



专论与综述

芽胞杆菌中重组蛋白分泌表达的优化策略及研究进展

曹雅蒙 郭淑元*

北京理工大学生命学院 北京 100081

摘要: 芽胞杆菌属具有良好的蛋白表达和分泌能力, 在工业酶的生产中被广泛应用, 是理想的工业宿主菌, 但实现蛋白分泌表达的普遍高效性还存在许多瓶颈。本文综述了芽胞杆菌的蛋白分泌表达策略, 从启动子、信号肽、分泌途径、宿主和培养条件这 5 个方面总结了提高芽胞杆菌中分泌表达重组蛋白的方法, 对芽胞杆菌高效生产工业酶有一定的参考价值, 最后展望了优化芽胞杆菌分泌表达的研究方向, 各种新型生物技术的发展必将推进芽胞杆菌在分泌表达领域有更深入的应用。

关键词: 芽胞杆菌, 分泌表达, 优化策略

Optimization strategy and research progress of recombinant protein secretory expression in *Bacillus*

CAO Yameng GUO Shuyuan*

School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract: *Bacillus* has good protein expression and secretion ability, and is widely used in the production of industrial enzymes. There are still many bottlenecks to achieve protein secretory expression with a generally high efficiency, although it is an ideal industrial host strain. In this review, the secretion pathway of protein in *Bacillus* is briefly described, and we summarize the strategies of host strain optimization for recombinant protein production from five different aspects, including promoter, signal peptide, secretion pathway, host strain and culture conditions, which has certain reference value for the efficient production of industrial enzymes in *Bacillus*. The research direction of optimizing secretory expression of *Bacillus* in the future is prospected. The development of various new biotechnology will certainly promote the further application of *Bacillus* in secretory expression.

Keywords: *Bacillus*, secretory expression, optimization strategy

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904104)

***Corresponding author:** E-mail: guosy@bit.edu.cn

Received: 08-12-2020; **Accepted:** 16-03-2021; **Published online:** 18-05-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0904104)

***通信作者:** E-mail: guosy@bit.edu.cn

收稿日期: 2020-12-08; **接受日期:** 2021-03-16; **网络首发日期:** 2021-05-18

1 芽胞杆菌中重组蛋白的分泌表达

重组蛋白的原核表达常用的宿主菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*)和芽胞杆菌(*Bacillus*)。大肠杆菌生长速度快、培养方式简单,是目前应用最广泛的宿主菌之一。大肠杆菌作为革兰氏阴性菌的代表生物,其细胞外膜上存在的内毒素限制了其在食品添加剂和药物生产中的应用^[1]。另外,大肠杆菌具有双层膜结构,重组蛋白在向胞外分泌时需要跨过2层屏障,困难较大,蛋白分泌程度难以达到理想水平。然而芽胞杆菌仅有一层细胞外膜,便于进行重组蛋白的大量生产和分泌。

芽胞杆菌在应用微生物学中发挥的作用可以追溯到一千多年前的纳豆生产。1982年,日本首次利用纳豆芽胞杆菌通过大豆的固态发酵生产了纳豆^[2]。之后,随着基因工程技术的迅速发展,芽胞杆菌的认识及研究得到不断完善,其成为了热点微生物^[3-4]。相较于其他应用于工业生产的微生物菌株,芽胞杆菌具有较为明显的优势,首先芽胞杆菌的遗传背景清楚,其中枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)是革兰氏阳性菌研究的模式生物^[5],对其研究较为深入;其次芽胞杆菌不存在内毒素,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认定为公认的安全菌株(Generally Recognized as Safe, GRAS)^[6-7]。此外,芽胞杆菌只有一层细胞外膜,易于重组蛋白的分泌,便于后续分离纯化。

目前常用的芽胞杆菌宿主菌有枯草芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)、短芽胞杆菌(*B. brevis*)、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)。这些宿主菌优点各异,均展现出良好的应用前景。例如巨大芽胞杆菌能利用多种碳源,营养要求低,可有效降低培养成本,另外其蛋白酶活性较低,重组蛋白不易被降解,重组质粒稳定、不易丢失^[8]。地衣芽胞杆菌的细胞壁蛋白基因拥有双启动子,可从中筛选双启动子,构建双向启动子载体^[9]。表1列出了几种芽胞杆菌分泌表达重组蛋白的应用。

在芽胞杆菌中开发稳定的表达系统和高水平生产重组蛋白一直是研究的热点,这一目标的实现取决于多种因素:载体的选择、转录翻译水平的提高、宿主菌的改造以及培养发酵条件的优化等^[17-20]。本综述简述了芽胞杆菌的分泌途径,从启动子、信号肽、分泌因子、宿主等方面归纳总结了提高重组蛋白分泌表达产量的有效方法。

2 芽胞杆菌的分泌途径

2.1 信号肽

在原核生物中,信号肽(Signal Peptide, SP)在蛋白分泌过程中扮演重要角色。信号肽是蛋白N-末端的一段序列,可将蛋白从细胞质运输到细胞壁或培养基中。革兰氏阳性菌的信号肽一般由16-30个氨基酸组成^[21],分为3段结构域:N-末

表1 芽胞杆菌分泌表达重组蛋白

Table 1 Recombinant proteins secreted in *Bacillus*

菌株 Strain	重组蛋白 Recombinant protein	活力/产量 Activity/Yield	参考文献 References
<i>B. subtilis</i>	嗜热 α -淀粉酶 Thermophilic alpha-amylase	35 779.5 U/mL	[10]
<i>B. subtilis</i>	葡糖聚酶 Glucanase	4.6 g/L	[11]
<i>B. subtilis</i>	左旋天冬酰胺酶 L-asparaginase	2.5 g/L	[12]
<i>B. pumilus</i>	耐高温木聚糖酶 Thermostable xylanase	5 407 IU/mL	[13]
<i>B. brevis</i>	甘露聚糖酶 Mannanase	22 480 U/mL	[14]
<i>B. megaterium</i>	左旋蔗糖酶 Dextranase	28.6 U/mL	[15]
<i>B. amyloliquefaciens</i>	碱性蛋白酶 Alkaline protease	30 200 U/mL	[16]

端、中间疏水序列、C-末端^[22]。N-末端带有1-3个正电荷,通常决定信号肽的方向性。中间疏水序列是决定信号肽疏水性的重要功能区,呈 α -螺旋结构,以“发卡”的结构插入膜中。C-末端是带负电荷的羧基末端,信号肽酶切割识别位点位于C-末端的-1和-3位残基(Ala-X-Ala)^[23],X一般是具有长支链的氨基酸。信号肽在指导蛋白跨膜后,被信号肽酶从蛋白N-末端特异性切除,产生成熟蛋白^[24]。

2.2 分泌途径

在蛋白质被合成后,蛋白质通过不同的机制被转运到作用的位置上继续发挥生理生化功能。芽胞杆菌主要通过3种途径转运和分泌蛋白质,分别是Sec-SRP (Sec-Signal Peptide Recognition Particle Pathway)转运途径、双精氨酸转运途径(Twin-Arginine Translocation Pathway, Tat)和ATP结合转运途径(ATP-Binding Cassette Transporters

Pathway, ABC)。其中ATP结合转运途径只转运和分泌特定的且分子量相对较小的蛋白质。

在芽胞杆菌中,大部分蛋白质通过Sec-SRP途径转运和分泌到胞外^[25](图1)。信号识别颗粒(Signal Recognition Particle, SRP)是一种保守的核糖核酸蛋白复合物,由scRNA (Small Cytoplasmic RNA)^[26]、Ffh (Fifty Four Homolog)^[27]、Hbsu (Histone-Like Protein)^[28]组成。SRP一般出现在翻译过程的早期,负责识别新生链的信号肽序列并将其靶向Sec转运酶^[29]。转运酶由SecA 马达蛋白、SecYEG转座蛋白、SecDF-YrbF复合物和YidC同系物组成^[30-31]。SecA^[32]是一种保守的ATP酶,为蛋白的转运与分泌提供能量。革兰氏阳性菌的转运机制中缺少SecB^[33],CsaA^[34]被认为是替代SecB发挥分子伴侣功能的蛋白。此外GroE、DnaK系列蛋白及触发因子等^[35-36]也与新合成蛋白相互作用。

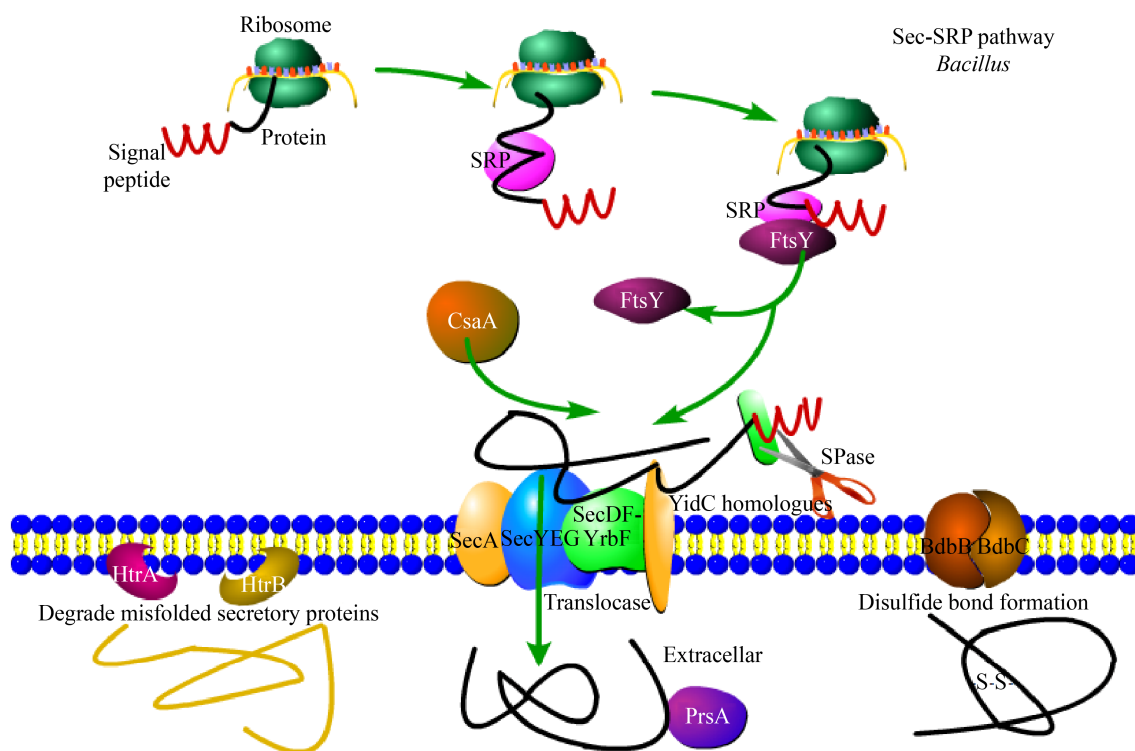


图1 芽胞杆菌 Sec-SRP 转运途径模式图

Figure 1 Pattern diagram of Sec-SRP secretion pathway in *Bacillus*

Tat 途径相较于 Sec 途径有 2 点明显不同^[37], 第一, Tat 转运途径通常转运和分泌紧密折叠的蛋白质或多亚基酶复合物, 这部分蛋白质无法通过 Sec-SRP 分泌途径进行转运与分泌。第二, Tat 途径转运蛋白通常携带双精氨酸信号肽^[38]。该途径通过跨膜的质子动力来促进蛋白转运, Tat 分泌因子由 TatC 和 TatA 蛋白组成^[39], 其中 TatC 与 Like-TatA 蛋白的相互作用是 Tat 途径转运的重要因素。目前在枯草芽胞杆菌中, PhoD 和 YwbN 家族蛋白是通过 Tat 途径转运和分泌的^[40]。

此外, 有些蛋白没有可识别的典型信号肽, 但也可分泌到细胞外。这类蛋白的分泌途径被称为“非经典分泌途径”^[41]。例如 Chen 等^[42]发现并鉴定了一种 One D-Psicose 3-Epimerase (RDPE), 该分泌蛋白属于乳球菌属, 不含天然信号肽, 并且其分泌不依赖于 Sec 或 Tat 途径, 是一种非经典分泌蛋白。

3 增强芽胞杆菌分泌能力的方法与策略

在开发芽胞杆菌表达系统时, 系统的分泌表达效率受多方面制约, 因此优化表达系统以提高分泌表达效率十分必要。目前, 优化蛋白分泌表达集中于基因转录和蛋白转运 2 个方面。例如增强启动子的转录活性、筛选最适的信号肽、过表达分子伴侣等。另外, 对现有芽胞杆菌宿主进行改造也可突破某些蛋白产量低的瓶颈。

3.1 启动子优化策略

启动子是重要的基因转录元件, 被相关的 σ 因子和 RNA 聚合酶识别, 对基因的高水平转录起着关键的调控作用。在芽胞杆菌中, 常用组成型启动子有 P_{43} 、 $P_{shuttle-09}$, 诱导型启动子有 P_{spac} 、 P_{xyl} 、 P_{sacB} 等^[43-44]。目前表达外源基因的启动子一般是天然启动子, 改造天然启动子的主要结构区域可提高启动子的活性。下面列出了几种比较成熟的启动子优化方法。

3.1.1 筛选天然强启动子

根据转录组数据信息筛选芽胞杆菌中的天然强启动子以扩大芽胞杆菌的强启动子库。Miao

等^[45]基于短小芽胞杆菌 BA06 的转录组, 筛选了 14 个转录活性高的启动子, 其中活性最高的强启动子 P_{2069} 使碱性蛋白酶的活性增强了 3.65 倍。Hartz 等^[46]对巨大芽胞杆菌 MS941 菌株的全基因组进行差异基因表达谱和微阵列分析, 根据启动子-35 和-10 区域及相关转录因子的结合位点, 筛选出 15 种天然启动子, 其中 P_{3537} 组成型启动子调控表达的 β -半乳糖苷酶的活性比优化的木糖诱导启动子提高了 30%。

3.1.2 芽胞杆菌启动子的改造

对筛选到的强启动子进行改造可以不同程度地提高外源基因的转录效率。启动子的改造有 3 种策略, 一种是对启动子序列的几个碱基进行突变。麦芽糖诱导表达系统常受到葡萄糖的抑制, 因此得到的重组蛋白产量低。Yang 等^[47]将 P_{glv} 启动子转录起始位点下游的分解代谢物阻遏元件(Cre 区)进行定点突变, 获得的 P_{glv-M1} 启动子受葡萄糖的抑制作用降低, 使 β -半乳糖苷酶的产量提高了 80%。另外, Xu 等^[48]将 P_{yib} 启动子-35 区的前 4 个核苷酸突变为“GGGG”和“CCCC”, 使 GFP 在枯草芽胞杆菌 WB600 中的表达量分别提高了 51.5%和 55.1%。第二种是将不同启动子-10 区与-35 区的序列进行替换、杂交, 从而获得新的转录活性增强的启动子。Wu 等^[49]将野生型启动子 P_{aprN} 的-10 区和-35 区序列分别替换为 σA 依赖型启动子的共有序列, 对-10 区的序列替换, 可使纳豆激酶的产量增加 136%, β -葡萄糖醛酸酶的产量增加 249%, 是提高枯草芽胞杆菌重组蛋白产量的有效途径。第三种是串联转录元件对启动子的特性和功能进行优化。异丙基苯甲酸酯(Cumate)诱导剂无毒廉价, 而且不受宿主菌碳代谢的抑制, 是一种优良的诱导剂。Seo 等^[50]针对宿主枯草芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌, 将芽胞杆菌组成型强启动子 P_{veg} 与恶臭假单胞菌的调控元件、CymR 阻遏物及其操作序列 CuO 结合, 构建 Cumate 诱导型启动子系统, 为芽胞杆菌提供了一个高效易用的

平台。

3.1.3 设计双启动子系统

在启动子转录活性的研究中发现将 2 个强启动子串联可以有效提高外源基因的转录水平。Zhang 等^[51]设计了 P_{Hpall} - P_{amyQ} 双启动子系统, 使 β -环胞苷酶的表达活性是单启动子 P_{amyQ} 表达活性的 1.26 倍, 此双启动子系统还指导了胞外支链淀粉酶表达(90.7 U/mL)和 α -降钙素基因相关肽酶表达(9.5 U/mL), 证明了该双启动子系统的普遍适用性。

3.2 信号肽的优化策略

在常用的芽胞杆菌宿主中, 蛋白的高分泌效率大多是通过与其同源信号肽融合表达实现的。然而重组蛋白的分泌产量通常较低, 选择合适高效的信号肽对芽胞杆菌重组蛋白的分泌具有较大影响。

3.2.1 从天然信号肽文库中筛选最佳信号肽

信号肽与分泌蛋白的最佳组合是影响分泌量的重要因素之一。对天然信号肽的筛选一般采用以下 2 种方式。

(1) 基于蛋白质组数据用生物信息学预测软件高通量筛选出天然信号肽库, 从天然信号肽库中为不同的重组蛋白筛选出分泌能力强的信号肽。Brockmeier 等^[52]利用 SignalP 3.0 筛选了枯草芽胞杆菌 168 中 173 个天然 Sec 型信号肽。Degering 等^[53]构建了地衣芽胞杆菌 DSM13 中 220 个 Sec 型信号肽文库。利用这 2 个信号肽文库分别选出了用于分泌角质酶和来自解淀粉芽胞杆菌的新型芽胞杆菌蛋白酶 BPN' 的最佳信号肽。随着计算机技术和生物信息学的发展, 信号肽预测软件的版本不断更新, 预测信号肽的准确率越来越高。例如, 2019 年 Almagro Armenteros 等^[54]发布了 SignalP 的第 6 个版本——SignalP 5.0, 其对革兰氏阳性菌的分泌蛋白信号肽预测的准确率为 89%, 对信号肽酶切割位点预测的准确率为 72%。

(2) 利用二维凝胶电泳、质谱等技术分析鉴定芽胞杆菌的分泌蛋白组, 采用信号肽预测软件对

分泌蛋白组进行分析, 构建其信号肽库。Wang 等^[55]分析鉴定了短小芽胞杆菌 SCU11 菌株 513 种分泌蛋白, 为短小芽胞杆菌提供了一个全面的分泌蛋白质组图谱。另外, 王智文等^[56]对苏云金芽胞杆菌 HD73 过渡期 T1 的分泌蛋白进行质谱鉴定, 建立了该菌株具有指导重组蛋白分泌潜力的信号肽库, 共有 27 种 Sec 型信号肽, 为构建苏云金芽胞杆菌分泌表达宿主奠定了基础。

3.2.2 使用同源蛋白的信号肽

对某个重组蛋白的分泌表达量进行优化, 可检索结构与功能相似的同源蛋白序列, 使用其中高分泌量蛋白的信号肽指导该重组蛋白的分泌。例如, 纳豆激酶的蛋白序列与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的蛋白序列具有同源性, 同时甘露聚糖酶的信号肽 SP_{SacC} 可以指导 BPN' 高效分泌, 因此 Wei 等^[57]用 SP_{SacC} 替换纳豆激酶的原始信号肽, 使其活性提高 129%, 碱性杆状杆菌蛋白酶 BprA 在地衣芽胞杆菌中具有较高的胞外蛋白酶活性, 表明其信号肽(SP_{BprA})能够高效指导蛋白分泌表达, 他们用 BprA 的信号肽替代纳豆激酶的原始信号肽, 使其活性提高了 53%。

3.2.3 优化信号肽序列

信号肽序列的优化通常从信号肽疏水核心区、N-末端带电荷数和 C-末端与成熟蛋白融合区域 3 个方面的改变来实现。

Sagiya 等^[58]在短芽胞杆菌 HPD31 中分泌表达金枪鱼生长激素(Tuna Growth Hormone, tGH)时, 在原始信号肽 N-末端加入了 2 个精氨酸残基, 在疏水核心区添加了 5 个亮氨酸, 使 tGH 产量增加了 10 倍, 达到 240 mg/L。Caspers 等^[59]将 α -淀粉酶的信号肽 N-末端的 2-7 位氨基酸进行饱和诱变, 从 1 000 多个突变体中鉴定出 4 种分泌角质酶活性增强 2-3 倍的突变菌株, 进一步分析得知改变信号肽 N-末端带电荷数可以提高重组蛋白的活性。另外, Hemilä 等^[60]在 α -淀粉酶信号肽 C-末端与成熟蛋白质 N-末端之间增加了 3-5 个氨基酸, 使其产量和活性提高了 40%和 15%, 表明

信号肽 C-末端与成熟蛋白质间的距离也会影响重组蛋白的分泌量。

3.2.4 过表达信号肽酶

在蛋白分泌的过程中,前蛋白在被信号肽酶切割掉信号肽后才能形成成熟蛋白,因此过表达信号肽酶以提高信号肽酶的切割效率,可以进一步增加蛋白的分泌水平。Malten 等^[61]在巨大芽胞杆菌 MS941 中过量表达 I 型信号肽酶 SipM,使肠膜明串珠菌葡聚糖蔗糖酶 DsrS 的活性增加了 3.7 倍。另外, Cai 等^[62]在研究地衣芽胞杆菌的 4 个 I 型信号肽酶基因(*sipS*、*sipT*、*sipV*、*sipW*)对纳豆激酶分泌的影响中发现,过量表达 I 型信号肽酶 SipV 可以促进纳豆激酶的分泌,使纳豆激酶的胞外活性达到了 35.60 FU/mL,比初始活性增加了 4 倍。

3.3 对分泌因子进行调控

Sec-SRP 分泌途径中的成分因子在蛋白转运的过程中发挥重要作用,它们确保蛋白质在转运过程中的稳定性和准确性。如 PrsA 可以促进信号肽的降解和蛋白的正确折叠^[63],膜结合酶 BdbB、BdbC 参与二硫键的形成,HtrA 和 HtrB 可以降解错误折叠的蛋白等^[64]。因此对分泌后期的成分因子进行修饰可增强重组蛋白的转运效率。Ma 等^[65]研究发现枯草芽胞杆菌 BNA 中参与 Sec 分泌途径的 *secDF* 和 *prsA* 基因是 2 个主要的分泌因子,*secDF* 和 *prsA* 的过表达可分别使胞外脂肪酶活性增加了 28%和 49%,进一步研究发现同时过表达 *secDF* 和 *prsA* 使胞外脂肪酶活性增加了 59%。

除了过表达分泌因子,对分泌因子进行改造也是一种有效的策略。SecA 的 C-末端是 SecB 的识别结合位点,但革兰氏阳性菌包括芽胞杆菌中缺乏 SecB,因此 SecA 的 C-末端对芽胞杆菌中蛋白的分泌是非必需的。Kakeshita 等^[66]删除了枯草芽胞杆菌 SecA 的 C-末端,使耐热碱性纤维素酶分泌量增加了 1.8 倍。

3.4 宿主菌的修饰和改造

目前,宿主菌的遗传修饰和改造具有普遍性

和高效性,是增加重组蛋白分泌表达量的常用策略之一,对宿主菌改造的研究集中在构建缺失蛋白酶突变菌株和删减芽胞杆菌非必需基因组 2 个方面。

宿主菌在生产重组蛋白的同时也会产生蛋白水解酶,这些蛋白水解酶可能会降解目标蛋白直接影响其产量,因此敲除宿主菌的蛋白酶是增加重组蛋白的稳定性和产量的有效方法。枯草芽胞杆菌 WB 系列突变菌株的构建是一个很好的应用范例,通过敲除一系列蛋白酶使目标蛋白的胞外活性显著提高,目前已报道的最新突变菌株是缺失了 9 种蛋白酶的 WB900。Zhao 等^[67]开发了一个枯草芽胞杆菌的蛋白酶评价系统以构建最佳的蛋白酶缺陷宿主,实现了甲基对硫磷水解酶、百菌清水解酶和 α -淀粉酶的高效分泌,证实了该系统的有效性。

在芽胞杆菌的基因组中,只有一小部分基因是细胞生长所必需的,去除非必需基因不仅有利于降低芽胞杆菌基因组的复杂度,而且还可以提高宿主对重组蛋白的生产效率,使其成为优秀的宿主菌^[68-69]。Morimoto 等^[70]构建了枯草芽胞杆菌 MGB874 菌株,其删除了野生型菌株 20%的基因组片段,使外源碱性纤维素和碱性蛋白酶的产量分别增加 50%和 150%。Reuß 等^[71]构建的枯草芽胞杆菌 PS38 菌株,将其基因组减少了约 36%,在培养基中的生长速率与野生型菌株相当,这也是目前枯草芽胞杆菌最精简的基因组,其在重组蛋白的高效分泌中的应用有待探究。

此外,不同的宿主对同一重组蛋白的分泌产量会有所差异。Lakowitz 等^[72]在生产 D1.3 单链抗体时,用巨大芽胞杆菌 MS941 与地衣芽胞杆菌 MW3 作为宿主的产量仅为 15 mg/L,而用枯草芽胞杆菌 WB800 作为宿主的产量可以达到 130 mg/L。因此,开发新型宿主,为重组蛋白的分泌表达提供更多的选择是十分必要的。苏云金芽胞杆菌能产生大量的以晶体的形式存在的杀虫

蛋白, 这些杀虫蛋白的启动子和形成机制可能会应用到重组蛋白的高效分泌上。王智文等^[56]对 Bt_HD73 分泌蛋白组和分泌途径的研究发现, Bt 具有很强的蛋白分泌能力, 但同时也会分泌大量的蛋白水解酶, 因此在构建 Bt 分泌表达宿主时将其敲除。目前, 重组蛋白在 Bt 中分泌表达的可能性及产量的研究正在进行中。

在宿主改造方面, 除了上述普遍有效的方法外, 还有一些方法也可提高重组蛋白的表达能力。与蛋白水解酶类似, RNA 和 DNA 酶会降解 RNA 和 DNA, 影响外源基因的转录和翻译, 从而影响重组蛋白的分泌表达。Nguyen 等^[73]发现地衣芽胞杆菌 DSM13 的 *Bli03719* 编码的蛋白具有鸟苷特异性 RNA 酶活性, 敲除 *Bli03719* 后使 α -淀粉酶的胞外活性增加了 2 倍; 细胞膜和细胞壁在蛋白分泌过程中起着重要的作用, 细胞表面工程也是增强蛋白分泌表达的有效途径。细胞壁的电荷密度影响着蛋白的分泌效率, Cao 等^[74]研究表明删除枯草芽胞杆菌的 2 个细胞表面相关酶 PssA 和 ClsA, 增加了细胞表面净负电荷数, 可使其分泌 α -淀粉酶的能力增强 47%。核酸酶和细胞表面工程的研究很少与蛋白的合成和分泌相联系, 因此采用这 2 个方面来优化分泌表达宿主还需要深入地探索。

3.5 对培养基成分和发酵条件进行优化

在重组蛋白的分泌表达过程中, 培养基成分和发酵条件往往对结果有显著作用。响应面法是一种优化工艺发酵条件的有效方法, 通过实验策略、数学建模和统计推断, 探究各因素与响应值之间的关系, 有效指导培养基组分和发酵条件的优化。Vasiee 等^[75]通过 Plackett-Burman 统计法和响应面法筛选出培养基组分的最佳组合, 使蜡样芽胞杆菌脂肪酶的胞外活性提高了 183%。随着响应面法理论研究的深入, 优化算法和实验设计方法对芽胞杆菌分泌系统的工业和商业应用具有重大意义。

4 总结及展望

芽胞杆菌是酶及功能蛋白合成和分泌的重要工业菌株, 具有安全无毒、遗传背景清晰、蛋白分泌能力强、发酵培养成本低等优点。未来, 芽胞杆菌分泌表达重组蛋白的优化策略将在以下研究内容中迎来更大的机遇与挑战。(1) 分泌表达元件的模块化和系统化: 将启动子(包括其-10 区和-35 区等)、信号肽(包括其 N-末端、H 区和 C-末端等)等元件以及菌株和培养条件等进行模块化, 针对某一目标蛋白可选择几种合适的模块组合成为定制的秘密表达系统。已有的报道大多只从一个方面研究芽胞杆菌分泌表达的优化策略, 整合各优势模块势必会实现目标蛋白更大量的表达和分泌。(2) 开发新型分泌表达元件和宿主: 开发新型强启动子、探索非经典分泌途径的机制以及开发新型优势宿主菌株, 为芽胞杆菌分泌表达重组蛋白提供更优势的模块。(3) 基因编辑技术的开发及应用: 基因编辑技术的发展大大提高了分泌表达系统的整合和改造效率。目前芽胞杆菌中已经成功开发了 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/dCas9 试剂盒^[76], 它们在多位点编辑和长片段删除方面的应用会极大地方便菌株改造; 另外还可以开发新型基因编辑系统, 例如李宗文等^[77]在地衣芽胞杆菌中建立了一种新型 FLP/FRT 基因编辑系统, 解决了地衣芽胞杆菌基因操作困难的问题。

REFERENCES

- [1] Mamat U, Wilke K, Bramhill D, Schromm AB, Lindner B, Kohl TA, Corchero JL, Villaverde A, Schaffer L, Head SR et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 57-71
- [2] Hara T, Ueda S. Regulation of poly glutamate production in *Bacillus subtilis* (natto): transformation of high PGA productivity[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(9): 2275-2281
- [3] Gu Y, Xu XH, Wu YK, Niu TF, Liu YF, Li JH, Du GC, Liu L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 109-121
- [4] Westers L, Westers H, Quax WJ. *Bacillus subtilis* as cell

- factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2004, 1694(1/3): 299-310
- [5] Cai D, Rao Y, Zhan Y, Wang Q, Chen S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(6): 1632-1642
- [6] 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
- [7] Contesini FJ, Melo RRD, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(3): 321-334
- [8] Wang ZH, Li JZ, Pan KC. The research progress on probiotic *Bacillus* expression system[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(12): 120-124 (in Chinese)
王振华, 李建臻, 潘康成. 益生芽胞杆菌表达系统的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(12): 120-124
- [9] Trung NT, Hung NM, Thuan NH, Canh NX, Schweder T, Jürgen B. An auto-inducible phosphate-controlled expression system of *Bacillus licheniformis*[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 3-10
- [10] Yao DB, Zhang K, Su LQ, Liu ZZ, Wu J. Enhanced extracellular *Bacillus stearothermophilus* α -amylase production in *Bacillus subtilis* by balancing the entire secretion process in an optimal strain[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 168: 107948
- [11] Hatada Y, Hidaka Y, Nogi Y, Uchimura K, Katayama K, Li Z, Akita M, Ohta Y, Goda S, Ito H, et al. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties, and crystallization of the recombinant enzyme[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(5): 583-592
- [12] Feng Y, Liu S, Jiao Y, Gao H, Wang M, Du GC, Chen J. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1509-1520
- [13] Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Kuhad RC. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(6/7): 733-739
- [14] Zhou HY, Rao LQ, Wu YY. Recombination of mannanase gene *man23* and its expression in *Brevibacillus brevis*[J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Sciences*, 2008, 34(4): 389-394 (in Chinese)
周海燕, 饶力群, 吴永尧. 甘露聚糖酶 *man23* 基因的重组及其在短芽胞杆菌中的表达[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2008, 34(4): 389-394
- [15] Biedendieck R. A *Bacillus megaterium* system for the production of recombinant proteins and protein complexes[J]. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*, 2016, 896: 97-113
- [16] Wang H. Establishment of the highly effective expression system in *Bacillus amyloliquefaciens* K11 and optimization of its efficient expression elements[D]. Beijing: Post-Doctor Work Report of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese)
王慧. 解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* K11 高效表达体系的建立及其高效表达元件的优化[D]. 北京: 中国农业科学院博士后研究报告, 2018
- [17] Tao LY, Gong JS, Su C, Jiang M, Li H, Li H, Lu ZM, Xu ZH, Shi JS. Mining and expression of a metagenome-derived keratinase responsible for biosynthesis of silver nanoparticles[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(4): 1307-1315
- [18] Li YM, Li YM, Li Q, Fan XY, Gao J, Luo Y. Rapid biosynthesis of gold nanoparticles by the extracellular secretion of *Bacillus niabensis* 45: characterization and antibiofilm activity[J]. *Journal of Chemistry*, 2016, 2016: 1-7
- [19] Ye BX, Zuo Y, Fu B, Zhang J, Zhang X. Optimization of culture medium and growth condition of *Bacillus* from sweet sauce made of fermented flour[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(1): 23-28 (in Chinese)
叶碧霞, 左勇, 傅彬, 张晶, 张鑫. 一株枯草芽胞杆菌培养基及培养条件的优化[J]. *食品科技*, 2017, 42(1): 23-28
- [20] Wang H, Wang YX, Yang RJ. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(3): 933-949
- [21] Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 52-61
- [22] Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, Jurischka S, Wiechert W, Freudl R, Oldiges M. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 208-218
- [23] Zalucki YM, Jennings MP. Signal peptidase I processed secretory signal sequences: selection for and against specific amino acids at the second position of mature protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 483(3): 972-977
- [24] Paetzel M. Bacterial signal peptidases[J]. *Sub Cellular Biochemistry*, 2019, 92: 187-219
- [25] Neef J, Bongiorno C, Schmidt B, Goosens VJ, Van Dijk JM. Relative contributions of non-essential Sec pathway components and cell envelope-associated proteases to high-level enzyme secretion by *Bacillus subtilis*[J].

- Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 52-64
- [26] Nakamura K, Imai Y, Nakamura A, Yamane K. Small cytoplasmic RNA of *Bacillus subtilis*: functional relationship with human signal recognition particle 7S RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(7): 2185-2192
- [27] Bunai K, Yamada K, Hayashi K, Nakamura K, Yamane K. Enhancing effect of *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of the SRP54 subunit of the mammalian signal recognition particle, on the binding of SecA to precursors of secretory proteins *in vitro*[J]. Journal of Biochemistry, 1999, 125(1): 151-159
- [28] Nakamura K, Yahagi SI, Yamazaki T, Yamane K. *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(19): 13569-13576
- [29] Kang Z, Yang S, Du GC, Chen J. 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
- [30] Park S, Schumann W. Optimization of the secretion pathway for heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 20(4): 623-633
- [31] Steudle A, Spann D, Pross E, Shanmugam SK, Kuhn A. Molecular communication of the membrane insertase YidC with translocase SecYEG affects client proteins[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3940
- [32] Van Wely KHM, Swaving J, Freudl R, Driessen AJM. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25(4): 437-454
- [33] Bechtluft P, Nouwen N, Tans SJ, Driessen AJM. SecB: a chaperone dedicated to protein translocation[J]. Molecular BioSystems, 2010, 6(4): 620-627
- [34] Müller JP, Ozegowski J, Vettermann S, Swaving J, Van Wely KHM, Driessen AJM. Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins[J]. The Biochemical Journal, 2000, 348: 367-373
- [35] Aguilar-Rodríguez J, Sabater-Muñoz B, Montagud-Martínez R, Berlanga V, Alvarez-Ponce D, Wagner A, Fares MA. The molecular chaperone DnaK is a source of mutational robustness[J]. Genome Biology and Evolution, 2016, 8(9): 2979-2991
- [36] Wu SC, Ye R, Wu XC, Ng SC, Wong SL. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(11): 2830-2835
- [37] Frain KM, Dijk JMV, Robinson C. The twin-arginine pathway for protein secretion[J]. EcoSal Plus, 2019, 8(2): 1-12
- [38] Nolandt OV, Walther TH, Roth S, Bürck J, Ulrich AS. Structure analysis of the membrane protein TatC(d) from the Tat system of *B. subtilis* by circular dichroism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(10): 2238-2244
- [39] Goossens VJ, Monteferrante CG, Van Dijk JM. The Tat system of Gram-positive bacteria[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2014, 1843(8): 1698-1706
- [40] Bernal-Cabas M, Miethke M, Antelo-Varela M, Aguilar Suárez R, Neef J, Schön L, Gabarrini G, Otto A, Becher D, Wolf D, et al. Functional association of the stress-responsive LiaH protein and the minimal TatA₇C₉ protein translocase in *Bacillus subtilis*[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2020, 1867(8): 118719
- [41] Kang Q, Zhang DW. Principle and potential applications of the non-classical protein secretory pathway in bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 953-965
- [42] Chen JQ, Zhao LQ, Fu G, Zhou WJ, Sun YX, Zheng P, Sun JB, Zhang DW. A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-16
- [43] Yu XX, Tian J, Liu XQ, Wu NF. Research progress of *Bacillus subtilis* expression system and its promoter regulatory elements[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(2): 35-44 (in Chinese)
余小霞, 田健, 刘晓青, 伍宁丰. 枯草芽胞杆菌表达系统及其启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 35-44
- [44] Miao M, Huang KL, Liang ZH. The characters and advances of *Bacillus* expression system[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(18): 312-316 (in Chinese)
苗苗, 黄昆仑, 梁志宏. 芽胞杆菌表达系统的特点及研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 312-316
- [45] Miao CC, Han LL, Lu YB, Feng H. Construction of a high expression system in *Bacillus* through transcriptomic profiling and promoter engineering[J]. Microorganisms, 2020, 8(7): 1030-1046
- [46] Hartz P, Mattes C, Schad M, Bernhardt R, Hannemann F. Expanding the promoter toolbox of *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 294: 38-48
- [47] Yang MM, Zhang WW, Chen YL, Gong YS. Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved P_{gtv} promoter[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 55-62
- [48] Xu JT, Liu XQ, Yu XX, Chu XY, Tian J, Wu NF. Identification and characterization of sequence signatures in the *Bacillus subtilis* promoter P_{yib} for tuning promoter strength[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(1): 115-124
- [49] Wu SM, Feng C, Zhong J, Huan LD. Enhanced production

- of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by promoter optimization[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(1): 99-106
- [50] Seo SO, Schmidt-Dannert C. Development of a synthetic cumate-inducible gene expression system for *Bacillus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 303-313
- [51] 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): 32-46
- [52] 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
- [53] 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
- [54] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(4): 420-423
- [55] Wang C, Yu SQ, Song T, He TT, Shao HH, Wang HY. Extracellular proteome profiling of *Bacillus pumilus* SCU11 producing alkaline protease for dehairing[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(11): 1993-2005
- [56] Wang ZW, Chen HB, Song FP, Guo SY. Identification and analysis of secretory proteins in *Bacillus thuringiensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(4): 169-176 (in Chinese)
王智文, 陈海波, 宋福平, 郭淑元. 苏云金芽孢杆菌分泌蛋白的鉴定及分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 169-176
- [57] 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
- [58] Sagiya Y, Yamagata H, Udaka S. Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in biologically active form by *Bacillus brevis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(2/3): 358-363
- [59] Caspers M, Brockmeier U, Degering C, Eggert T, Freudl R. Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1877-1885
- [60] Hemilä H, Sibakov M. Production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*: the effect of the joint between signal sequence and mature protein on yield[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 36(1): 61-64
- [61] Malten M, Nahrstedt H, Meinhardt F, Jahn D. Coexpression of the type I signal peptidase gene *sipM* increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 91(5): 616-621
- [62] 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
- [63] Chen JQ, Gai YM, Fu G, Zhou WJ, Zhang DW, Wen JP. Enhanced extracellular production of α -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(4): 899-906
- [64] Yan SM, Wu G. Proteases HtrA and HtrB for α -amylase secreted from *Bacillus subtilis* in secretion stress[J]. Cell Stress and Chaperones, 2019, 24(3): 493-502
- [65] Ma RJ, Wang YH, Liu L, Bai LL, Ban R. Production enhancement of the extracellular lipase LipA in *Bacillus subtilis*: effects of expression system and Sec pathway components[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 142: 81-87
- [66] Kakeshita H, Kageyama Y, Ara K, Ozaki K, Nakamura K. Enhanced extracellular production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* by deleting the C-terminal region of the SecA secretory machinery[J]. Molecular Biotechnology, 2010, 46(3): 250-257
- [67] Zhao LZ, Ye B, Zhang Q, Cheng D, Zhou CY, Cheng S, Yan X. Construction of second generation protease-deficient hosts of *Bacillus subtilis* for secretion of foreign proteins[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 2052-2060
- [68] Zhang JF, Li XY, Xu XJ, Chen XJ, Niu X, Ren SD, Li Y, Lu FP. Advance in the effect of reduction of the *Bacillus subtilis* genome on the expression of heterologous enzymes[J]. Microbiology China, 2021, 48(3): 859-872 (in Chinese)
张金方, 李昕悦, 徐小健, 陈雪佳, 牛馨, 任绍东, 李玉, 路福平. 枯草芽孢杆菌基因组删减对异源酶表达影响的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 859-872
- [69] Aguilar Suárez R, Stülke J, Van Dijl JM. Less is more: toward a genome-reduced *Bacillus* cell factory for “difficult proteins”[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(1): 99-108
- [70] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu SG, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome

- reduction in *Bacillus subtilis*[J]. DNA Research, 2008, 15(2): 73-81
- [71] Reuß DR, Altenbuchner J, Mäder U, Rath H, Ischebeck T, Sappa PK, Thürmer A, Guérin C, Nicolas P, Steil L, et al. Large-scale reduction of the *Bacillus subtilis* genome: consequences for the transcriptional network, resource allocation, and metabolism[J]. Genome Research, 2017, 27(2): 289-299
- [72] Lakowitz A, Krull R, Biedendieck R. Recombinant production of the antibody fragment D1.3 scFv with different *Bacillus* strains[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 14-31
- [73] Nguyen TT, Nguyen MH, Nguyen HT, Nguyen HA, Le TH, Schweder T, Jürgen B. A phosphate starvation-inducible ribonuclease of *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(8): 1464-1472
- [74] Cao HJ, Van Heel AJ, Ahmed H, Mols M, Kuipers OP. Cell surface engineering of *Bacillus subtilis* improves production yields of heterologously expressed α -amylases[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 56
- [75] Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S. Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM)[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 101: 36-43
- [76] Hong KQ, Liu DY, Chen T, Wang ZW. Recent advances in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(10): 153-161
- [77] Li ZW, Li YR, Gu ZH, Ding ZY, Zhang L, Xu S, Shi GY. Development and verification of an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(3): 458-471 (in Chinese)
- 李宗文, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 张梁, 徐沙, 石贵阳. 地衣芽胞杆菌 FLP/FRT 基因编辑系统的构建及验证[J]. 生物工程学报, 2019, 35(3): 458-471