

β -1,3-葡聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的表达与性质

张佳妮^{1,2}, 徐岩^{1,2}, 喻晓蔚^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 藤黄节杆菌 (*Athrobacter luteu*) β -1,3-葡聚糖酶 (β gl I) 能够特异性的作用于 β -葡聚糖中的 β -1,3-糖苷键, 在酵母裂解活性上具有突出优势, 但是 β gl I 在生产上存在表达低、生产成本高的问题。作者利用无缝克隆技术构建表达载体, 实现了 β gl I 在枯草芽孢杆菌中的分泌表达, 并通过比较不同 Tat 类型和 Sec 类型信号肽、RBS、5'UTR 等表达元件来提高 β gl I 的胞外产量。结果表明, 信号肽 SPLipA 使得 β gl I 表达水平提高了 0.4 倍, 在此信号肽基础上继续比较各 RBS 和 5'UTR 序列, 其中 cry3A 5'UTR 使 β gl I 产量高出出发菌株 1.2 倍。此外, 利用 Ni²⁺亲和层析柱纯化 β gl I 并对其酶学性质进行研究, 结果表明该酶的最适反应温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 6.0, 在 0~45 °C、pH 4.0~9.0 的范围内稳定性较好, 比活为 973 U/mg。

关键词: β gl I; 枯草芽孢杆菌; 分泌表达; 信号肽; RBS; 5'UTR

中图分类号: Q 814.4 文章编号: 1673-1689(2022)02-0029-08 DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2022.02.004

Expression and Characterization of β -1,3-Glucanase in *Bacillus subtilis*

ZHANG Jiani^{1,2}, XU Yan^{1,2}, YU Xiaowei^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Athrobacter luteu* β -1,3-glucanase (β gl I) specifically acts on β -1,3-glycosidic bonds in β -glucan, which has outstanding advantages in yeast lytic activity. However, the expression level of β gl I is low resulting in high cost of its production. This study achieved the secretory expression of β gl I by using seamless cloning technology in *Bacillus subtilis*, and improved the extracellular production of β gl I by optimizing expression elements such as Tat and Sec signal peptides, RBS and 5'UTR. The results showed that the signal peptide SPLipA increased the expression level of β gl I by 0.4 times. Then, RBS and 5'UTR were compared on the basis of this signal peptide, and the yield of β gl I increased by cry3A 5'UTR was 1.2 times higher than that of the parent strain. In addition, a Ni²⁺ affinity chromatography column was used to purify β gl I and its enzymatic properties were studied. The results showed that the optimum temperature and pH was 50 °C and pH 6.0, respectively. β gl I was more stable in the range of 0~45 °C and pH 4.0~9.0, and the specific activity of β gl I was 973 U/mg.

Keywords: β gl I, *Bacillus subtilis*, secretory expression, signal peptide, RBS, 5'UTR

收稿日期: 2020-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671799)。

* 通信作者: 喻晓蔚(1978—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子酶工程、发酵工程等方面的研究。E-mail: yuxw@jiangnan.edu.cn

内切 β -1,3-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.39 和 3.2.1.6) 作用于 β -葡聚糖主链中的 β -1,3-糖苷键, 在制备活性葡寡糖、酵母裂解、预防真菌病害等方面有广泛应用^[1-2]。来源于藤黄节杆菌的 β gl I (*Athrobacter luteu* ATCC 21606, β gl I) 是糖苷水解酶 64 家族的內切型 β -1,3-葡聚糖酶, 该酶在酵母裂解活性上具有突出优势, 可用于酵母营养物的抽提^[1]。酵母细胞內富含蛋白质、氨基酸和核苷酸, 其抽提物在食品风味改善上具有广泛应用, 采用条件温和的酶解法进行细胞破壁, 营养成分损失小, 可有效利用胞內营养物质^[3]。但是野生菌的 β gl I 表达水平低, 仅 3.5 U/mL^[4], 因而商品化的藤黄节杆菌 β -1,3-葡聚糖酶成本高, 价格昂贵, 亟待提高该酶的表达水平。薛伟^[5]等人利用大肠杆菌胞內表达 β gl I, 粗酶液裂解活性达 161 U/mL, 但革兰氏阴性细菌会产生内毒素等有害成分, 不适于进行食品表达应用。食品级安全菌株枯草芽孢杆菌常作为原核外源蛋白质分泌表达的宿主, 主要通过蛋白质的转录、翻译、转运和折叠等方面优化来提高异源蛋白质在枯草芽孢杆菌中的表达量^[6-8]。

在本研究中, 利用枯草芽孢杆菌异源表达 β gl I, 通过优化筛选信号肽、RBS、5'UTR 序列以期获得 β gl I 的高产菌株, 并对 β gl I 进行纯化及酶学性质研究。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

Bacillus subtilis WB600、*Escherichia coli* JM109 和表达质粒 pNSWP: 江南大学酿造微生物学与应用酶学研究室保存。

1.2 试剂与仪器

A. luteu β gl I 基因: 金唯智公司进行密码子优化并合成; 引物、四环素抗生素 (Tetracycline hydrochloride): 购自上海生工; PCR 产物纯化试剂盒: 购自康为世纪; DNA Marker、Protein Marker、高保真聚合酶 PrimeSTAR: 购自 TaKaRa 公司; MultiF Seamless Assembly Mix: 购自 ABclonal 公司; AZCL-Curdlan: 购自 Megazyme 公司。

AKTA 蛋白质纯化仪: GE 公司; PCR 仪、酶标仪、电泳仪: BIO-RAD 公司; 紫外可见分光光度计: 上海美普达仪器有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基: 氯化钠 1 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL, 酵母浸粉 0.5 g/dL。

TB 培养基: 蛋白胨 1.2 g/dL, 酵母浸粉 2.4 g/dL, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.64 g/dL, KH_2PO_4 0.23 g/dL, 甘油 0.5 g/dL。

1.4 基因克隆与重组表达系统的构建

采用 MultiF Seamless Assembly Mix 试剂盒通过无缝克隆技术将密码子优化的 β gl I 基因连接到 pNSWP 载体上, 构建获得重组质粒 pNSWP- β gl I, 该质粒在大肠杆菌中表现出氨苄青霉素抗性, 在枯草芽孢杆菌中表现出四环素抗性。 β gl I 基因位于该载体上枯草芽孢杆菌 α 淀粉酶启动子 PamyE 以及 amyE 信号肽下游, 从而进行分泌表达。将测序正确的重组质粒从大肠杆菌 JM109 中提取、纯化后, 采用化学转化法转化到枯草芽孢杆菌 WB600 感受态细胞中, 涂布在 LB (+Tetracyclines 20 μ g/mL) 平板上, 挑取阳性单克隆, PCR 验证, 获得重组菌株 WB600/pNSWP- β gl I, 以空载体转化菌株 WB600/pNSWP 为阴性对照。采用无缝克隆技术构建各个突变质粒, 并构建相应突变菌株。

1.5 重组菌株的发酵以及 β gl I 的表达

将重组菌株划线于 LB 平板 (+Tetracycline 20 μ g/mL) 上培养 12 h 后, 将单个菌落接种到 5 mL LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床中培养 9~10 h。吸取 2.5 mL 种子液接种于 50 mL TB 培养基中, 添加四环素至终质量浓度为 20 μ g/mL。将摇瓶置于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养, 每隔 6 h 取样测定发酵样品的相关参数, 包括 OD₆₀₀、酶活、SDS-PAGE。

1.6 亲和层析纯化 β gl I

在 β gl I 蛋白质的 C 端添加 6 His 纯化标签, 摇瓶发酵 48 h 后收集发酵液, 然后采用 60% 饱和度、pH 8.0 的硫酸铵溶液于 0 $^{\circ}$ C 浓缩沉淀粗酶液 4~5 h。收集蛋白质沉淀并用 pH 8.0 Tris-HCl (20 mmol/L) 缓冲液透析处理, 用 Ni²⁺亲和层析柱纯化 β gl I。纯化的 β gl I 置于终体积分数为 10% 的甘油中, 液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 β gl I 酶活测定

β gl I 酶活测定方法参照 Brumm P 的方法^[9]。反应体系由 5 mg AZCL-Curdlan^[10-12]底物、490 μ L pH 6.0 (100 mmol/L) 磷酸钾缓冲液以及 10 μ L 酶液组成, 在 50 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 下反应 10 min。反应结束

后立即加入 50 μ L HCl(4 mol/L)终止反应,吹吸混匀后冰浴 2 min。然后于 12 000 r/min 离心 3 min,收集上清液,取 200 μ L 上清液于 96 孔板中,使用酶标仪测定 A_{590} 。将 10 μ L 酶液替换为缓冲液作为空白对照。

单位酶活 U 定义为,在 50 $^{\circ}$ C 及 pH 6.0 条件下,使 5 mg AZCL-Curdlan 底物溶液的上清液在 590 nm 处吸光值每分钟增加 0.1 所需要的酶量为一个单位(U)。

$$\text{酶活} = \frac{\Delta A}{V \times t \times 0.1}$$

式中: ΔA 为样品上清液 A_{590} 减去空白对照上清液 A_{590} ; V 为反应酶液体积, mL; t 为反应时间, min。

1.8 最适温度及最适 pH 值的测定

参照 1.7 酶活测定方法,测定纯化的酶溶液在 30、35、40、45、50、55、60、65、70、80 $^{\circ}$ C 下的酶活,确定 β gl I 的最适反应温度。

参照 1.7 酶活测定方法,在最适反应温度下测定纯化的酶溶液在 pH 4.0、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 9.0 的酶活,确定 β gl I 的最适反应 pH 值。

1.9 温度稳定性及 pH 值稳定性的测定

参照 1.7 酶活测定方法,探究 β gl I 的温度稳定性和 pH 值稳定性。

温度稳定性测定:将纯化的酶溶液在 30、35、40、45、50、55、60、65、70、80 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后,在最适温度及最适 pH 条件下测定残余酶活。

pH 值稳定性测定:将纯化的酶溶液在 pH 4.0、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 9.0 的缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后,在最适温度及最适 pH 值条件下测定残余酶活。

1.10 金属离子对酶促反应的影响

参照 1.7 酶活测定方法,在酶活力测定反应体系中分别加入 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 至终浓度为 5 mmol/L,然后在最适反应条件下测定酶活。所选金属盐为 KCl、 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $CuSO_4$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 。为防止金属离子与缓冲液产生离子沉淀反应,使用 pH 6.0(100 mmol/L)柠檬酸缓冲液代替磷酸缓冲液配制各反应体系。

2 结果

2.1 重组酶在枯草芽孢杆菌中的表达

在 WB600/pNSWP- β gl I 表达体系中, β gl I 基

因由枯草芽孢杆菌 α 淀粉酶启动子 PamyE 启动转录表达。参照培养方法 1.5 进行 WB600/pNSWP- β gl I 摇瓶培养,发酵 60 h 后结束,发酵趋势见图 1。在 WB600/pNSWP- β gl I 发酵 24 h 后, β gl I 表达量开始增加;48 h 时酶活可达 195 U/mL;60 h 时 OD_{600} 开始下降,但酶活持续增高。

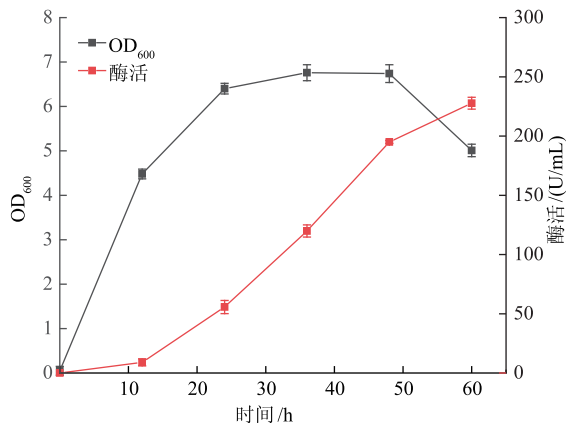


图 1 WB600/pNSWP- β gl I 摇瓶发酵曲线

Fig. 1 Fermentation curves of WB600/pNSWP- β gl I in shake flask

2.2 信号肽对 β gl I 表达的影响

在本研究中,采用半理性筛选的方法选择表 1 中 10 条信号肽,替换载体上初始信号肽 SP_{amyE}(SP0),分别包括 Tat 分泌类型和 Sec 分泌类型信号肽。

在发酵 48 h 时取样测定各菌株的酶活与生物量,以出发菌株 SP0(WB600/pNSWP- β gl I)为对照。在生物量生长上除 SP10 生物量偏高,各菌株无明显差异。SP1 和 SP10 导致重组 β gl I 未表达,SP4 与 SP9 的酶活显著提高,前者为 Tat 分泌类型,后者属于 Sec 分泌类型。相较于出发菌株 SP0 酶活 195 U/mL,以 SP4 为信号肽酶活提高了 40%,以 SP9 为信号肽酶活提高了 33%,见图 2。在本研究中,Tat 分泌类型的 SP4(LipA)更有利于 β gl I 在 WB600 表达系统中表达,该重组菌株命名为 WB600/pNSWP-SP_{LipA}- β gl I。

2.3 RBS 及 5'UTR 对 β gl I 表达的影响

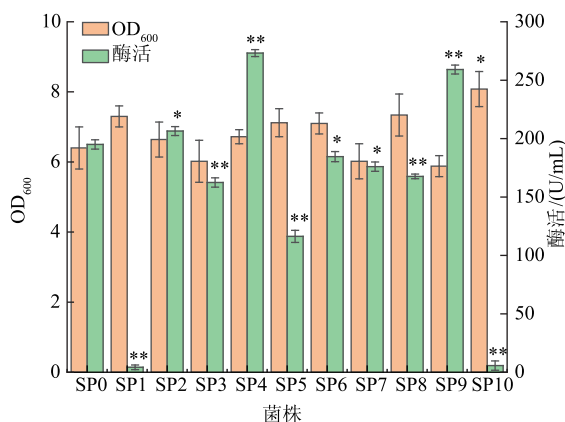
RBS(Ribosome-Binding Site,RBS)序列优化以及 5'UTR(5'Untranslated region,5'UTR)序列优化均在 pNSWP-SP_{LipA}- β gl I 质粒基础上构建。RBS 序列在翻译上影响目的蛋白质的表达量。在枯草芽孢杆菌中,RBS 序列中的核心区 SD(Shine-Dalgarno,SD)序列大多符合“AAGGAGG”序列特点^[18-19],该序

表 1 枯草芽孢杆菌中的表达信号肽

Table 1 Signal peptides expressed in *Bacillus subtilis*

菌株	分泌途径	信号肽	氨基酸序列(斜体是预测的疏水区域)	正电荷数/ 疏水氨基酸数	参考文献
SP0		AmyE	MFAKRFKTSLLPLFA GFLLLFHLVLA GPAAASAEAM	3/23	[13]
SP1	Tat	β gl I	MPHDRKNSSRRA WAALCAA VLA VSGALVGVAAPASA	3/19	[14]
SP2		WapA	MKKRKRNRNFKRFIAA FLVLALMISLVPA DVLA KST	8/21	[15]
SP3		YfkN	MRIQKRRTHVENILRILLPPIMLSLILPTPIHA	4/26	[16]
SP4		LipA	MKFVKRRRIALVTILMLS VTSLFA LQPSAKA	4/18	[17]
SP5		TipA	MKKTLTIRRSSIARRLHSFLLILV PITALSVSAYQS	6/16	[16]
SP6		WprA	MKRRKFSSVVA A VLIFALIFSLFSPGTKAAA	4/20	[16]
SP7		Sec	AbnA	MKKKKTWKRFLHFSSAALA A GLIFSAAPAEA	6/17
SP8	Bpr		MRKKTKNRLISSV LSTVVISLLFPGAAGA	5/14	[16]
SP9	Mpr		MKLVPRFRKQWFA YLTVLCLALAAA VSGVPAKA	4/19	[16]
SP10	PhoB		MKKFPKLLPIA VLSSIA FSSLA SGVPEASA	4/20	[16]

注:计算 N 区的净电荷,氨基酸 D 和 E 定义为-1;R 和 K 定义为+1,其他定义为 0;氨基酸 G、A、V、L、I、M、F、W 和 P 定义为每个信号肽序列的疏水性氨基酸,其他为亲水性氨基酸。



* 表示 $P \leq 0.05$, ** 表示 $P \leq 0.01$ 。

图 2 信号肽对 β gl I 在 WB600 中表达的影响Fig. 2 Effect of signal peptide on the expression of β gl I in WB600

列与 16S rRNA 3'末端反向互补,其中启动子 PgsiB 下游的 RBS 被认为是已知枯草芽孢杆菌翻译强度非常强的天然 RBS 序列^[20-21]。设计 6 条 RBS 序列替换载体上初始 RBS_{AmyE}(R0)序列,见表 2。5'UTR 序列对 mRNA 的稳定性有一定影响。研究表明,若 5'UTR 含有茎环结构,且游离核苷酸较少,则更有利于 mRNA 的稳定,半衰期则更长^[22]。选择 5'末端含有茎环结构且半衰期大于 20 min 的 5'UTR 序列:sp82、aprE、cry3A,替换载体上初始 amyE 5'UTR,其中 sp82 和 cry3A 5'UTR 上游接 PamyE 上分解代谢物操纵子 amyO^[24]序列,下游接初始 RBS_{AmyE}(R0)序列;aprE 5'UTR 替换 amyE 5'UTR 全部序列,见表 3。对照为出发菌株上 amyE 5'UTR,经查阅其半衰期仅为 5 min^[23]。

表 2 枯草芽孢杆菌相关 RBS 序列

Table 2 Related RBS sequences of *Bacillus subtilis*

菌株	DNA 序列	注释	参考文献
R0	AAAATCAAATAAGGAGTGTCAAGAATG	SP 系列菌株中 PamyE 下游的 RBS 序列	[24]
R1	AAAATCAAGAAAGGAGGGTCAAGAATG	PamyE 的突变 RBS 序列	本研究
R2	GATTAACATAAAGGAGGACAAAACATG	Phyerspank 的优化 RBS 序列	[19]
R3	CACCAATTAAGGAGGAATTCAAAATG	PgsiB 下游的 RBS 序列	[21]
R4	GTTATTGGGAAACCAGCTGAAAAGGAGGATTTATTATG	RBS caculator 预测的 SP _{LipA} -RBS 序列	本研究
R5	CCCGATTACTCCCCAAAGGAGGTTAATTTATG	RBS caculator 预测的 SP _{LipA} -RBS 序列	本研究
R6	TCAAGCGAAAAAGGAGGTTTATATTATG	RBS caculator 预测的 SP _{LipA} -RBS 序列	本研究

注:下划线部分为 DNA 上翻译起始位点。

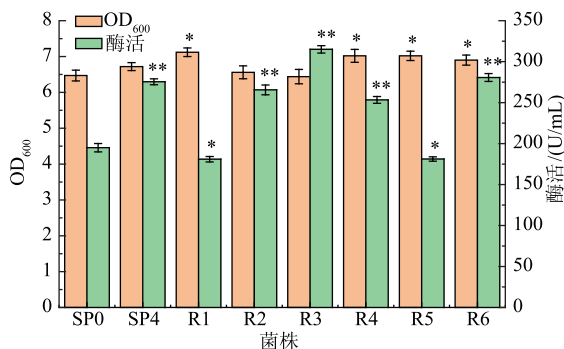
表 3 枯草芽孢杆菌相关 5'UTR 序列

Table 3 Related 5'UTR sequences of *Bacillus subtilis*

菌株	DNA 序列	注释	参考文献
amyE 5' UTR	AAGCGTTAACAAAATTCTCCAGTCTTTCACATCGGTTTGAAGGAGGAAGCGGAAGAATG AAGTAAAGAGGGATTTTTGACTCCGAAGTAACTCTTCAA	SP 系列菌株中的 amyE 5'UTR 序列	[25]
sp82 5' UTR	CCCCTTCAGCAGTTGCTAGTACTCACCCAAGCGGGTGGGCACCATGGAGCCGCTGAGC TACCACAGATTGTGAAAGGAGAGGTTAAC	枯草芽孢杆菌噬菌体 sp82 88bp-stab	[22]
aprE 5' UTR	ACAGAATAGTCTTTTAAGTAACTACTCTGAATTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGA GUG	aprE 前导序列	[23]
cry3A 5' UTR	AAATTATTTATCTTGAAGGAGGGATGCCTAAAAACGAAGAACATTAACATATATTT TGCACCGTCTAATGGATTTATGAAAAATCATTTTATCAGTTTGAAAAATTATGTATTAT	cry3A Sta-seq	[26-27]

注:下划线部分为 DNA 上翻译起始位点。

以 SP0(WB600/pNSWP- β gl I) 为出发菌株作为实验对照,48 h 发酵结束,RBS 优化结果见图 3。其中 R3 比出发菌株高 120 U/mL,但与 SP4(WB600/pNSWP-SP_{LipA}- β gl I) 相比仅高出 40 U/mL,即高出约 0.15 倍,表达优势不明显。R1 为将 RBS_{amyE} 的 SD 序列突变为与 16S rRNA 3'末端严格反向互补序列“AAAGGAG”,结果反而导致蛋白质表达量下降。R4、R5、R6 为“RBS Calculator v2.1”(https://salislab.net/software/design_rbs_calculator)^[18,28] 以最高翻译强度优化的不同长度的 RBS 序列,但对于 β gl I 的表达量无明显提高。



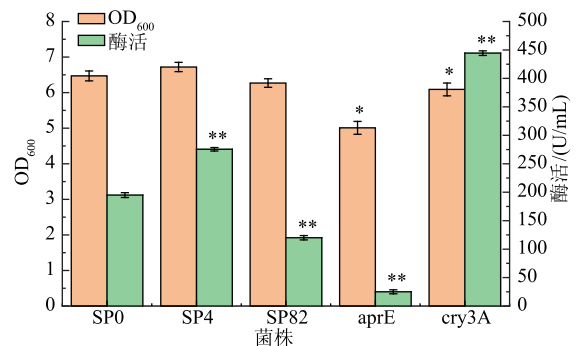
* 表示 $P \leq 0.05$, ** 表示 $P \leq 0.01$ 。

图 3 RBS 序列对 β gl I 在 WB600 中表达的影响

Fig. 3 Effect of RBS sequence on the expression of β gl I in WB600

5'UTR 序列均选择天然序列,替换初始 amyE 5'UTR,发酵 48 h 结束,结果见图 4。sp82 和 aprE 5'UTR 序列均导致 β gl I 表达量下降,反之,cry3A 5'UTR 对于 β gl I 在枯草芽孢杆菌中的表达贡献极大,比 SP4(WB600/pNSWP-SP_{LipA}- β gl I) 酶活高出 169 U/mL,比出发菌株 SP0(WB600/pNSWP- β gl I) 高出 249 U/mL,约 1.2 倍。SDS-PAGE 结果见图 5, β gl I 相对分子质量大小在 57 000 左右^[4],pNSWP-

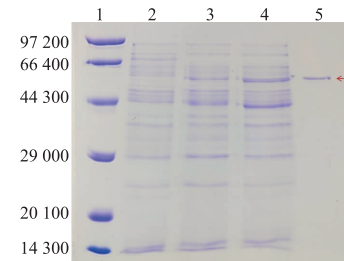
cry3A-SP_{LipA}- β gl I 在该位置条带比对照 pNSWP- β gl I 粗。



* 表示 $P \leq 0.05$, ** 表示 $P \leq 0.01$ 。

图 4 5'UTR 序列对 β gl I 在 WB600 中表达的影响

Fig. 4 Effect of 5'UTR sequence on β gl I expression in WB600



15 μ L 发酵上清液与 5 μ L 缓冲液混匀后煮沸 10 min,上样 20 μ L。泳道 1:蛋白质 Marker(Low);泳道 2:WB600/pNSWP 发酵上清液;泳道 3:WB600/pNSWP- β gl I 发酵上清液;泳道 4:WB600/pNSWP-cry3A-SP_{LipA}- β gl I 发酵上清液;泳道 5:纯化的 β gl I。

图 5 β gl I SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE profile of β gl I

2.4 β gl I 的酶学特性分析

最适温度和温度稳定性的测定结果见图 6,以最高比活为 100%。 β gl I 在 50 $^{\circ}$ C 左右显示出最高比活;温度超过 60 $^{\circ}$ C 时,不再利于 β gl I 的酶促反应;

低于 45 °C 条件下孵育 30 min 对 β gl I 酶活影响较小;但在 50 °C 条件下孵育 30 min,酶活开始有明显下降;55 °C 孵育 30 min 后, β gl I 接近于彻底失活。

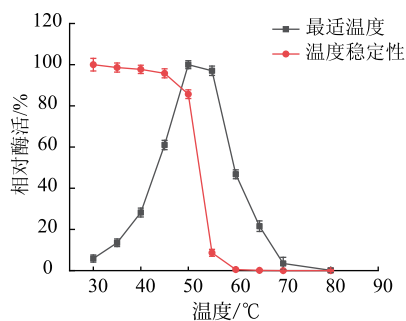


图 6 β gl I 的最适反应温度和温度稳定性

Fig. 6 Optimum reaction temperature and temperature stability of β gl I

最适 pH 和 pH 稳定性的测定结果见图 7。 β gl I 的最适 pH 值在 6.0 左右,最适反应条件下比活约为 973 U/mg。酶活在 pH 5.5~6.5 较高,该酶的稳定性较强,在 pH 4.0~9.0 孵育 6 h 后,依然有 80% 以上残余酶活。

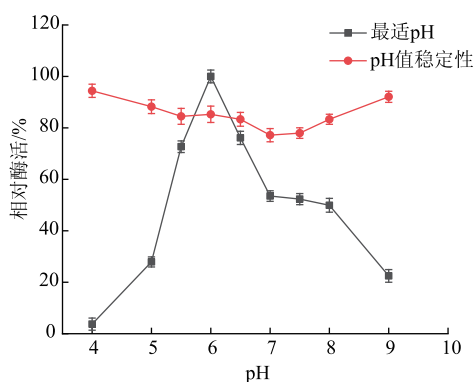


图 7 β gl I 的最适 pH 值和 pH 值稳定性

Fig. 7 Optimum pH and pH stability of β gl I

近期研究发现,许多糖苷水解酶含有 β γ -结构,该结构具有 Ca^{2+} 结合位点,这表明 Ca^{2+} 对于糖苷水解酶的酶促反应具有一定贡献^[29-30]。因而作者研究了 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 6 种金属离子对 β gl I 的酶活影响^[30],结果见图 8。与不添加任何金属离子的对照相比,6 种金属离子对 β gl I 的酶促反应无明显影响。

3 讨论

藤黄节杆菌来源的 β gl I 在裂解酵母制备酵母抽提物中具有突出的优势。然而, β gl I 在生产中存在野生型或外源表达水平低的问题,且还未有报道

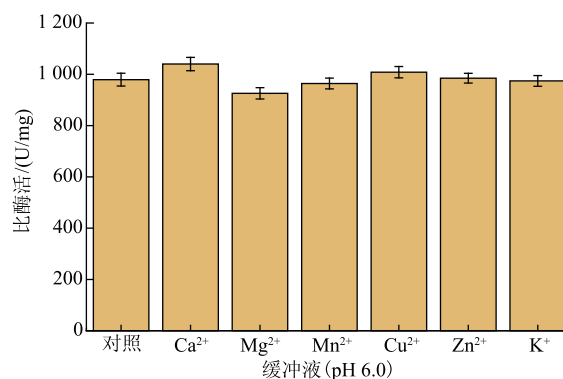


图 8 金属离子对 β gl I 酶促反应的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on β gl I enzymatic reaction

其在枯草芽孢杆菌中表达。本研究采用食品级安全菌株枯草芽孢杆菌表达 β gl I,并通过优化表达元件来提高 β gl I 的产量,对拓展 β gl I 在食品、饲料中的应用具有重要意义。

在本研究中,采用了较强组成型启动子 PamyE 以及 amyE 信号肽将 β gl I 在 WB600 中进行分泌表达,进一步通过优化信号肽、RBS 和 5'UTR 提高了 β gl I 的表达量。信号肽决定新合成蛋白质的分选、转运,对于目的蛋白质在异源宿主中的表达也有一定影响。研究发现,信号肽具有如下特征能够更加有效地促进蛋白质分泌,如含有带正电荷更高的 N-结构域,更疏水的 H-结构域和更保守的 C-结构域^[31-32]。作者比较了 11 条信号肽,结果显示,Tat 分泌类型的 SP4(LipA)与 Sec 分泌类型的 SP9(Mpr)能够提高 β gl I 的胞外表达水平,发酵上清液中粗酶酶活比出发菌株 SPO 分别高 0.4 倍和 0.3 倍,这两条信号肽的 N-结构域正电荷数和 H-结构域疏水性都处于较高水平。CAZY 数据库(http://www.cazy.org/GH64_characterized.html)中表明 β gl I 蛋白质通过 Tat 分泌途径分泌至胞外环境中,在本研究中,Tat 分泌类型的信号肽 SP4 (LipA) 更有利于 β gl I 在枯草芽孢杆菌 WB600 宿主中表达,这可能与 β gl I 属于 Tat 分泌途径蛋白质有关。

RBS 是翻译起始和蛋白质表达的关键控制元件^[28]。在本研究中,初始 RBS 采用了 PamyE 下游的 RBS 序列“AATAAGGAGTGT”,为了增强翻译强度从而提高目的蛋白质的表达量,比较了 7 条 RBS 序列的表达效果。结果显示,R3(RBS_{gsIB})表达量最高,粗酶酶活比出发菌株 SPO 高 0.61 倍。这可能是因为 RBS_{gsIB} 的 SD 序列“5'-AAAGGAGG-3'”与 16S

rRNA 3'末端“3'-UUUCCUCC-5'”相互作用强度高,且距离翻译起始位点 ATG 具有最佳的 9 bp 间隔。RBS_{ssiB} 被认为是枯草芽孢杆菌中翻译强度非常强的天然 RBS 序列^[20]。

5'UTR 元件与 mRNA 的稳定性密切相关,从而影响目的蛋白质的表达量。在本研究中,amyE 5'UTR 被用作初始 5'UTR 序列。据报道,该序列引导的 amyE mRNA 半衰期为 5 min^[23]。为了提高 mRNA 的稳定性,从而提高 β gl I 的表达量,作者比较了 4 条 5'UTR 序列。结果显示,cry3A 5'UTR 更有利于 β gl I 的表达,与出发菌株相比酶活提高了 1.2 倍。据文献报道,cry3A 5'UTR 引导的 mRNA 半衰期为 20 min,其 5'末端含有与翻译起始无关的 SD 序列“GAAAGGAG”,该序列与 16S rRNA 3'末端严格反向互补,是其稳定性的关键因素^[33]。

β gl I 的酶学特性研究较少,目前仅在最适 pH 以及底物特异性方面有相关报道^[4]。作者对 β gl I 在温度、pH、金属离子影响等方面进行了研究。结果显

示, β gl I 在 50 °C 下显示出最高酶活,在低于 40 °C 下稳定性较强。以往报道中并未探究 β gl I 的最适反应温度,测定活性时将 β gl I 置于 37 °C 条件下反应,然而 37 °C 下 β gl I 的酶活显示较低^[4-5,14,34]。其他内切 β -1,3-葡聚糖酶也多在 50 °C 左右显示最高酶活^[30,35-37]。 β gl I 的最适反应 pH 值在 6.0 左右,这与已报道的 β gl I 的葡聚糖酶活性最适 pH 相符合^[4]。 β gl I 在 pH 4.0~9.0 显示出较高的 pH 稳定性,孵育 6 h 后依然具有大于 80% 的残余酶活。其他内切 β -1,3-葡聚糖酶也在 pH 4.0~9.0 条件下具有大于 80% 的残余酶活^[30,35]。

4 结 语

本研究实现了 β gl I 在枯草芽孢杆菌中的表达,通过优化信号肽、RBS 和 5'UTR 将其表达量提高了 1.2 倍,并研究了其酶学特性,为拓宽 β gl I 的工业应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] FERRER P. Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic beta-1,3-glucanases toolbox: a review[J]. **Microbial Cell Factories**, 2006, 5: 10.
- [2] KUMAGAI Y, OKUYAMA M, KIMURA A, et al. Heat treatment of curd enhances the enzymatic production of biologically active beta-(1,3)-glucan oligosaccharides[J]. **Carbohydrate Polymers Scientific & Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides**, 2016, 146: 396-401.
- [3] 张晓桐, 朱萌, 毛志海, 等. 酵母抽提物提取工艺及应用的研究进展[J]. **中国调味品**, 2019, 44(2): 160-163.
- [4] SCOTT J H, SCHEKMAN R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis[J]. **Journal of Bacteriology**, 1980, 142(2): 414-423.
- [5] 薛伟, 罗晖, 常雁红, 等. 藤黄节杆菌 β -1,3-葡聚糖酶基因在大肠杆菌中的克隆及表达[J]. **生物技术通报**, 2010(10): 210-214.
- [6] 张大伟, 康倩. 枯草芽孢杆菌蛋白质表达分泌系统发展及展望[J]. **微生物学杂志**, 2019, 39(1): 1-10.
- [7] VOLKENBORN K, KUSCHMIERZ L, BENZ N, et al. The length of ribosomal binding site spacer sequence controls the production yield for intracellular and secreted proteins by *Bacillus subtilis*[J]. **Microbial Cell Factories**, 2020, 19(1): 154-165.
- [8] PANG B, ZHOU L, CUI W, et al. Production of a thermostable pullulanase in *Bacillus subtilis* by optimization of the expression elements[J]. **Starch-Stärke**, 2020, 72(11-12): 1-7.
- [9] BRUMM P, HERMANSON S, HOCHSTEIN B, et al. Mining dictyoglomus turgidum for enzymatically active carbohydrases[J]. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, 2011, 163(2): 205-214.
- [10] HUANG Y, YI Z, JIN Y, et al. Metatranscriptomics reveals the functions and enzyme profiles of the microbial community in Chinese nong-flavor liquor starter[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2017, 8: 1747-1760.
- [11] PITT J, LANGE L, LACEY A, et al. *Aspergillus hancockii* sp. nov. a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils[J]. **Plos One**, 2017, 12(4): e0170254.
- [12] WILKENS C, BUSK P, PILGAARD B, et al. Diversity of microbial carbohydrate-active enzymes in Danish anaerobic digesters fed with wastewater treatment sludge[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2017, 10(1): 158-171.
- [13] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2017, 101(4): 1509-1520.

- [14] SHEN S, CHRETIEN P, BASTIEN L, et al. Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1991, 266(2): 1058-1063.
- [15] MU D, LU J, QIAO M, et al. Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 102(13): 5533-5543.
- [16] ZHANG W, YANG M, YANG Y, et al. Optimal secretion of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016, 100(20): 8745-8756.
- [17] TIAN J, LONG X, TIAN Y, et al. Enhanced extracellular recombinant keratinase activity in *Bacillus subtilis* SCK6 through signal peptide optimization and site-directed mutagenesis[J]. **RSC Advances**, 2019, 9(57): 33337-33344.
- [18] XIAO J, PENG B, SU Z, et al. Facilitating protein expression with portable 5'UTR secondary structures in *Bacillus licheniformis* [J]. **ACS Synthetic Biology**, 2020, 9(5): 1051-1058.
- [19] GUIZIOU S, SAUVEPLANE V, CHANG H, et al. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*[J]. **Nucleic Acids Research**, 2016, 44(15): 7495-7508.
- [20] HAMBRAEUS G, PRESSON M, RUTDERG B. The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis* [J]. **Microbiology**, 2000, 146(12): 3051-3059.
- [21] PHAN T, NGUYEN H, SCHUMANN W. Construction of a 5'-controllable stabilizing element (CoSE) for over-production of heterologous proteins at high levels in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2013, 168(1): 32-39.
- [22] SHARP J, BECHHOFFER D. Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis* [J]. **Molecular Microbiology**, 2005, 57(2): 484-495.
- [23] HAMBRAEUS G, KARHUMAA K, RUTBERG B. A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis* aprE leader mRNA[J]. **Microbiology**, 2002, 148: 1795-1803.
- [24] VOSKULL M, VOEPEL K, CHAMBLISS G. The-16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*[J]. **Molecular Microbiology**, 1995, 17(2): 271-279.
- [25] KANG X, CAI X, HUANG Z, et al. Construction of a highly active secretory expression system in *Bacillus subtilis* of a recombinant amidase by promoter and signal peptide engineering[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 143: 833-841.
- [26] WIDNER B, THOMAS M, STERNBERG D, et al. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2000, 25(4): 204-212.
- [27] MENG F, ZHU X, NIE T, et al. Enhanced expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* by new strong promoters mined from transcriptome data, both alone and in combination[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2018, 9: 2635-2645.
- [28] PAN M, LI J, LV X, et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2019, 124: 54-62.
- [29] KRISHNAN B, SRIVASTAVA S, SANKESHI V, et al. β - γ -crystallin endows a novel bacterial glycoside hydrolase 64 with Ca^{2+} -dependent activity modulation[J]. **Journal of Bacteriology**, 2019, 201(23): 392-419.
- [30] WEI Y, LI Y, DENG C, et al. Expression and biochemical characterization of a multifunctional glycosidase from the thermophilic *Bacillus licheniformis* SR01[J]. **Journal of General & Applied Microbiology**, 2017, 63(5): 259-265.
- [31] ZHANG J, KANG Z, LING Z, et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements[J]. **Bioresource Technology**, 2013, 146: 543-548.
- [32] FU L, XU Z, LI W, et al. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion[J]. **Biotechnology Advances**, 2007, 25(1): 1-12.
- [33] AGAISSE H, LERECLUS D. STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability[J]. **Molecular Microbiology**, 1996, 20(3): 633-643.
- [34] ZCAN B, ZCAN N, BAYLAN M, et al. Cloning and expression of β -1,3-glucanase gene from *Cellulosimicrobium cellulosans* in *Escherichia coli* DH5 α [J]. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, 2013, 19(3): 523-528.
- [35] YI P, YAN Q, JIANG Z, et al. A first glycoside hydrolase family 50 endo- β -1,3-D-glucanase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Enzyme & Microbial Technology**, 2018, 108: 34-41.
- [36] ALVAREZ T, LIBERATO M, CAIROJ, et al. A novel member of GH16 family derived from sugarcane soil metagenome[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 177(2): 304-317.
- [37] DUAN F, LU X. Enzymatic properties and kinetics of an endo- β -1,3-glucanase of *Mitsuaria chitosanitabida* H12 and preparation of 1,3- β -D-glucooligosaccharides from yeast β -glucan[J]. **Annals of Microbiology**, 2012, 62(1): 307-312.