

绿色糖单孢菌麦芽糖 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达*

High Level Secretion Expression of Maltogenic α -amylase from *Saccharomonospora viridis* in *Bacillus subtilis*

柳梅梅^{1,2}, 谢敏^{1,2}, 杨燕芳^{1,2}, 刘滔滔^{1,2}, 杜丽琴^{1,2}, 梁智群^{1,2}, 韦宇拓^{1,2**}

LIU Meimei^{1,2}, XIE Min^{1,2}, YANG Yanfang^{1,2}, LIU Taotao^{1,2}, DU Liqin^{1,2}, LIANG Zhiquan^{1,2}, WEI Yutuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】构建高产麦芽糖 α -淀粉酶的工程菌株并实现高效分泌表达。【方法】PCR 扩增麦芽糖 α -淀粉酶基因 *sva*, 再与大肠杆菌-枯草芽孢杆菌麦芽糖诱导型穿梭载体 pHCMCO4-Pglv 连接, 构建重组质粒 pHCMCO4-Pglv-*sva* 并转入枯草芽孢杆菌进行表达, 对重组酶进行 SDS-PAGE 分析, 然后对重组菌株的生长及发酵条件进行优化。【结果】成功构建重组质粒 pHCMCO4-Pglv-*sva* 并在枯草芽孢杆菌中实现分泌表达, SDS-PAGE 分析发现, 在 55 kDa 处得到特异性蛋白条带。单因素试验结果显示, 重组菌的最适诱导温度为 35℃, 最适接种量为 4% (V/V), 最适装液量为 30 mL。正交实验结果显示, 重组菌的最佳发酵条件组合是诱导温度 37℃、接种量 5% (V/V)、装液量 25 mL, 在此条件下发酵液粗酶活力达到 257.3698 U/mL。装液量对重组菌的产酶量影响显著。【结论】成功构建能高效分泌表达麦芽糖 α -淀粉酶的枯草芽孢杆菌工程菌株, 经发酵条件优化后, 重组酶产量显著提高 10 倍左右。

关键词: 麦芽糖 α -淀粉酶 枯草芽孢杆菌 高效表达 优化

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0012-07

Abstract: 【Objective】 Engineering strains for high yield of maltose alpha amylase were constructed in order to implement efficient secretion expression. 【Methods】 The gene that had a length of 1 440 bp was amplified by PCR. The recombinant plasmid pHCMCO4-Pglv-*sva* was constructed and transformed into *Bacillus subtilis*. The recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE, and the growing conditions of recombinant strains were further optimized. 【Results】 The

recombinant strain pHCMCO4-Pglv-*sva* was successfully constructed and expressed in *Bacillus subtilis*. The molecular weight of the recombinant protein was approximately 55 kDa by SDS-PAGE analysis. Single factor optimization of fermentation conditions revealed that the recombinant strain had the optimal induction temperature at 35℃, the optimal inoculated quantity of 4% (V/V) and the optimal loading fluid amount of 30 mL. Orthogonal experiment results

收稿日期: 2015-11-16

修回日期: 2016-02-28

作者简介: 柳梅梅(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事基因工程菌的构建和酶工程研究。

* 国家自然科学基金项目(31160311)和广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053051)资助。

** 通讯作者: 韦宇拓(1971-), 男, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

showed that the optimum fermentation conditions were induction temperature at 37°C, quantity of 5%(V/V) and fluid volume 25 mL, under which the enzyme activity of recombinant maltose alpha amylase reached to 257.3698 U/mL. Among them, liquid loading quantity had significant effects on enzyme activity of maltose alpha amylase. **【Conclusion】**The recombinant plasmid pHCMCO4-Pglv-*sva* was successfully built and maltose alpha amylase was highly increased to ten times after optimizing fermentation condition.

Key words: maltose α -amylase, *Bacillus subtilis*, high efficient expression, optimization

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.008

0 引言

【研究意义】 α -淀粉酶不能切割 α -1,6 糖苷键,但可以跨越 α -1,6 糖苷键作用于分支链内部的 α -1,4 糖苷键,产生的水解产物一般为麦芽糖、少量葡萄糖以及一些寡糖^[1-2]。 α -淀粉酶广泛应用于食品加工、纺织和制药行业^[3-5]。麦芽糖 α -淀粉酶是指能水解淀粉得到主要产物为麦芽糖和少量葡萄糖的一类酶的总称,来源于绿色糖单孢菌的麦芽糖 α -淀粉酶水解淀粉的产物中麦芽糖含量可达 70%(文献[6]),在麦芽糖浆和麦芽糖的工业生产上具有一定的应用前景。

【前人研究进展】目前,应用大肠杆菌表达 α -淀粉酶已经非常成熟,但是也存在一定的不足,如自身代谢产生内毒素、容易形成包涵体、产物分离纯化工艺复杂等。而应用枯草芽孢杆菌作为表达宿主具有很多优势,例如枯草芽孢杆菌被 GRAS 认定为安全级别的微生物、无明显的密码子偏好性、因蛋白分泌系统功能完善而具有很好的分泌能力等^[7-8],因此,枯草芽孢杆菌被广泛应用于食品、医药、饲料 and 环境保护等领域^[9-12]。Kim 等^[13]将来源于枯草芽孢杆菌 SHU4-2 的麦芽糖 α -淀粉酶基因在 *Bacillus subtilis*168 中表达,研究发现当培养基中出现淀粉、麦芽糖或者 β -环糊精时,基因能够表达,而当存在葡萄糖、果糖或者蔗糖时,该基因不表达,说明该基因可能受到代谢产物的反馈抑制。2009 年訾楠等^[14]从地衣芽孢杆菌 ATCC14580 中克隆到一个麦芽糖 α -淀粉酶基因,并成功在大肠杆菌中诱导表达;2011 年转入枯草芽孢杆菌中表达,生成的麦芽糖 α -淀粉酶几乎全部分泌到培养基中,采用 HPLC 检测产物,结果表明该酶催化水解淀粉的主要产物为麦芽糖;对菌株的产酶条件进行优化后,最高酶活达到 5.9 U/mL。

【本研究切入点】目前研究的麦芽糖 α -淀粉酶大多是在大肠杆菌表达系统进行胞内表达,也有在枯草芽孢杆菌中进行分泌表达,但是表达量不高,同时,鉴于大肠杆菌表达系统存在的不足,因此有必要研究麦芽糖 α -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达。**【拟解决的关键问题】**克隆绿色糖单孢菌麦芽糖 α -淀粉酶基因 *sva*, 并构建重组质粒 pHCMCO4-Pglv-*sva*, 使

其在宿主 *B. subtilis* 1A857 中表达,并对其发酵条件进行优化,期望得到高产麦芽糖 α -淀粉酶的工程菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

营养缺陷型表达宿主枯草芽孢杆菌 1A857(培养时需添加必需氨基酸 leuA、metB 和 trpC)和 pHCMCO4 大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体均购自 BG-SC;大肠杆菌 Trans-10 为本实验室保存;pSE-*sva* 重组质粒和 pHCMCO4-Pglv 表达载体为本实验室构建并保存。

1.1.2 主要酶和试剂

PrimerSTAR^{HM} HS DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Sac* I 均购自 TaKaRa 公司;DNA 小量提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 纯化试剂盒等购自 BioFlux 博日公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(W/V):胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,氯化钠 1%;枯草芽孢杆菌 1A857 生长培养基和发酵培养基:葡萄糖 1.5%(W/V),蛋白胨 15 g/L,酵母抽提物 25 g/L,氯化钠 10 g/L,(NH₄)₂SO₄ 20 g/L,另外再添加 3 种必需氨基酸 leuA、metB、trpC,终浓度均为 0.5%(W/V)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增及重组质粒的构建

设计一对引物扩增 pHCMCO4-Pglv 表达载体,上游引物与下游引物各自含有与目的基因重叠的 21 个碱基(下划线部分),即

Plvse-up: CACGTCGGCGCTCGCGTATGAA-TATTACTTAGAGGATACTATTGAGA;

Plvse-down: GTCGCGTTCCCGGGTGGT-GCTGCCCGCTGCTGCAGAAT。

设计一对引物扩增麦芽糖 α -淀粉酶基因 *sva*, 即 Sva-up:GCACCACCCGGCGAACGCGA;

Sva-down:TCATACGCGAGCGCCGACGTG。

以 pHCMCO4-Pglv 表达载体为模板,PCR 扩增

体系: 5×PrimeSTAR buffer 10 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, Plvse-up 1 μL, Plvse-down 1 μL, template 1 μL, PrimeSTAR DNA Polymerase 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。载体 PCR 退火温度和延伸时间分别为 68℃, 7 min。以 pSE-*sva* 重组质粒为模板, 采用两步法 PCR 扩增目的基因, PCR 体系: 5×PrimeSTAR buffer 10 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, Sva-up 1 μL, Sva-down 1 μL, template 1 μL, PrimeSTAR DNA Polymerase 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。退火和延伸同时进行, 温度为 68℃, 时间为 2 min。各取 2.5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 验证 PCR 成功后用胶回收试剂盒回收目的条带, 并用琼脂糖凝胶电泳分析验证回收目的片段的纯度。

采用 Clontech 公司的 In-fusion HD cloning kit 融合连接两个目的片段, 10 μL 连接体系: 5×In-fusion Enzyme Premix 2 μL, 穿梭载体 pHCMCO4-Pglv 线性载体 5 μL, *sva* 3 μL。将体系混匀置 37℃ 恒温水浴 15 min, 然后立即于 50℃ 水浴 15 min, 冰上冷却后转化 2.5 μL 大肠杆菌 Trans-10 感受态细胞。取 200 μL 转化产物涂布于带有 Amp 抗性的 LB 平板上, 再置于 37℃ 恒温培养箱倒置培养过夜。挑取单菌落提质粒进行 Sac I 单酶切验证正确后送测序。

1.2.2 重组酶的表达及 SDS-PAGE 分析

将重组质粒 pHCMCO4-Pglv-*sva* 转化枯草芽孢杆菌 IA857 进行表达, 并以空质粒 pHCMCO4-Pglv 作为对照, 分别以 1% (V/V) 的接种量转接于 100 mL 的 LB 培养基中 (含有 17 μg/mL 的氯霉素 Cm), 37℃, 220 r/min 摇床振荡培养, 培养 6 h 后加入 1.5% (W/V) 麦芽糖诱导表达, 从接种后开始每隔 12 h 取样, 并用 DNS^[15] 测定发酵液粗酶的酶活力。取麦芽糖诱导 24 h 的发酵液 1 mL 通过真空浓缩机浓缩至 50 μL 左右, 与上样缓冲液按照 1:1 (V/V) 混合处理后进行 10% (W/V) SDS-PAGE 分析。

麦芽糖 α-淀粉酶活力定义: 在最适条件下, 每分钟生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活单位 (1 U)。酶活力的计算公式为

$$\text{酶活力单位(U/mL)} = \frac{G \times 10^3 \times n}{198.17 \times 10 \times 0.01}$$

其中, G 为葡萄糖含量 (mg/mL); n 为稀释倍数 (mg/mL); 198.17 为葡萄糖分子量; 10 为反应时间 (min); 0.01 为酶液体积 (mL)。

1.2.3 重组菌株培养条件的优化

1.2.3.1 最适葡萄糖浓度

首先挑取单菌落转接于 5 mL 左右的 LB 培养基

中过夜培养活化菌种, 于 500 mL 三角瓶中加入 30 mL 葡萄糖浓度 (W/V) 分别为 0.5%, 1.0%, 1.5% 的发酵培养基 (加入 Cm 终浓度为 50 μg/mL), 同时加入 3% (V/V) 过夜培养的菌种, 培养至菌体 OD_{600} 值约为 0.6 时加入 1.5% (W/V) 麦芽糖诱导表达。每间隔 6 h 分别取样, 在波长 $\lambda = 600$ nm 下, 将菌液适当稀释后, 测定其 OD_{600} 值, 同时取发酵液测定胞外粗酶活。从含有 1.5% (W/V) 的葡萄糖这一组发酵液中取样, 通过真空浓缩机浓缩至 50 μL 左右, 与上样缓冲液按照 1:1 (V/V) 混合处理后进行 10% (W/V) SDS-PAGE 分析。

1.2.3.2 最适氯霉素浓度

将重组菌株过夜活化后以 3% (V/V) 的接种量转接入到含有氯霉素浓度分别为 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL 的发酵培养基中, 培养 6 h 至菌体 OD_{600} 值约为 0.6 时加入 1.5% (W/V) 麦芽糖, 在 35℃, 200 r/min 恒温摇床进行诱导表达, 收集菌液测定不同氯霉素浓度浓度下菌体的 OD_{600} 值, 并收集发酵液用 DNS 法测定粗酶的酶活力。

1.2.4 重组菌株发酵条件优化

1.2.4.1 单因素试验

(1) 诱导温度: 将重组菌株过夜活化后以接种量为 3% (V/V) 接入到发酵培养基 (Cm 终浓度为 200 μg/mL) 中, 培养 6 h 菌体 OD_{600} 值约为 0.6 时加入 1.5% 麦芽糖诱导表达, 分别放置 25℃, 30℃, 35℃, 40℃ 恒温培养箱进行诱导表达, 培养 66 h 后用 DNS 法测定粗酶活力。

(2) 接种量: 将重组菌株过夜活化后以 1%, 2%, 4%, 8% 的接种量 (V/V) 接入到含有 200 μg/mL 氯霉素的发酵培养基中, 培养 6 h 菌体 OD_{600} 值约为 0.6 时加入 1.5% 麦芽糖在最适温度条件下恒温诱导表达, 培养 66 h 后收集发酵液用 DNS 法测定粗酶活力。

(3) 装液量: 将重组菌株过夜活化后以最适接种量转接于分别含有 30 mL、50 mL、70 mL、90 mL 发酵培养基 (Cm 终浓度为 200 μg/mL) 的 500 mL 三角瓶中, 培养 6 h 菌体 OD_{600} 值约为 0.6 时, 加入 1.5% 麦芽糖在最适温度条件下恒温诱导表达, 培养 66 h 后收集发酵液用 DNS 法测定粗酶活力。

1.2.4.2 正交试验

在单因素试验的基础上, 选择诱导温度、接种量和装液量进行 $L_9(3^4)$ 的正交实验, 每组设计 3 个平行然后取平均值, 按照表 1 进行试验, 从而确定最优的发酵条件。

表 1 正交试验设计

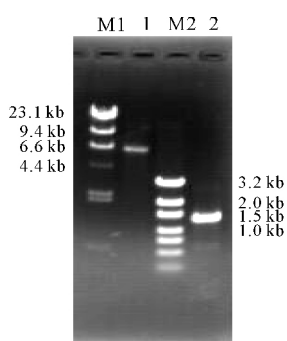
Table 1 The design of orthogonal test

因素 Factor	水平 Level		
	1	2	3
装液量 Liquid volume(A, mL)	25	30	35
接种量 Inoculum size(B, %)	3	4	5
诱导温度 Induction temperature(C, °C)	33	35	37
误差 Error(E)	—	—	—

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增和重组质粒的构建

如图 1 所示, PCR 扩增得到大小约为 1.4 kb 和 6.4 kb 的两个 DNA 片段, 这与预期目的基因的大小一致。

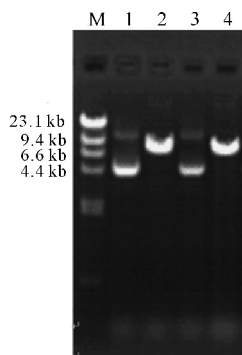


M1: λ DNA/*Hind* III DNA Maker; 1: PCR product of pHCMCO4-Pglv; M2: W2003 DNA Marker; 2: PCR product of *sva*

图 1 PCR 产物分析

Fig. 1 Digestion of PCR products

如图 2 所示, 重组质粒经 *Sac* I 单酶切后得到一条约为 7.8 kb 的条带, 与预期的大小一致, 说明目的片段已经连接到载体 pHCMCO4-Pglv 上, 重组质粒 pHCMCO4-Pglv-*sva* 构建成功。



M: λ DNA/*Hind* III DNA Marker; 1, 3: pHCMCO4-Pglv-*sva* recombinant plasmid; 2, 4: pHCMCO4-Pglv-*sva* recombinant plasmid digested with *Sac* I

图 2 重组质粒酶切分析

Fig. 2 Digestion of the recombinant plasmids

2.2 重组酶活力的测定和 SDS-PAGE 分析

如图 3 所示, 重组菌株在 LB 培养基中的酶活力

随着培养时间的延长呈现先上升后下降的趋势, 在培养 120 h 时达到最高酶活力, 约为 24 U/mL。SDS-PAGE 分析发现, 在 55 kDa 处出现一条蛋白条带, 与预期目标蛋白大小相符(图 4), 推断为绿色糖单孢菌麦芽糖 α -淀粉酶。

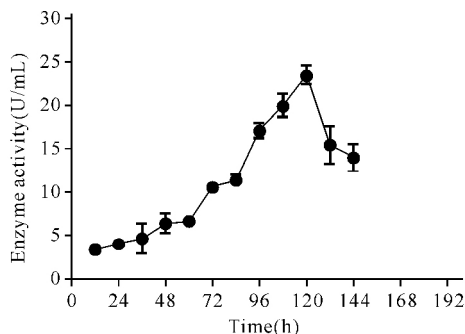
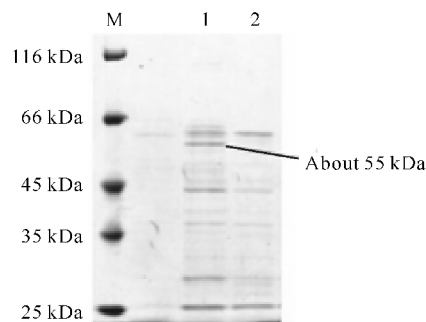


图 3 培养时间对重组酶活力的影响

Fig. 3 Effect of culture time on recombinant enzyme activity



M: Protein marker; 1: Total soluble proteins of *B. subtilis* 1A857 containing plasmid pHCMCO4-Pglv-*sva*; 2: Total soluble proteins of *B. subtilis* 1A857 containing plasmid pHCMCO4-Pglv

图 4 重组酶的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme

2.3 重组菌株培养条件的优化

2.3.1 最适葡萄糖浓度

根据相关文献, 添加一定浓度的葡萄糖有助于营养缺陷型枯草芽孢杆菌的生长, 但是葡萄糖浓度过高会产生代谢物反馈抑制。由图 5 和图 6 可知, 当葡萄糖浓度为 1.5% (W/V) 时, 菌体 OD_{600} 值最大, 约为 27, 酶活力也最高, 达 100 U/mL, 均明显高于葡萄糖浓度为 0.5% 和 1.0% (W/V) 时的菌体 OD_{600} 值和粗酶活力。说明 1.5% (W/V) 的葡萄糖浓度对重组菌产酶量的抑制作用还不是很明显, 主要是作为碳源供菌体生长。此外, SDS-PAGE 分析发现, 在 55 kDa 左右出现明显的蛋白条带, 与核酸序列理论推算的蛋白质分子量相符(图 7)。

2.3.2 最适氯霉素浓度

如图 8 所示, 重组酶活力和菌体生长量均随着氯

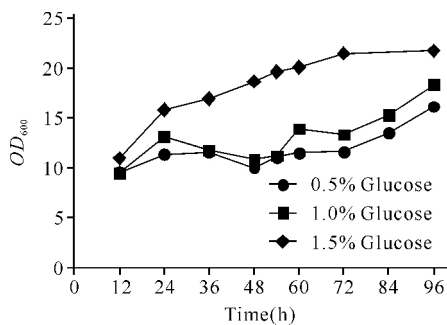


图 5 葡萄糖浓度对菌体生长的影响

Fig. 5 Effect of glucose concentrations on growth of cell

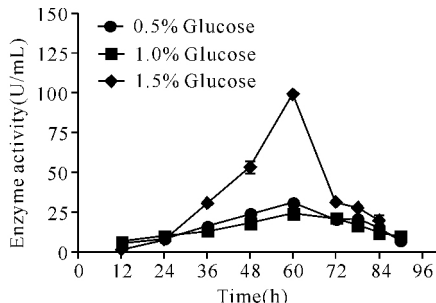
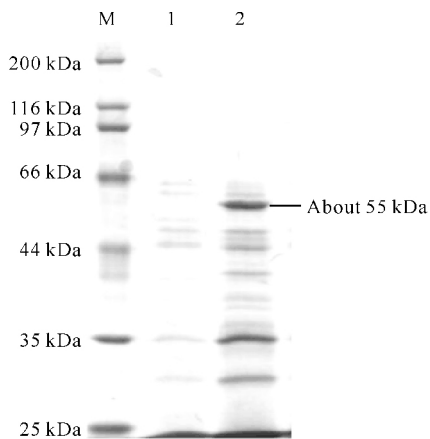


图 6 葡萄糖浓度对重组酶活力的影响

Fig. 6 Effect of glucose concentrations on recombinant enzyme activity



M: Protein marker; 1: Total soluble proteins of *B. subtilis* 1A857 containing plasmid pHCMCO4-Pglv-sva; 2: Total soluble proteins of *B. subtilis* 1A857 containing plasmid pHCMCO4-Pglv

图 7 重组酶的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme
 霉素浓度的增加呈现先上升后下降的趋势,当氯霉素浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,最高酶活力达到 272 U/mL;重组菌在氯霉素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时生长最快。

2.4 重组菌株发酵条件优化

2.4.1 单因素试验

如图 9 所示,重组菌的最适诱导温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,此时酶活力最高可以达到 224 U/mL。当接种量为 4% 时酶活力最高,为 265 U/mL,当接种量过大时,营养

物质消耗快,后期产酶的积累减少,接种量较少时,菌体积累量不够,也影响产酶量的积累。装液量间接反映溶氧量对菌株产酶量的影响,试验结果表明,当装液量为 30 mL 时,培养 66 h 可以达到最高酶活力 257 U/mL,说明重组菌对氧气的需求量很大。

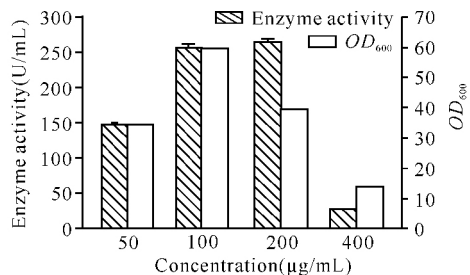


图 8 不同氯霉素浓度下重组酶酶活力和菌体 OD₆₀₀

Fig. 8 The recombinant enzyme activity and OD₆₀₀ in different chloride concentration

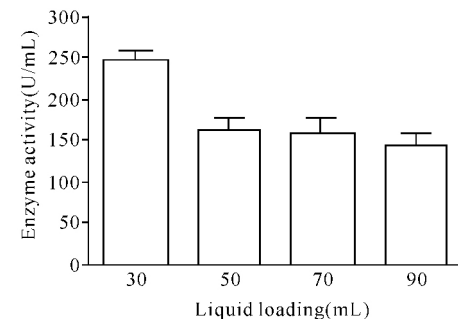
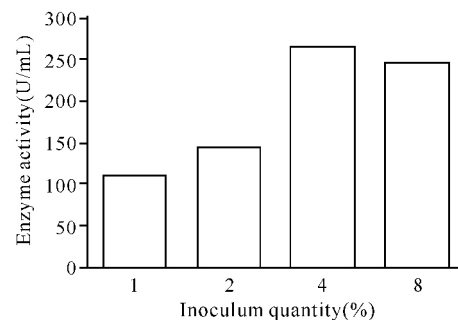
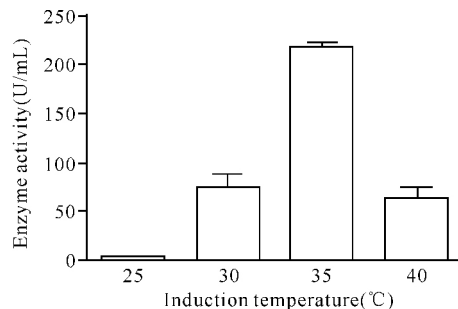


图 9 单因素试验结果

Fig. 9 Result of single factor experiment

2.4.2 正交试验

根据正交试验数据可以看出,最佳的发酵条件组合为 A₁B₃C₃,即最佳的发酵条件为装液量 25 mL、接种量 5%、诱导温度 37 $^{\circ}\text{C}$,在此条件下,发酵液粗酶活力达到 257.3698 U/mL(表 2)。方差分析结果显示,

$S_A > S_B > S_C$, 说明 3 个因素中对酶活力影响顺序为装液量 > 接种量 > 诱导温度; 因为 $F_A > F_{0.9(2,8)} = 3.110 > F_B > F_C$, 所以装液量对重组菌的产酶量有显著影响, 而接种量和诱导温度对产酶量的影响不显著(表 3)。

表 2 正交试验结果分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

实验号 Test number	A	B	C	E	酶活力 Enzyme activity(U/mL)
1	1	1	1	1	189.325
2	1	2	2	2	215.939
3	1	3	3	3	257.370
4	2	1	2	3	184.386
5	2	2	3	1	194.708
6	2	3	1	2	204.115
7	3	1	3	2	107.605
8	3	2	1	3	118.551
9	3	3	2	1	121.765
K1	220.878	160.421	170.677	168.599	
K2	194.416	176.399	174.030	175.881	
K3	115.956	194.430	186.543	186.769	
R	104.922	34.009	15.866	18.170	

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素 Factor	偏差平方和 Quadratic sum	自由度 Variance	F 比 F - ratio	F 临界值 F - critical value	显著性 Obviousness
A	17864.928	2	3.482	3.110	*
B	1737.013	2	0.339	3.110	
C	419.546	2	0.082	3.110	
E	501.723	2	0.098	3.110	
总和 Sum	20523.21	8			

注: * 表示影响显著

Note: * means significant influence

3 讨论

麦芽糖 α -淀粉酶有来源于细菌和真菌, 细菌来源的麦芽糖 α -淀粉酶基因主要有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、嗜热放线菌 (*Thermus vulgaris*) 等^[16-17]。而真菌麦芽糖 α -淀粉酶几乎来源于丝状真菌中的曲霉属微生物, 例如黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。而本研究中麦芽糖 α -淀粉酶来源于绿色糖单孢菌, 属于细菌, 它作用于 20% 淀粉后生成的主要产物为麦芽糖、麦芽三糖和少量葡萄糖, 其中麦芽糖的含量可以达到 67.15%。

广西科学 2016 年 2 月 第 23 卷第 1 期

大肠杆菌因自身产生内毒素, 从而限制了其在食品方面的应用。目前商业化的大肠杆菌表达系统主要用 IPTG 进行诱导表达, 而 IPTG 不仅价格昂贵而且有毒, 基于安全考虑, 这也限制其在医疗和食品方面的重组蛋白表达的应用。另外因为大肠杆菌自身问题, 在表达异源蛋白时很容易形成包涵体, 从而使得可溶性蛋白表达量减少。

相较于大肠杆菌表达宿主, 枯草芽孢杆菌因自身不产生内毒素而没有致病性, 也没有明显的密码子偏好性, 而且还具有很好的分泌能力^[18], 能够将蛋白质直接分泌到胞外, 避免了包涵体的形成, 因此被认为是表达外源蛋白的理想宿主。根据文献^[6]报道, *sva* 在大肠杆菌宿主中表达的最高酶活力为 168.699 U/mL, 本研究在枯草芽孢杆菌中实现 *sva* 的高效分泌表达, 胞外粗酶活力为 257 U/mL。外源蛋白在枯草芽孢杆菌内表达量仍然不高, 主要是因为: (1) 枯草芽孢杆菌自身在对数生长期分泌表达大量的蛋白酶, 能够将目的蛋白降解; (2) 质粒的分化和结构不稳定; (3) 信号肽的适配性选择。因此, 目前研究热点一方面是寻找一个强启动子, 包括诱导型的蔗糖启动子, 木糖启动子, 淀粉启动子以及组成型启动子 P43; 另外一方面是得到与目的基因高度适配的信号肽^[19]。

4 结论

本研究利用 PCR 技术成功克隆到目的基因 *sva*, 连接到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pHC-MCO4-Pglv, 成功构建 pHCMCO4-Pglv-*sva*, 以 *B. subtilis* 1A857 为表达宿主实现分泌表达, 并且通过菌体生长条件和发酵条件优化后, 确定最佳的发酵条件为诱导温度 37℃、接种量 5%、装液量 25 mL, 在此条件下获得的胞外粗酶最高酶活力达到 257 U/mL。

参考文献:

- [1] TONKOVA A. Bacterial cyclodextrin glucoamylase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(8): 678-686.
- [2] MALHOTRA R, NOORWEZ S, SATYANARAYANA T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 31(5): 378-384.
- [3] MURAKAMI S, NISHIMOTO H, TOYAMA Y, et al. Purification and characterization of two alkaline, thermo-tolerant α -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007,

- 71(10):2393-2401.
- [4] STEIN T, HEINZMANN S, DÜSTERHUS S, et al. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spaIFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3):822-828.
- [5] BONGERS R S, VEENING J W, VAN WIERINGEN M, et al. Development and characterization of a subtilin-regulated expression system in *Bacillus subtilis*: Strict control of gene expression by addition of subtilin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12):8818-8824.
- [6] 汪小波, 李芙蓉, 李雪, 等. 绿色糖单孢菌高产麦芽糖 α -淀粉酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(2):342-345.
- WANG X B, LI M R, LI X, et al. Gene cloning, expression and enzymatic characterization of a high maltose-producing α -amylase from *Saccharomonospora viridis* [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2013, 19(2):342-345.
- [7] OLEMPKA-BEER Z S, MERKER R I, DITTO M D, et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—A review [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 45(2):144-158.
- [8] TOSATO V, BRUSCHI C. Knowledge of the *Bacillus subtilis* genome: Impacts on fundamental science and biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(1):1-6.
- [9] 刘国红, 林营志, 林乃铨, 等. 芽孢杆菌分类研究进展[J]. 福建农业学报, 2011, 26(5):911-917.
- LIU G H, LIN Y Z, LIN N Q, et al. Study on genus *Bacillus* classification[J]. Fujian Journal of Agriculture Sciences, 2011, 26(5):911-917.
- [10] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1):1-17.
- [11] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9):111-114.
- LI M, SHUANG B, LI H T, et al. Progress and application of *Bacillus subtilis* in different fields[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(9):111-114.
- [12] 王艳娜, 张梁, 丁重阳, 等. 不同启动子调控羧基还原酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达水平[J]. 生物加工过程, 2013, 11(3):46-51.
- WANG Y N, ZHANG L, DING C Y, et al. Expression of carbonyl reductase in *Bacillus subtilis* with different promoters[J]. 生物加工过程, 2013, 11(3):46-51.
- [13] KIM D Y, CHA C H, OH W S, et al. Expression of the promoter for the maltogenic amylase gene in *Bacillus subtilis* 168 [J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2004, 42(4):319-327.
- [14] 管楠, 沈微, 石贵阳, 等. 地衣芽孢杆菌生麦芽糖 α -淀粉酶的基因克隆与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(1):130-133.
- ZI N, SHEN W, SHI G Y, et al. Gene cloning and characterization of *Bacillus licheniformis* maltogenic α -amylase[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2009, 15(1):130-133.
- [15] 巩莉, 华颖, 刘大群, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定番茄废渣中糖分含量的研究[J]. 保鲜与加工, 2014, 14(3):37-42.
- GONG L, HUA Y, LIU D Q, et al. Study on determination of sugar content from tomato residue with 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry[J]. Storage and Process, 2014, 14(3):37-42.
- [16] CHO H Y, KIM Y W, KIM T J, et al. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1478(2):333-340.
- [17] KIM Y W, CHOI J H, KIM J W, et al. Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8):4866-4874.
- [18] POHL S, HARWOOD C R. Heterologous protein secretion by *Bacillus* species: From the cradle to the grave[J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 73:1-25.
- [19] KIM J H, HWANG B Y, ROH J, et al. Comparison of *Papr E*, *Pamy E*, and *PP43* promoter strength for β -galactosidase and staphylokinase expression in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2008, 13(3):313-318.

(责任编辑:陆雁)