启动子 P_{yib} ,在不添加诱导剂的条件下,实现了绿色荧光蛋白和普鲁兰酶在枯草芽胞杆菌中的高效表达,其产量分别是 P43 启动子介导下的 7.8 倍和 7.4 倍。本课题组通过优化信号肽,将地衣芽胞杆菌中纳豆激酶产量提高了 4.2 倍^[10]。与此同时,优化培养基组分也显著提高目的蛋白的表达水平^[11-12]。由此说明,优化表达元件和培养基组分是一种提高目的蛋白产量的有效策略。

地衣芽胞杆菌是公认的生物安全性菌株^[11,13],

其不仅可以合成多种重要的生物化工产品(聚 γ -谷氨酸、乙偶姻、杆菌肽等),还可以作为蛋白高效表达的优良宿主菌^[14]。在本研究中,我们以实验室前期构建的地衣芽胞杆菌 BL10 为宿主菌^[15],以碱性丝氨酸蛋白酶(AprE)为目的蛋白,通过筛选启动子(P_{bacA} , P_{aprE} , P43, P_{srfA})和信号肽(SP_{Vpr} , SP_{SacB} , SP_{SacC} , SP_{AprE}),并结合培养基成分优化,实现了碱性丝氨酸蛋白酶在地衣芽胞杆菌中的高效表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

本研究所用的菌株及质粒见表 1。其中,地衣芽胞杆菌 BL10 为本研究的宿主菌株,大肠杆菌 DH5 α 作为载体构建的宿主菌株,载体 pHY300-PLK 用于碱性丝氨酸蛋白酶表达载体的构建,上述菌种均由本实验室保存。本研究所用的引物见表 2。

1.2 主要试剂和仪器

FastPfu DNA 聚合酶、dNTPs、各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Protein Maker (Broad)、DNA 分子量标准 Marker (如 λ DNA/*Hind* III Marker, DL 5000 Marker)购自 TaKaRa 公司;质粒抽提、DNA 回收试剂盒购自武汉骏安生物科技有限公司;琼脂糖购自 Spanish 公司;Amp、Kan、Tet 和蛋白胶配制所需试剂等购自 Sigma 公司;其它主要生化试剂均为国产试剂或进口分装。PCR 仪、脉冲转化仪, Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机, HITACHI 公司。

1.3 培养基

LB 固体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母抽提物 5.0,氯化钠 10.0,琼脂粉 15.0, pH 7.2。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	性质 Characteristic	来源 Resource
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f 80 lacZΔM15) hsd R17 recA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	[9]
<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	Poly-glutamate production strain (CCTCC M208065)	CCTCC
DW2	Bacitracin production strain (CCTCC M2011344)	CCTCC
BL10	WX-02 (Δmpr , Δvpr , $\Delta aprX$, Δepr , Δbpr , $\Delta wprA$, $\Delta aprE$, $\Delta bprA$, Δhag , $\Delta amyL$)	[9]
BL10/pP43-aprE	BL10 harboring pP43-aprE	This study
BL10/pHY-aprE	BL10 harboring pHY-aprE	This study
BL10/pP _{bacA} -aprE	BL10 harboring pP _{bacA} -aprE	This study
BL10/pP _{srf} -aprE	BL10 harboring pP _{srf} -aprE	This study
BL10/pP _{bacA} -SP _{SacB} -aprE	BL10 harboring pP _{bacA} -SP _{SacB} -aprE	This study
BL10/pP _{bacA} -SP _{SacC} -aprE	BL10 harboring pP _{bacA} -SP _{SacC} -aprE	This study
BL10/pP _{bacA} -SP _{Vpr} -aprE	BL10 harboring pP _{bacA} -SP _{Vpr} -aprE	This study
Plasmids		
pP43-aprE	pHY300PLK containing P43 promoter, <i>aprE</i> with native signal peptide and <i>amyL</i> terminator	This study
pHY-aprE	pHY300PLK containing <i>aprE</i> with native promoter and signal peptide, <i>amyL</i> terminator	This study
pP _{bacA} -aprE	pHY300PLK containing P _{bacA} promoter, <i>aprE</i> with native signal peptide and <i>amyL</i> terminator	This study
pP _{srf} -aprE	pHY300PLK containing P _{srfA} promoter, <i>aprE</i> with native signal peptide and <i>amyL</i> terminator	This study
pP _{bacA} -SP _{SacB} -aprE	pHY300PLK containing P _{bacA} promoter, signal peptide of SacB, gene <i>aprE</i> (without its own signal peptide), and <i>amyL</i> terminator	This study
pP _{bacA} -SP _{SacC} -aprE	pHY300PLK containing P _{bacA} promoter, signal peptide of SacC, gene <i>aprE</i> (without its own signal peptide) and <i>amyL</i> terminator	This study
pP _{bacA} -SP _{Vpr} -aprE	pHY300PLK containing P _{bacA} promoter, signal peptide of Vpr, gene <i>aprE</i> (without its own signal peptide) and <i>amyL</i> terminator	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 The primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
PaprE-F	CGGAATTC GAAATCAGATGGAGCAATCTC
PaprE-R	<u>AAAAC</u> TCTTTTTCCTCATCATTTTATCCCTTGCTGTCTTT
P43-F	CGGGAATTC TGATAGGTGGTATGTTTTTCG
P43-R	<u>AAAAC</u> TCTTTTTCCTCATCATGTGTACATTCCTCTTTACCT
PbacA-F	CGGAATTC CCCTGCGATTCGGCGAGATTCAA
PbacA-R	<u>AAAAC</u> TCTTTTTCCTCATCATATAAAAAATTCTCCTTTTTGATAA
Psrf-F	CGGAATTC GACGCTCTTCGCAAGGGTGTC
Psrf-R	<u>AAAAC</u> TCTTTTTCCTCATCATATACCTCCCCTAATCTTTATA
TamyL-F	AAGAGCAGAGAGGACGGATT
TamyL-R	GCTCTAGAC GCAATAATGCCGTCGCACTG
SPVpr-F	<u>TTATCAAAAAGGAGAATTTT</u> ATTTGAGAAAAAGTATCGTGCGC
SPVpr-R	<u>GCCAAAAACTCTTTTTCCTCATGAATGTGGATAACGCAAATA</u>
SPSacB-F	<u>TTATCAAAAAGGAGAATTTT</u> ATATGAACATCAAAAACATTG
SPSacB-R	<u>GCCAAAAACTCTTTTTCCTCATCGCACCTCCGGCCAGCAGT</u>
SPSacC-F	<u>TTATCAAAAAGGAGAATTTT</u> ATATGAAAAAGAGACTGATTCAAG
SPSacC-R	<u>GCCAAAAACTCTTTTTCCTCATTCATCCGAAAATGCCATAG</u>
pHY-F	CAGATTTTCGTGATGCTTGTC
pHY-R	GTTTATTATCCATACCCTTAC

注: 粗体为限制性内切酶位点, 下划线为 SOE-PCR 时的重叠引物部分.

Note: Bold is a restriction enzyme site, underlined for the sequence for SOE-PCR.

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母抽提物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.2。

碱性丝氨酸蛋白酶初始发酵培养基(g/L): 玉米淀粉 50.0, 豆粕 50.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0, K_2HPO_4 3.0, CaCO_3 1.0, pH 7.2; 根据本实验的研究目的, 调整碳源、氮源、无机盐及其它成分种类和用量。

1.4 碱性丝氨酸蛋白酶 AprE 表达载体的构建

表达载体的构建参考本课题组之前的方法^[16]。首先, 根据 NCBI 上公布的地衣芽胞杆菌 WX-02 中碱性丝氨酸蛋白酶基因序列 *aprE* 及淀粉酶基因 *amyL* 终止子序列 T_{amyL} , 设计引物 PaprE-F/R, TamyL-F/R, PCR 扩增 *aprE* 片段(包含自身启动子及信号肽)及淀粉酶终止子 T_{amyL} 。随后通过 SOE-PCR 的方法将 *aprE* (包含其自身启动子及信号肽)及 T_{amyL} 连接到一起, 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后, 将其与经相同内切酶酶切后的 pHY300PLK 连接, 然后转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性转化子, 并对阳性克隆抽质粒进行双酶切验证和测序分析。最终构成含有自身启动子及信号肽的 AprE 分泌型表达载体, 命名为 pHY-aprE。

1.5 启动子及信号肽筛选表达菌株的构建

分别选取 4 种不同启动子: 来源于地衣芽胞杆菌 DW2 的杆菌肽合成酶基因簇 *bacABC* 启动子 P_{bacA} , 来源于地衣芽胞杆菌 WX-02 的碱性丝氨酸蛋白酶 AprE 自身启动子 P_{aprE} , 来源于枯草芽胞杆菌 168 中 P43 启动子和 Surfation 合成基因簇启动子 P_{srfA} , 根据 1.4 所述的方法进行不同启动子介导的 AprE 表达载体构建。信号肽选取来源于地衣芽胞杆菌 WX-02 中 4 种蛋白的信号肽, 分别为: 丝氨酸蛋白酶 Vpr 信号肽 SP_{Vpr} , 果聚糖酶信号肽 SP_{SacB} 和 SP_{SacC} , AprE 自身信号肽 SP_{AprE} , 根据 1.4 所述的方法进行不同信号肽介导的 AprE 表达载体构建。最后将上述表达载体电转入地衣芽胞杆菌 BL10 中, 分别得到不同启动子、信号肽介导下的 AprE 表达菌株。

1.6 发酵培养基优化方法

1.6.1 种子培养

取甘油管中保存的菌液, 划线至 LB 固体培养基

中, 37 °C 培养 12 h, 然后取单菌落接种于 5 mL 液体 LB 中, 加入相对应的抗生素(氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 盐酸四环素 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 °C、240 r/min 培养 12 h 活化菌体, 最后按 3% 的接种量接种于 50 mL 液体 LB 中, 37 °C、240 r/min 培养 8 h, 即得发酵种子液。

1.6.2 发酵培养条件

按照 3% 的接种量将发酵种子液接种于装有 30 mL 的发酵液的摇瓶中, 37 °C、240 r/min, 培养 48 h。

1.6.3 发酵培养基优化

碳源浓度的优化: 考察不同浓度的玉米淀粉(30.0、40.0、50.0、60.0 g/L)对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响。

有机氮源浓度的优化: 考察不同浓度的豆粕(40.0、60.0、80.0、100.0 g/L)对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响。

无机氮源浓度的优化: 考察不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0、3.0、4.0、5.0 g/L)对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响。

磷酸盐浓度的优化: 考察不同浓度的 K_2HPO_4 (2.0、3.0、4.0、5.0 g/L)对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响。

1.7 分析检测方法

SDS-PAGE 分析参考本课题组之前的方法^[10]。细菌生物量的测定采用稀释涂布法完成。蛋白酶酶活检测的方法参考之前的研究^[17]。其中标准曲线的测定: 将标准酪氨酸溶液配置成等梯度的溶液(10、20.....80、90、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 进行上述文献中的反应。样品的蛋白酶活力计算公式= $A \times 4 \times N / 10$
A: 样品在分光光度计 660 nm 处测得的数值经标准曲线计算而得的酪氨酸微克数; N: 蛋白酶原液经稀释的倍数; 10: 蛋白酶液与酪蛋白的反应时间(min)。

一个单位酶活(U)定义为: 在一定温度、pH 条件下, 蛋白酶液在 1 min 内水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量。

1.8 数据处理

每个实验重复 3 次, 每次 3 个平行, 采用 Origin

8.5 和 SPSS 18.0 进行数据处理和分析[其中, *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)]^[16]。

2 结果与分析

2.1 启动子对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响

启动子在目的基因的高效表达中具有重要作用, 因而是影响目的蛋白高效表达的重要元件^[18]。本文分别构建了4种不同启动子(P_{bacA} 、 P_{aprE} 、P43、 P_{srfA})介导下的 AprE 表达载体, 并将其转化至地衣芽胞杆菌 BL10 中, AprE 重组表达菌株分别命名为 BL10/p P_{bacA} -aprE、BL10/pHY-aprE、BL10/pP43-aprE、BL10/p P_{srfA} -aprE, 其中 BL10/pHY-aprE 作为对照菌株。将上述4株菌株分别进行碱性丝氨酸蛋白酶发酵实验, 由于本研究采用的宿主菌为地衣芽胞杆菌胞外蛋白酶缺失菌株 BL10, 因此本研究检测得到的蛋白酶酶活即为碱性丝氨酸蛋白酶酶活。结果表明, 不同启动子介导下碱性丝氨酸蛋白酶的酶活各不相同, 其酶活大小依次为: BL10/p P_{bacA} -aprE > BL10/pHY-aprE > BL10/pP43-aprE > BL10/p P_{srfA} -aprE。其中 BL10/p P_{bacA} -aprE 中产生的碱性丝氨酸蛋白酶酶活最高, 达到 275.21 ± 5.16 U/mL, 相比于对照菌 BL10/pHY-aprE (167.98 U/mL) 提高了 64% (图 1A)。此外, 将4个菌株的发酵上清液经 SDS-PAGE 检测发现, 其蛋白量结果与酶活数据相一致(图 1B)。

2.2 信号肽对碱性丝氨酸蛋白酶产量的影响

随后, 选取了4种信号肽用于研究信号肽对碱性丝氨酸蛋白酶表达的影响, 4种信号肽分别为: 来源于地衣芽胞杆菌 WX-02 中的丝氨酸蛋白酶 Vpr 信号肽 SP_{Vpr} 、果聚糖酶信号肽 SP_{SacB} 和 SP_{SacC} , 以及 AprE 自身信号肽 SP_{AprE} 。接着成功构建了不同信号肽介导下的碱性丝氨酸蛋白酶表达菌株, 分别命名为 BL10/p P_{bacA} - SP_{Vpr} -aprE、BL10/p P_{bacA} - SP_{SacB} -aprE、BL10/p P_{bacA} - SP_{SacC} -aprE 和 BL10/p P_{bacA} -aprE。菌株发酵结果如图 2A 所示, 不同信号肽介导下碱性丝氨酸蛋白酶的活力各不相同, 4种信号肽的分泌效率为: $SP_{AprE} > SP_{SacC} > SP_{SacB} > SP_{Vpr}$, 其自身信号肽 SP_{AprE} 是所选信号肽中最优的信号肽, 这一结果也与发酵上清液中 AprE 蛋白量的结果相一致(图 2B)。

2.3 培养基优化结果

培养基优化是提高目的产物产量的有效策略^[11,19]。本研究拟通过优化发酵培养基中的碳源(玉米淀粉)、氮源[豆粕和 $(NH_4)_2SO_4$]及磷酸盐(K_2HPO_4)的浓度来进一步提高碱性丝氨酸蛋白酶产量。其中, 选取的玉米淀粉的浓度为 30.0、40.0、50.0、60.0 g/L, 其发酵结果如图 3A 所示, 发现当加入 40.0 g/L 玉米淀粉时, 碱性丝氨酸蛋白酶产量达到最高, 相

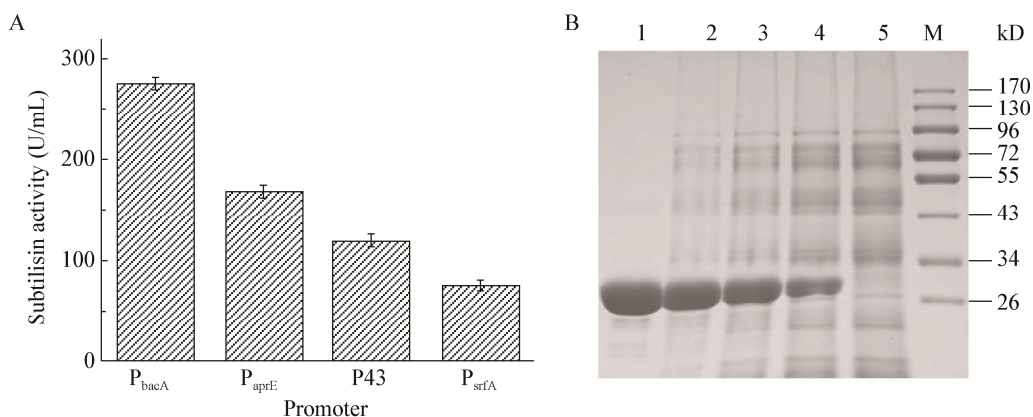


图 1 不同启动子对碱性丝氨酸蛋白酶酶活(A)及产量(B)的影响

Figure 1 Effects of different promoters on the subtilisin activity (A) and yield (B)

Note: 1: BL10/p P_{bacA} -aprE; 2: BL10/pHY-aprE; 3: BL10/pP43-aprE; 4: BL10/p P_{srfA} -aprE; 5: BL10/pHY300; M: Protein marker.

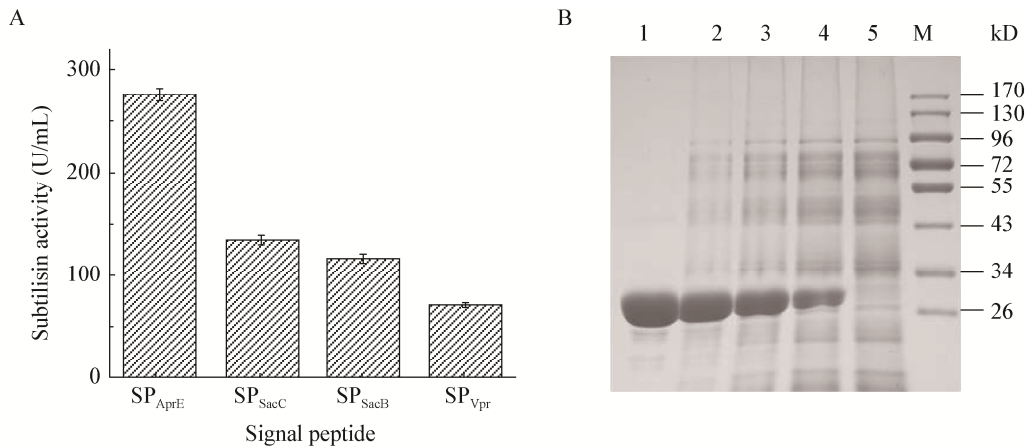


图 2 不同信号肽对碱性丝氨酸蛋白酶酶活(A)和产量(B)的影响

Figure 2 Effects of different signal peptides on the subtilisin activity (A) and yield (B)

Note: 1: BL10/pP_{bacA}-aprE; 2: BL10/pP_{bacA}-SP_{SacC}-aprE; 3: BL10/pP_{bacA}-SP_{SacB}-aprE; 4: BL10/pP_{bacA}-SP_{Vpr}-aprE; 5: BL10/pHY300; M: Protein marker.

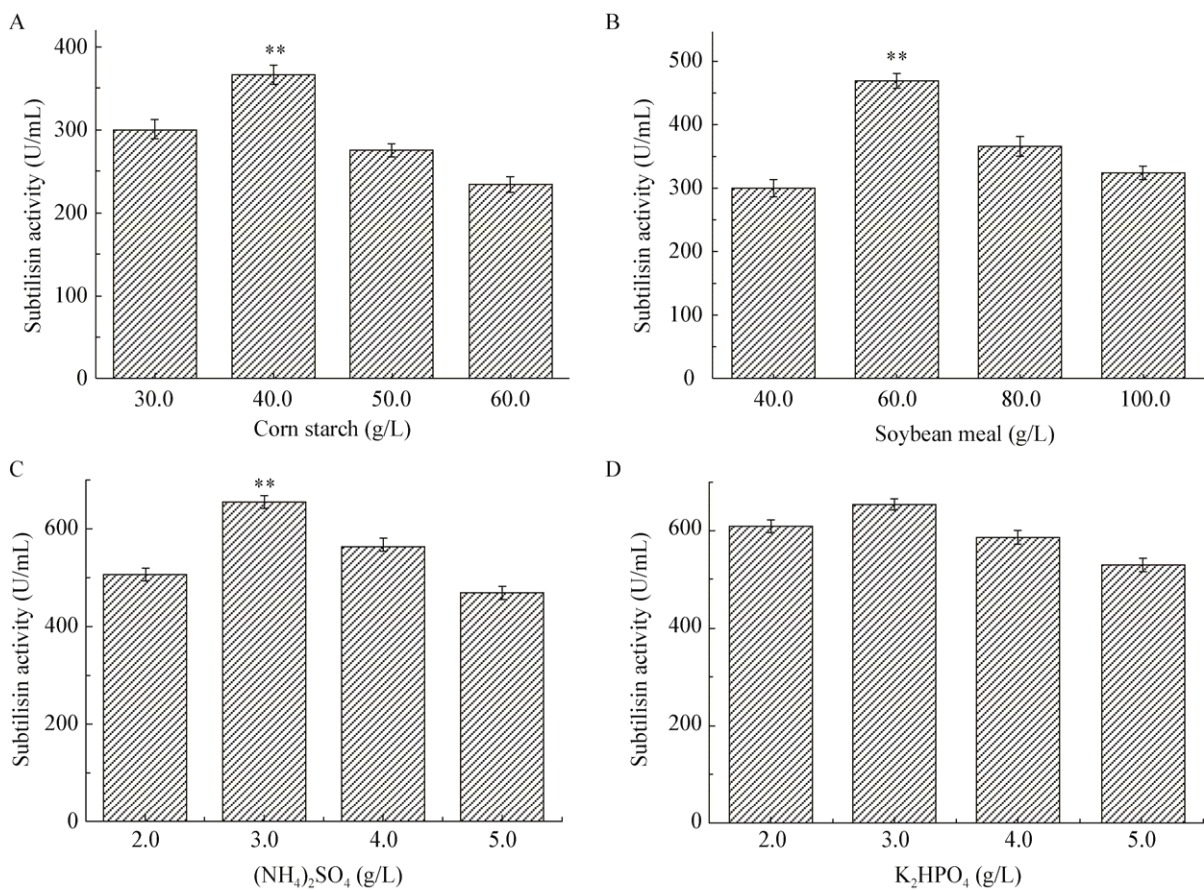


图 3 碱性丝氨酸蛋白酶发酵培养基优化

Figure 3 Optimization of the fermentation medium for high-level production of subtilisin

注: A: 玉米淀粉; B: 豆粕; C: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; D: K_2HPO_4 .

Note: A: Corn starch; B: Soybean meal; C: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; D: K_2HPO_4 .

比于初始培养基提高了 33%。同理, 其它培养基成分优化结果如图 3B 和 3C 所示, 发现当培养基中分别添加 60.0 g/L 豆粕和 3.0 g/L (NH₄)₂SO₄ 条件下, 碱性丝氨酸蛋白酶的产量达到最高值。然而, 改变 K₂HPO₄ 的浓度对碱性丝氨酸蛋白酶的产量无明显影响(图 3D)。

随后, 在单因素优化的结果上, 设计三因素三水平的正交试验, 所得结果如表 3 所示, 极性 R 值顺序为: 玉米淀粉>(NH₄)₂SO₄>豆粕, 说明玉米淀粉对碱性丝氨酸蛋白酶产量影响最大, 其次是 (NH₄)₂SO₄ 和豆粕。综合单因素及正交实验结果(表 3), 确定上述组分在培养基中的浓度为: 玉米淀粉 40.0 g/L、豆粕 50.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 4.0 g/L。

2.4 菌株生长曲线及碱性丝氨酸蛋白酶酶活曲线

本研究分别对出发菌株 BL10/pHY-aprE 在初始培养基及高产菌株 BL10/pP_{bacA}-aprE 在优化培养基中的过程曲线进行研究。如图 4 所示, 细胞经过短暂的延滞期(8 h)后, 菌体快速生长的同时也伴随着碱性丝氨酸蛋白酶的快速合成。出发菌株生物量在

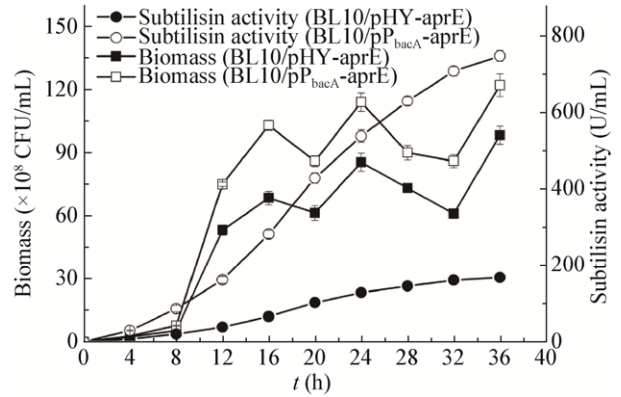


图 4 菌株生长曲线及碱性丝氨酸蛋白酶活性曲线
Figure 4 Fermentation curve of BL10/pP_{bacA}-aprE in the optimized medium.

36 h 左右达到最大值(98.32×10⁸ CFU/mL)。高产菌株 BL10/pP_{bacA}-aprE 的生物量(122.09×10⁸ CFU/mL)相比于出发菌株提高了 24%, 说明优化培养基有利于菌体生长。BL10/pP_{bacA}-aprE 产生的最大蛋白酶活力为 747.37 U/mL, 相比于初始条件提高了 3.45 倍。BL10/pP_{bacA}-aprE 单个细胞所产生的蛋白酶活为 6.12×10⁻⁸ U/CFU, 相比于初始条件(1.71×10⁻⁸ U/CFU)提高了 2.59 倍。

3 讨论与结论

芽胞杆菌是蛋白表达的良好宿主, 表达元件(启动子、信号肽、转运元件、信号肽酶和信号肽酶等)优化是提高目的蛋白产量的有效策略。其中, 启动子是影响目的蛋白高效表达的重要因素, 其主要是通过影响目的基因的转录水平来影响目的蛋白的高产, 因此, 筛选适用于目的基因表达的高效启动子是实现目的蛋白高效表达的有效手段^[9,18]。本研究中所筛选得到的杆菌肽合成酶基因簇启动子 P_{bacA} 是来源于地衣芽胞杆菌 DW2, 而地衣芽胞杆菌 DW2 是杆菌肽的工业生产菌株, 其杆菌肽合成酶表达量相当高^[20], 因此该启动子被认为是一种强启动子从而可以用于目标蛋白的高效表达, 本研究的结论也进一步证实了该观点。与此同时, 相关的研究还表明, 并不是所有的被报道的强启动子对于目的蛋白产量的提高都具有促进作用, 有时需要根

表 3 正交实验设计及结果

Table 3 Orthogonal experimental design and results

Level	Factor			Activity (U/mL)
	Corn starch (g/L)	Soybean meal (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	
1	20.0	50.0	2.0	132.50
2	30.0	50.0	3.0	326.26
3	40.0	50.0	4.0	733.10
4	20.0	60.0	3.0	170.48
5	30.0	60.0	4.0	519.70
6	40.0	60.0	2.0	627.90
7	20.0	70.0	4.0	466.11
8	30.0	70.0	2.0	467.45
9	40.0	70.0	3.0	589.88
K ₁	31.20	61.10	49.78	
K ₂	69.89	69.29	42.00	
K ₃	97.70	84.41	76.66	
R	66.50	23.31	34.38	
Optimal level	A3	B3	C3	

据特定的目的蛋白及外部环境进行启动子的筛选工作^[21]。

信号肽负责引导目标蛋白从胞内分泌至胞外,其主要是通过和目的蛋白形成特殊的三维结构,从而影响外源蛋白的分泌水平^[8,22-24]。近年来,越来越多的研究开始着眼于信号肽的筛选从而提高目标蛋白分泌水平。Wang 等^[25]通过筛选枯草芽胞杆菌的信号肽来研究一种核骨架类似蛋白 Nsp 的表达量与信号肽之间的关系,结果表明所有筛选到的 Sec 途径的信号肽都可以介导 Nsp 蛋白的分泌,而 Tat 途径的信号肽的分泌效率低于 Sec 途径的信号肽。覃晓琳等^[26]进行了信号肽的选择、改造以及信号肽的定点突变,研究了毕赤酵母中信号肽与蛋白表达效率之间的关系,提高了毕赤酵母中外源蛋白的分泌水平。本课题组^[15]通过对影响纳豆激酶表达的信号肽进行筛选,发现来源于枯草芽胞杆菌 168 中果聚糖酶信号肽 SP_{SacC} 可以显著提高纳豆激酶的分泌水平。此外,人们之前的研究结果提出,信号肽对于目标蛋白的转运效率并没有普适性,而且,自身的信号肽一般比较适用于目的蛋白的表达^[27]。本研究中,我们选取了 SP_{AprE}、SP_{SacC}、SP_{SacB} 和 SP_{Vpr} 4 种信号肽用于碱性丝氨酸蛋白酶的分泌研究。其中,SP_{SacC} 和 SP_{SacB} 被报道可以高效介导纳豆激酶、普鲁蓝酶的分泌^[7,10],而蛋白酶 Vpr 则是地衣芽胞杆菌蛋白质组数据中分泌量较高的蛋白^[10],SP_{AprE} 则是碱性丝氨酸蛋白酶自身的信号肽,因此,上述 4 种信号肽作为备选信号肽用于 AprE 蛋白的高效分泌研究。研究表明,碱性丝氨酸蛋白酶自身的信号肽对于 AprE 的分泌具有较好的作用,其相比于其它 3 种信号肽(SP_{SacC}、SP_{SacB} 和 SP_{Vpr})分别提高了 104.22%、136.01% 和 288.84%。在我们之前的研究中,SP_{AprE} 也对纳豆激酶的分泌具有良好的效果,其介导下的产量相比于纳豆激酶自身的信号肽提高了 4.04 倍^[10]。由于 AprE 是地衣芽胞杆菌中分泌量最大的胞外蛋白酶,因此,我们推测 SP_{AprE} 可以作为一个广谱优良的信号肽用于地衣芽胞杆菌中目的蛋白的高效分泌。

本研究通过优化启动子和信号肽,获得了一株能够高效表达碱性丝氨酸蛋白酶的地衣芽胞杆菌重组菌株 BL10/pP_{bacA}-aprE,同时通过对发酵培养基进行单因素优化实验和三因素三水平正交试验,获得了碱性丝氨酸蛋白酶发酵的最适培养基成分为:玉米淀粉 40.0 g/L,豆粕 50.0 g/L,(NH₄)₂SO₄ 4.0 g/L, K₂HPO₄ 3.0 g/L, CaCO₃ 1.0 g/L, pH 7.2,最大碱性丝氨酸蛋白酶活性达到 747.37 U/mL,相比于初始酶活提高了 3.45 倍。研究表明优化表达元件及培养基组分是一种提高碱性丝氨酸蛋白酶产量的有效策略。

REFERENCES

- [1] Yilmaz B, Baltaci MO, Sisecioglu M, et al. Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(6): 1241-1247
- [2] Li CL, Chai XJ, Yang J, et al. Cloning, expression and sequence analysis of protease gene *apr* by *Bacillus tequilensis*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(15): 286-291 (in Chinese) 李曹龙, 柴秀娟, 杨晶, 等. 芽胞杆菌蛋白酶基因 *apr* 的克隆、表达及序列分析[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(15): 286-291
- [3] Espinosa-de-los-Monteros J, Martinez A, Valle F. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(3): 379-384
- [4] Kang Z, Yang S, Du GC, et al. Molecular engineering of secretory machinery components for high-level secretion of proteins in *Bacillus* species[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(11): 1599-1607
- [5] Wang LF, Devenish RJ. Expression of *Bacillus subtilis* neutral protease gene (*nprE*) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology*, 1993, 139(2): 343-347
- [6] Liu XY, Zhang PP, Li LK, et al. Cloning and expression of alkaline protease gene by *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology*, 2007, 17(2): 13-16 (in Chinese) 刘新育, 张晶晶, 李林珂, 等. 枯草芽胞杆菌碱性蛋白酶基因的克隆和表达[J]. *生物技术*, 2007, 17(2): 13-16
- [7] Wang YP, Liu YH, Wang ZX, et al. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(9): 1783-1789
- [8] Strauch EM, Georgiou G. *Escherichia coli* *tatC* mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(2): 283-291
- [9] Yu XX, Xu JT, Liu XQ, et al. Identification of a highly efficient stationary phase promoter in *Bacillus subtilis*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18405
- [10] Cai D, Wei X, Qiu Y, et al. 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
- [11] Qiu YM, Xiao F, Wei XT, et al. Improvement of lichenysin production in *Bacillus licheniformis* by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 8895-8903
- [12] Melicherova K, Krahulec J, Šafránek M, et al. Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 1927-1934
- [13] Qiu YM, Zhang JY, Li L, et al. Engineering *Bacillus licheniformis* for the production of meso-2,3-butanediol[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 117
- [14] Wei XT, Tian GM, Ji ZX, et al. A new strategy for enhancement of poly- γ -glutamic acid production by multiple physicochemical stresses in *Bacillus licheniformis*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90(4): 709-713
- [15] Wei XT, Zhou YH, Chen JB, et al. 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
- [16] Cai DB, Wang H, He PH, et al. A novel strategy to improve protein secretion via overexpression of the SppA signal peptide peptidase in *Bacillus licheniformis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 70
- [17] Suliburska J, Bogdański P, Chiniewicz B. The influence of selected cardiovascular and antidiabetic drugs on pepsin activity *in vitro* digestion[J]. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 2012, 69(6): 1049-1053
- [18] Song YF, Nikoloff JM, Fu G, et al. Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158447
- [19] Li XY, Wang D, Cai DB, et al. Identification and high-level production of pulcherrimin in *Bacillus licheniformis* DW2[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(4): 1323-1335
- [20] Wang D, Wang Q, Qiu YM, et al. Untangling the transcription regulatory network of the bacitracin synthase operon in *Bacillus licheniformis* DW2[J]. *Research in Microbiology*, 2017, 168(6): 515-523
- [21] He PH, Zhang ZY, Cai DB, et al. High-level production of α -amylase by manipulating the expression of alanine racamase in *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(9): 1389-1394
- [22] Bron S, Bolhuis A, Tjalsma H, et al. Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in Bacilli[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1): 3-13
- [23] Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins[J]. *Protein Science*, 2012, 21(1): 13-25
- [24] Nam SE, Paetzel M. Structure of signal peptide peptidase A with C-termini bound in the active sites: insights into specificity, self-processing, and regulation[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(49): 8811-8822
- [25] Wang GQ, Chen HQ, Zhang H, et al. The secretion of an intrinsically disordered protein with different secretion signals in *Bacillus subtilis*[J]. *Current Microbiology*, 2013, 66(6): 566-572
- [26] Qin XL, Liu CQ, Zheng LY. Efficiency of signal peptide sequence in yeast secretory expression system[J]. *Biotechnology*, 2010, 20(3): 95-97 (in Chinese)
覃晓琳, 刘朝奇, 郑兰英. 信号肽对酵母外源蛋白质分泌效率的影响[J]. *生物技术*, 2010, 20(3): 95-97
- [27] Degering C, Eggert T, Puls M, et al. 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