

陈龙军, 林陈强, 贾宪波, 等. 信号肽筛选优化提高耐热 α -环糊精酶在枯草芽胞杆菌中的表达 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (3): 414-422.
CHEN L J, LIN C Q, JIA X B, et al. Enhanced Thermophilic α -Cyclodextrin Glycosyltransferase Expression by Optimizing Target Signal Peptide in *Bacillus subtilis* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (3): 414-422.

信号肽筛选优化提高耐热 α -环糊精酶在枯草芽胞杆菌中的表达

陈龙军, 林陈强, 贾宪波, 方 宇, 张 慧, 陈济琛*

(福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003)

摘要:【目的】探索嗜热 α -环糊精葡萄糖基转移酶 (α -CGTase) 在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis* RIK1285) 中的高效胞外表达条件。【方法】以来源于枯草芽胞杆菌的 173 种信号肽为基础构建信号肽文库, 筛选获得 9 条表达效率更高的信号肽, 其中 *citH* 信号肽引导分泌效率最高。在此基础上, 为进一步优化 α -CGTase 的分泌表达, 对信号肽 *citH* 的 Gly2、Asn3 及 Thr4 进行饱和突变, 并比较不同突变体的引导分泌效率。【结果】突变体 G2R-N3K-T4L-CGT 的引导分泌效率最高, 重组枯草芽胞杆菌的胞外 α -CGTase 活力高达 $(14.2 \pm 0.11) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相比未突变信号肽 $[(9.6 \pm 0.29) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 分泌效率提高了 47.9%; 是野生菌株嗜热地芽胞杆菌 *Geobacillus caldxylosilyticus*.CHB1 ($0.66 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 21.5 倍。重组 α -CGTase 的最适反应 pH 值为 6.0, 最适反应温度为 60°C , 在 50°C 以内稳定; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 α -环糊精酶活性具有一定的激活作用。【结论】信号肽对环糊精酶在芽胞杆菌中的高效表达具有重要影响, 为外源蛋白在芽胞杆菌中的表达提供一定借鉴。

关键词: 信号肽; α -环糊精葡萄糖基转移酶; 饱和突变; 枯草芽胞杆菌

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 03-0414-09

Enhanced Thermophilic α -Cyclodextrin Glycosyltransferase Expression by Optimizing Target Signal Peptide in *Bacillus subtilis*

CHEN Longjun, LIN Chenqiang, JIA Xianbo, FANG Yu, ZHANG Hui, CHEN Jichen*

(Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: 【Objective】Conditions to achieve high-efficiency secretory expression of the thermophilic α -cyclodextrin glucosyltransferase (α -CGTase) in *Bacillus subtilis* RIK1285 were explored to understand the role played by signal peptide.

【Method】A library based on 173 signal peptides from *B. subtilis* was constructed to identify the highest secretion efficiency candidate. Using the saturation mutagenesis of segments in the selected signal peptide, the secretion expression of α -CGTase was enhanced. 【Result】There were 9 signal peptides with high expression efficiency identified from the library. Among them, the signal peptide *citH* showed the highest secretion efficiency. Subsequently, the saturation mutagenesis of Gly2, Asn3, and Thr4 of *citH* produced a mutant, G2R-N3K-T4L-CGT, with an extracellular activity of α -CGTase as high as $14.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and a secretion efficiency increased by 47.9% over the non-mutated signal peptide ($9.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), which was 21.5 times higher than that of the wild-type *Geobacillus caldxylosilyticus* CHB1 ($0.66 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). The purified α -CGTase had a maximal activity at pH 6.0 and 60°C , was thermally stable within 50°C , and could be activated by Mg^{2+} and Ca^{2+} . 【Conclusion】The important effect signal peptide had on the high-efficiency expression of cyclodextrinase in *B. subtilis* was verified. The result provided a new and valuable reference for studies on the expression of extraneous proteins in the bacteria.

Key words: Signal peptide; α -cyclodextrin glycosyltransferase; saturation mutagenesis; *Bacillus subtilis*

收稿日期: 2021-08-26 初稿; 2021-10-27 修改稿

作者简介: 陈龙军 (1983-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物化工、酶工程及发酵工程等方面的研究 (E-mail: monkeyrene@163.com)

* 通信作者: 陈济琛 (1964-), 男, 研究员, 主要从事微生物菌剂研究 (E-mail: chenjichen2001@163.com)

基金项目: 福建省农业科学院对外合作项目 (DWHZ2021-17); 福建省科技计划公益类专项 (2022R1022-5、2018R1022-7); 福建省农业科学院探索创新项目 (AA2018-13);

0 引言

【研究意义】环糊精是由6个以上葡萄糖通过 α -1,4-糖苷键连结形成的环状低分子寡聚糖，根据组成的葡萄糖单体个数的不同（6~8个），分别称为 α -、 β -、 γ -环糊精^[1-2]。由于环糊精分子具有特殊的外表亲水、内里疏水的中空圆筒结构，能与许多客体分子形成包络物，进而改变客体分子的溶解度、稳定性等物理化学性质，因此在农药、食品、医药、化妆品和环保等领域具有广泛的应用^[3-5]。通常环糊精是由环糊精葡萄糖基转移酶（EC 2.4.1.19，简称CGTase）通过催化淀粉等底物的环化而形成。环糊精酶属于 α -淀粉酶家族，催化产生 α -、 β -、 γ -环糊精的混合物，根据主要产物的不同，可分为 α -、 β -、 γ -环糊精酶。另外环糊精酶除了催化环化反应外，还能催化耦合、水解、歧化等反应，是一种多功能复合酶^[6-8]。鉴于环糊精的巨大应用价值，生产环糊精所必需的环糊精酶逐渐成为当今研究的热点。【前人研究进展】传统环糊精酶主要通过天然菌株的发酵获取，但由于天然菌株本身不稳定、产量低、发酵产物复杂不利于分离等困难，导致环糊精酶生产成本居高不下，进一步限制了环糊精的规模化应用。为了提高环糊精酶的产量，降低其生产成本，通过基因工程和蛋白质工程等技术，实现环糊精酶的异源高效表达，构建适用于工业化生产的菌株被认为是最有效的途径之一。枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）作为传统的工业生产菌株，遗传背景清晰，无明显密码子偏好性，分泌能力强，易于培养，基因操作简单，发酵工艺成熟，被认为是理想的外源蛋白质的分泌表达宿主菌^[9-10]。张佳瑜等^[11]将来源于软化芽胞杆菌的 α -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中进行表达，发酵优化后 α -环糊精酶活力达到 $4.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，表达量是野生软化芽胞杆菌表达量的9.8倍。外源蛋白质在枯草芽胞杆菌中的分泌表达依赖于信号肽的引导，主要有两个途径：Sec途径和Tat途径。对于同一种外源蛋白质，不同信号肽的引导分泌效率相差较大，两者之间存在适配性^[12]。枯草芽胞杆菌信号肽由N端正电荷区（1~5个带正电氨基酸）、H段疏水区（7~15疏水性氨基酸）及C端信号肽酶识别区（3~7个亲水性氨基酸）组成。研究表明信号肽N端正电荷数、H端疏水性会影响目的蛋白在枯草芽胞杆菌中的分泌途径（Sec、Tat途径），从而影响目的蛋白的分泌效率。因此针对特定的蛋白质需要选择合适的信号肽，优化信号肽N端正电荷数对外源蛋白高效表达具有重要影响。

【本研究切入点】目前大多数研究集中在通过菌株发酵条件优化、菌种诱变选育和不同外源表达系统来提高外源蛋白表达效率^[13-14]，有关信号肽及信号肽序列优化来提高外源蛋白表达仍鲜见报道。【拟解决的关键问题】本实验室在前期工作中从*Geobacillus caldoxylosilyticus*.CHB1中分离获得一个新型 α -环糊精酶，其最适反应温度达到 60°C ，具有较好的热稳定性。该环糊精酶已在*E. coli*、芽胞杆菌及毕赤酵母中实现了克隆表达^[15-17]。为了探索 α -环糊精酶在枯草芽胞杆菌中的高效表达条件，本研究以来源于芽胞杆菌的173种信号肽为文库，筛选适合于 α -环糊精酶高效表达的信号肽。在此基础上，对筛选获得的信号肽N端氨基酸进行突变，通过优化信号肽N端正电荷数，进一步实现 α -环糊精酶在枯草芽胞杆菌中的高效分泌表达。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种和质粒 枯草芽胞杆菌环糊精酶表达载体pBE-aprE-CGT及重组*Bacillus subtilis* RIK1285 / pBE-aprE-CGT由本实验室构建保存；*Bacillus subtilis* Secretory Protein Expression System（SP DNA mixture 173种分泌信号肽文库）、the In-Fusion HD Cloning System及*E. coli* HST08 Premium Competent Cells购自大连宝生物工程（TaKaRa）有限公司。

1.1.2 试剂与仪器 限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、DNA Mark、Protein Mark、T4 DNA连接酶、DNA切胶回收试剂盒和质粒快速提取试剂盒（TaKaRa公司）；PCR引物合成、测序等由上海生物工程股份有限公司完成，其余试剂均为国产或进口分析纯。3-18K超高速冷冻离心机（Sigma公司），PCR仪（基因有限公司），Micro Pulser电穿孔仪（美国Bio-Rad公司），Multiskan FC酶标仪（美国Thermo公司）。

1.1.3 培养基 LB培养基（种子培养基）：胰蛋白胨1%，酵母粉0.5%，NaCl 1%，Amp终质量浓度 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。TB（发酵培养基）：甘油0.5%，蛋白胨1.2%，酵母粉2.4%， K_2HPO_4 1.64%， KH_2PO_4 0.23%。

1.2 试验方法

1.2.1 基因克隆和聚丙烯酰胺凝胶电泳 常规的分子克隆技术及蛋白表达产物的SDS-PAGE分析参考文献[16]。

1.2.2 环糊精酶信号肽表达载体文库的构建 以环糊精酶表达载体pBE-aprE-CGT为模板，在信号肽aprE上下游分别设计反向引物（M1:5'-CGCGTCCC

TCTCCTT TTGCTTAAGT TCAGAGTAG-3'; E1: 5'-GGCCGGTGCACATATGGAGCTCGGTACCCTCG AG-3'), 采用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 对该表达载体进行线性化扩增。PCR 反应条件: 98 ℃ 10 s, 62 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s; 循环 30 次; 72 ℃ 10 min。扩增产物用切胶回收试剂盒进行线性载体 pBE-CGT 长片段回收, 备用。

将线性载体 pBE-CGT 与 SP DNA mixture 按比例混合, 用 5X In-Fusion HD Enzyme Premix 进行同源重组, 重组产物转化受态细胞 *E.coli* HST08, 经 100 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素抗性 LB 平板过夜培养, 收集克隆子进行混合培养, 提取混合质粒, 构建环糊精酶信号肽表达载体库 pBE-SP-CGT。

1.2.3 重组枯草芽胞杆菌的构建 采用电转化方法, 冰浴融化感受态细胞 *Bacillus subtilis* RIK1285 取 100 μL 与 3 μL 重组质粒 pBE-SP-CGT 混匀, 设置电转化参数 (电击参数 1500 V、25 μF、200 Ω), 将 pBE-SP-CGT 载体导入感受态 *Bacillus subtilis* RIK1285 中, 于 10 μg·mL⁻¹ 卡那霉素抗性 LB 平板培养至转化子出现 (24~48 h), 获得重组 *Bacillus subtilis* RIK1285/pBE-SP-CGT。

1.2.4 重组枯草芽胞杆菌的筛选表达与信号肽鉴定 种子液培养: 挑取重组枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 单克隆于 LB 培养基生长 18 h; 发酵培养: 按 1% 接种量将种子发酵液接种至 50 mL 发酵培养基, 在 37 ℃ 摇床培养 24 h, 进行诱导表达, 于 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 除菌体, 收集上清液和菌体, 测定 α-环糊精酶活性。以重组 *Bacillus subtilis* RIK1285 / pBE-*aprE*-CGT 为对照, 筛选 α-环糊精酶活性高于对照的重组克隆子, 提取该克隆子质粒, 送上海生工生物工程有限公司进行测序, 鉴定相应信号肽序列。

1.2.5 信号肽定点饱和突变 以筛选获得表达效果最好的信号肽表达载体 (pBE-citH-CGT) 为模板, 采用 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, 结合信号肽 citH 信号肽碱基序列及拟突变氨基酸位点设计 19 种氨基酸突变引物, 如表 1 (Gly2, 带下划线碱基序列为突变的氨基酸碱基密码子) 所示。以表 1 引物进行 PCR 扩增 (95 ℃ 2 min; 95 ℃ 20 s, 60 ℃ 10 s, 68 ℃ 4 min, 20 个循环; 68 ℃ 5 min), 获得包含突变信号肽的线性表达载体片段。该片段经 *Dpn* I 酶处理后, 转化大肠杆菌 DH5α, 于含 100 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素抗性 LB 平板过夜培养, 筛选转化子测序鉴定突变结果, 完成突变的 19 个信号肽突变表达载体转化枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* RIK1285 进行环糊精酶表达, 测定各

表 1 citH 信号肽第二位 Gly 饱和突变引物
Table 1 Primers for saturated mutation of G2

突变体 Mutants	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
G2F	G2F-F	AGAGGGACGCGTATGTTCAATACTCGTAAAAAAG
	G2F-R	CTTTTTTACGAGTATTGAACATACGCGTCCCTCT
G2M	G2M-F	AGAGGGACGCGTATGATGAATACTCGTAAAAAAG
	G2M-R	CTTTTTTACGAGTATTCAACATACGCGTCCCTCT
G2P	G2P-F	AGAGGGACGCGTATGCCGAATACTCGTAAAAAAG
	G2P-R	CTTTTTTACGAGTATTCGGCATAACGCGTCCCTCT
G2A	G2A-F	AGAGGGACGCGTATGGCAAATACTCGTAAAAAAG
	G2A-R	CTTTTTTACGAGTATTGCCATACGCGTCCCTCT
G2Y	G2Y-F	AGAGGGACGCGTATGTATAATACTCGTAAAAAAG
	G2Y-R	CTTTTTTACGAGTATTATACATACGCGTCCCTCT
G2H	G2H-F	AGAGGGACGCGTATGCATAATACTCGTAAAAAAG
	G2H-R	CTTTTTTACGAGTATTATGCATACGCGTCCCTCT
G2K	G2K-F	AGAGGGACGCGTATGAGAATACTCGTAAAAAAG
	G2K-R	CTTTTTTACGAGTATTCTTCATACGCGTCCCTCT
G2D	G2D-F	AGAGGGACGCGTATGGATAATACTCGTAAAAAAG
	G2D-R	CTTTTTTACGAGTATTATCCATACGCGTCCCTCT
G2C	G2C-F	AGAGGGACGCGTATGTGCAATACTCGTAAAAAAG
	G2C-R	CTTTTTTACGAGTATTGACATACGCGTCCCTCT
G2Q	G2Q-F	AGAGGGACGCGTATGCAGAATACTCGTAAAAAAG
	G2Q-R	CTTTTTTACGAGTATTCTGCATACGCGTCCCTCT
G2L	G2L-F	AGAGGGACGCGTATGCTAAATACTCGTAAAAAAG
	G2L-R	CTTTTTTACGAGTATTAGCATACGCGTCCCTCT
G2I	G2I-F	AGAGGGACGCGTATGATTAATACTCGTAAAAAAG
	G2I-R	CTTTTTTACGAGTATTAAATACATACGCGTCCCTCT
G2V	G2V-F	AGAGGGACGCGTATGGTGAATACTCGTAAAAAAG
	G2V-R	CTTTTTTACGAGTATTCAACATACGCGTCCCTCT
G2S	G2S-F	AGAGGGACGCGTATGTCTAATACTCGTAAAAAAG
	G2S-R	CTTTTTTACGAGTATTAGACATACGCGTCCCTCT
G2T	G2T-F	AGAGGGACGCGTATGACCAATACTCGTAAAAAAG
	G2T-R	CTTTTTTACGAGTATTGGTCATACGCGTCCCTCT
G2N	G2N-F	AGAGGGACGCGTATGAATAATACTCGTAAAAAAG
	G2N-R	CTTTTTTACGAGTATTATTACATACGCGTCCCTCT
G2E	G2E-F	AGAGGGACGCGTATGGAAAATACTCGTAAAAAAG
	G2E-R	CTTTTTTACGAGTATTTCATACGCGTCCCTCT
G2R	G2R-F	AGAGGGACGCGTATGCCGAATACTCGTAAAAAAG
	G2R-R	CTTTTTTACGAGTATTCGCATACGCGTCCCTCT
G2W	G2R-F	AGAGGGACGCGTATGTGGAATACTCGTAAAAAAG
	G2R-R	CTTTTTTACGAGTATTCCAATACGCGTCCCTCT

注: 带下划线的碱基序列为突变氨基酸的碱基密码子。

Note: the underlined base is the base codon of the mutant amino acid.

突变子的环糊精酶表达活性。同理分别对 N3、T4 进行饱和突变 (具体序列省略)。

1.2.6 α -CGTase 酶活性测定 测定 α -环糊精葡萄糖基转移酶活力的方法参照甲基橙褪色法^[18]，具体操作如下：取 0.9 mL 预先用 50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液（pH 6.0）配制的 3%（m/V）可溶性淀粉溶液于试管中，置于 60 ℃ 水浴锅内预热 2 min，然后加入粗酶液或适当稀释的纯酶液 0.1 mL，反应 10 min，立即加入 1.0 mL 1 mol·L⁻¹ 的盐酸终止反应，再加入 1.0 mL（pH 6.0）的 0.1 mmol·L⁻¹ 的甲基橙溶液，混匀后于 16 ℃ 下保温 20 min，用酶标仪测定波长 505 nm 处的吸光度并根据空白计算褪色程度（ ΔA ），最后根据 α -环糊精标准曲线计算出 α -环糊精的浓度。酶活性单位定义为：60 ℃，pH 6.0 下，每分钟催化产生 1 μ mol 相应环糊精所需的酶量即为一个酶活力单位（U）。

1.3 α -CGTase 的酶学性质分析

1.3.1 温度对重组 CGTase α -环化活性的影响 在 pH 6.0 条件下，将纯酶液依次在 30、40、50、60、65、70 ℃、80 ℃ 温度下测定酶 α -环化活力大小，考察温度对酶 α -环化活性的影响，最适温度下的酶活力定义为 100%，计算相对酶 α -环化活力。

1.3.2 温度对重组 α -CGTase 热稳定性的影响 在 pH 6.0 条件下，将纯酶液分别置于 40、50、60、70、80 ℃ 的水浴中处理 30、60、90、120 min，结束后将酶液置于冰浴中冷却，然后按照酶 α -环化活力测定方法测定其酶活力，考察温度对酶稳定性的影响，未经处理条件下的酶 α -环化活力定义为 100%，计算残余酶 α -环化活力。

1.3.3 pH 对重组 CGTase α -环化活性的影响 在 60 ℃ 下，将纯酶液分别于 pH 为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0、10.0 缓冲液中，测定不同 pH 下的酶活力大小，考察 pH 对酶 α -环化活性的影响，最适 pH 下的酶活力定义为 100%，计算相对酶活力。

1.3.4 不同金属离子对重组 CGTase α -环化活性的影响 在反应体系中分别加 10 mmol·L⁻¹ 不同的金属离子和抑制剂，测定其酶 α -环化活力，考察不同金属离子和抑制剂对酶 α -环化活性的影响，以反应体系中不加入金属离子和抑制剂作为对照，定义其酶活力 100%，计算相对酶活力。

1.4 数据处理

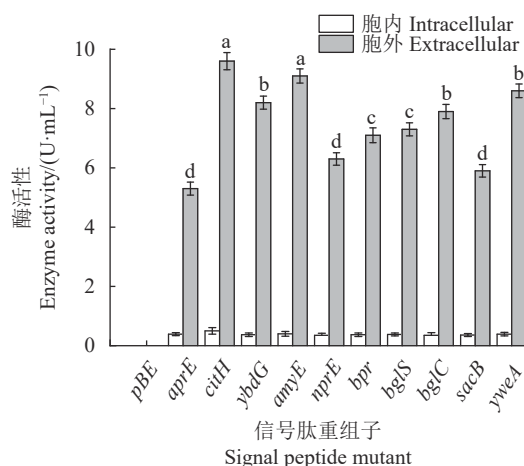
数据采用 Origin pro 8 处理并进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 信号肽表达载体库构建

重组蛋白的分泌水平受信号肽种类的影响十分显著。SP DNA mixture 包含能编码 173 种 *Bacillus subtilis* 分泌信号肽的 DNA 片段，本文运用同源重组的方法

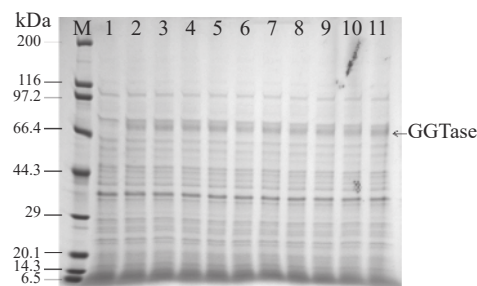
将线性载体 pBE-CGT 与 SP DNA mixture 进行同源整合获得 α -环糊精酶信号肽表达载体库 pBE-SP-CGT；并电转化 *Bacillus subtilis* RIK1285 进行 α -环糊精酶活性筛选，共筛选 365 个阳性转化子，以 *Bacillus subtilis* RIK1285/pBE-*aprE*-CGT 表达菌株为对照，筛选获得 9 条表达活性高于对照组的信号肽（*citH*、*ybdG*、*amyE*、*nprE*、*bpr*、*bglS*、*bglC*、*sacB*、*yweA*），结果如图 1 所示，其中尤以信号肽 *citH* 表达效果最好，胞外 α -环糊精酶活性达 (9.6 ± 0.29) U·mL⁻¹，是对照组 $[(5.3 \pm 0.22)$ U·mL⁻¹] 的 1.8 倍，显著高于对照组。 α -环糊精酶主要以胞外形式进行分泌表达，胞外发酵上清蛋白电泳如图 2 所示，与对照相比，在 66.4~97.2 kDa 有 1 条约 75 kDa 蛋白，与目标蛋白大小一致，不同信号肽表达环糊精酶蛋白亮度差异不明显（表达量不高）。筛选获得的 9 条信号肽氨基酸序列如表 2 所示。



注：图中小写字母表示不同处理在 $P < 0.05$ 水平下差异显著。下同图。
Note: Data with different letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$. Same for following figures.

图 1 不同信号肽对目的蛋白的影响

Fig. 1 Effects of signal peptides on target protein production



注：M：protein marker；1：对照；2：*aprE*；3：*citH*；4：*ybdG*；5：*amyE*；6：*nprE*；7：*bpr*；8：*bglS*；9：*bglC*；10：*sacB*；11：*yweA*。

Note: M: protein marker; 1: control; 2: *aprE*; 3: *citH*; 4: *ybdG*; 5: *amyE*; 6: *nprE*; 7: *bpr*; 8: *bglS*; 9: *bglC*; 10: *sacB*; 11: *yweA*.

图 2 不同信号肽 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis on signal peptides

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

信号肽名称 Signal peptide	信号肽氨基酸序列 Signal peptide amino acid sequence
pBE- <i>aprE</i> -CGT	MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSVQA
pBE- <i>citH</i> -CGT	MGNTRKKVSVIGAGFTGATTAFLIAQKELADV
pBE- <i>ybdG</i> -CGT	MKTLWKVLKIVFVSLAALVLLSVSVS
pBE- <i>amyE</i> -CGT	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFHLVLGAPAAASA
pBE- <i>nprE</i> -CGT	MGLGKKLSVAVAASFMSLSISLPGVQA
pBE- <i>bpr</i> -CGT	MRKKTKNRLISSVLSTVVISSLLFPGAAGA
pBE- <i>bglS</i> -CGT	MPYLKRVLLLLVTGLEMSLFAVTATASA
pBE- <i>bglC</i> -CGT	MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIASPASA
pBE- <i>sacB</i> -CGT	MNIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFA
pBE- <i>yweA</i> -CGT	MLKRTSFVSSLFISSAVLLSILLPSGQAHA

2.2 *citH* 信号肽优化对 α -环糊精酶分泌表达的影响

2.2.1 *citH* 信号肽 Gly2、Asn3、Thr4 饱和突变对 α -环糊精酶分泌表达的影响 以空载体 pBE 及 pBE-*citH*-CGT 表达载体为对照，对信号肽 *citH* 的 N 端氨基酸序列中 Gly2、Asn3、Thr4 分别进行饱和突变，各突变体胞内、胞外 α -环糊精酶活性变化如图 3、4、5 所示。由图 3 可看出，当 Gly2 突变为 G2A、G2K、G2L、G2V、G2R，胞外 α -环糊精酶活性均高于对照，尤其是 G2R 显著高于 *citH*，使胞外 α -环糊精酶活性由 (9.6 ± 0.29) U·mL⁻¹ 提高到 (10.7 ± 0.27) U·mL⁻¹，增加了 11.5%。由图 4 可知，当 Asn3 突变为 N3M、N3A、N3K、N3V、N3G、N3R 时，信号肽更有利于 α -环糊精酶的分泌表达，特别是 N3K 突变子显著高于 *citH*，使胞外 α -环糊精酶活性由 (9.6 ± 0.29) U·mL⁻¹

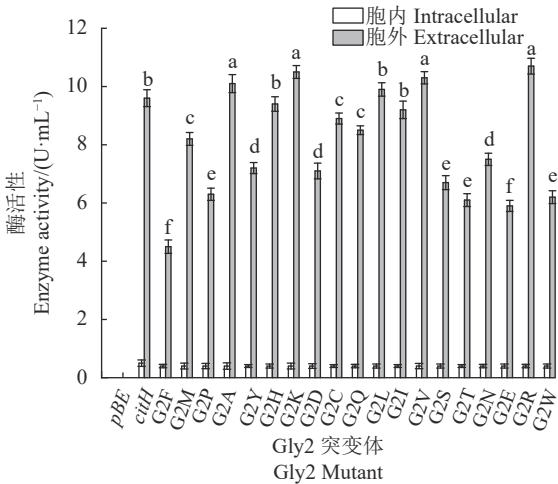


图 3 *citH* 信号肽 Gly2 饱和突变对 α -环糊精酶分泌表达的影响
Fig. 3 Effect of Gly2 saturation mutation of *citH* on α -CGTase activity

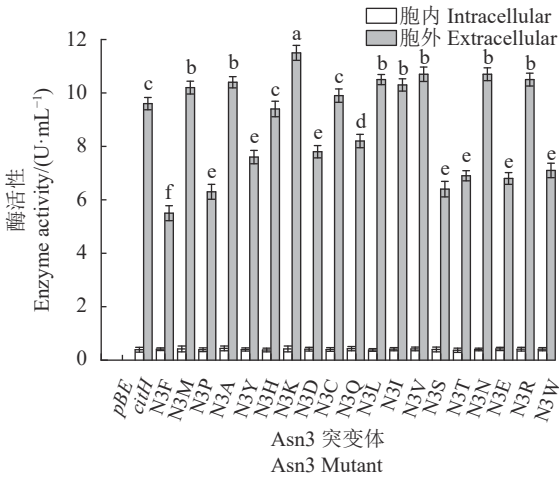


图 4 *citH* 信号肽 Asn3 饱和突变对 α -环糊精酶分泌表达的影响
Fig. 4 Effect of Asn3 saturation mutation of *citH* on α -CGTase activity

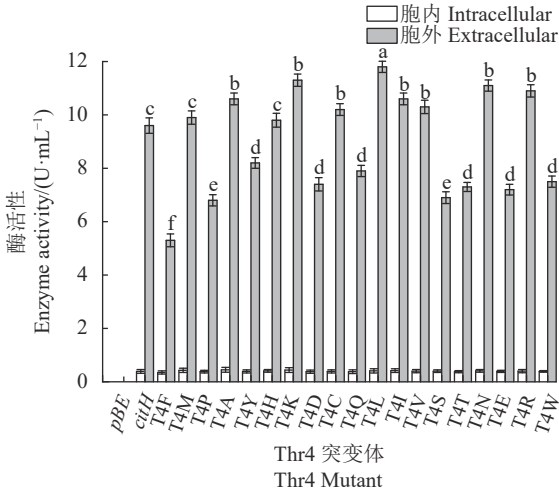


图 5 *citH* 信号肽 Thr4 饱和突变对 α -环糊精酶分泌表达的影响
Fig. 5 Effect of Thr4 saturation mutation of *citH* on α -CGTase activity

提高到 (11.5 ± 0.28) U·mL⁻¹，增加了 19.8%。同理对 Thr4 进行饱和突变 (图 5)，T4M、T4A、T4K、T4C、T4L、T4G、T4R 等 7 个突变信号肽表达效果均优于对照，其中 T4L 显著增加，使胞外 α -环糊精酶活性由 (9.6 ± 0.29) U·mL⁻¹ 提高到 (11.8 ± 0.21) U·mL⁻¹，增加了 22.9%。

2.2.2 *citH* 信号肽多点突变对 α -环糊精酶分泌表达的影响 以空载体 pBE 及 pBE-*citH*-CGT 表达载体为对照，G2R、N3K、T4L 突变信号肽为基础，对信号肽 *citH* 的 N 端氨基酸序列进行组合突变，构建多点突变信号肽 G2R-N3K-CGT、G2R-T4L-CGT、N3K-T4L-CGT、G2R-N3K-T4L-CGT，各突变子分泌 α -环糊精酶的能力如图 6 所示。双点、三点复合突变信号肽，分泌 α -环糊精酶的能力均高于单点突变信号肽，呈显著上升趋势；尤其是三点突变 G2R-N3K-T4L-CGT，

分泌α-环糊精酶的能力最强，显著高于pBE-*citH*-CGT，其胞外α-环糊精酶活性由 $(9.6\pm0.29)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 $(14.2\pm0.11)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，提高了47.9%。各突变信号肽表达环糊精酶胞外蛋白电泳分析如图7所示，经过3次突变后，G2R-N3K-T4L-CGT突变子蛋白条带亮度略有提高，但不明显。

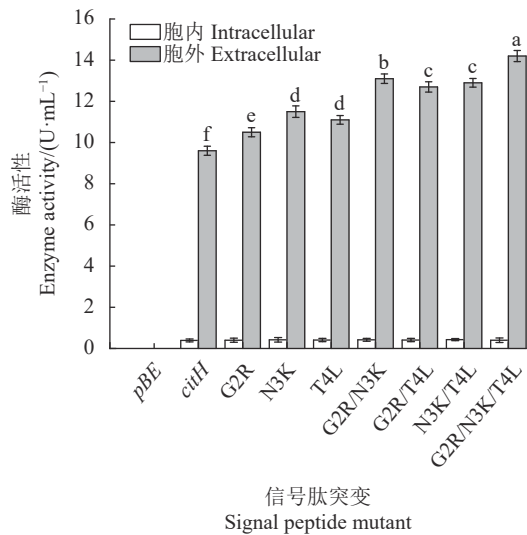
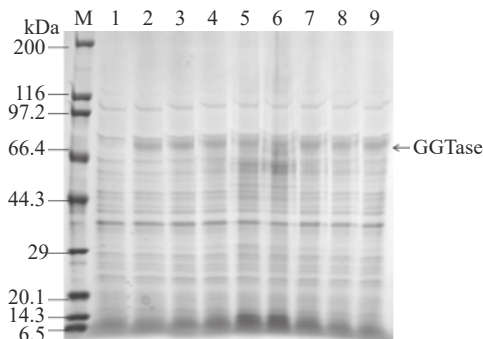


图6 *citH* 信号肽多重突变对α-环糊精酶分泌表达的影响
Fig. 6 Effect of multiple mutation of *citH* on α-CGTase activity



注：M：Protein Marker；1：对照；2：*citH*；3：G2R；4：N3K；5：T4L；6：G2R/N3K；7：G2R/T4L；8：N3K/T4L；9：G2R/N3K/T4L。
Note: M: Protein Marker; 1: control; 2: *citH*; 3: G2R; 4: N3K; 5: T4L; 6: G2R/N3K; 7: G2R/T4L; 8: N3K/T4L; 9: G2R/N3K/T4L.

图7 不同信号肽的SDS-PAGE电泳图分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis on signal peptide mutant

2.3 重组α-环糊精酶的酶学性质

2.3.1 pH对重组α-环糊精酶活性的影响 由图8可知，α-环糊精酶最适反应pH6.0，在pH3.0~6.0随pH升高，相对酶活性呈上升趋势，当pH大于6.0后，随pH增加，酶活性逐渐降低。

2.3.2 温度对重组α-环糊精酶活性的影响 由图9可知，α-环糊精酶活力为30~80℃，呈先上升后下降的趋势，当反应温度为60℃时，α-环糊精酶活力最高，因此，该酶最适反应温度为60℃。

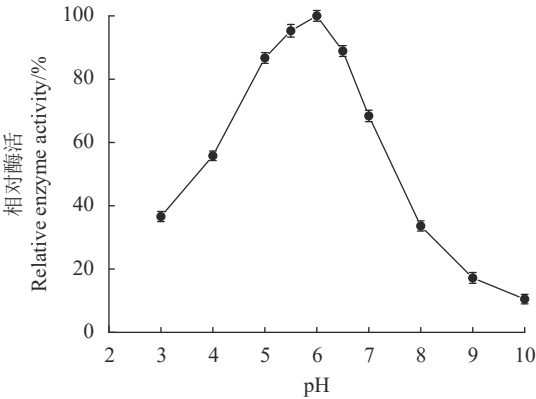


图8 pH对α-环糊精酶活力的影响

Fig. 8 pH dependence of α-CGTase activity

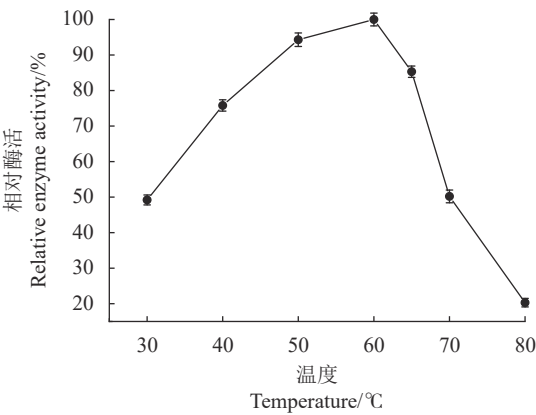


图9 温度对α-环糊精酶活力的影响

Fig. 9 Temperature dependence of α-CGTase activity

2.3.3 α-环糊精酶的热稳定性 α-环糊精酶在不同温度下保温不同时间，酶活力变化如图10所示。当保温温度低于50℃时，经过90 min保温，α-环糊精酶相对酶活力仍能达到70%以上，尤其是在40℃条件下保温120 min，相对酶活力高达97.5%，具有较好的热稳定性。当保温温度高于50℃时，随着保温时间延长，相对酶活力呈明显下降趋势，温度越高，酶活力下降越明显。

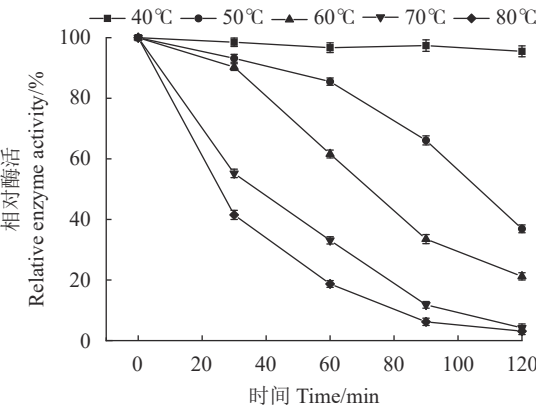


图10 不同温度下α-环糊精酶的热稳定性

Fig. 10 Thermal stability of α-CGTase activity

2.3.4 不同金属离子及抑制剂对重组 α -环糊精酶活性的影响 不同金属离子及抑制剂对 α -环糊精酶活性的影响如图 11 所示。Mg²⁺、Ca²⁺对 α -环糊精酶活性具有显著促进作用，10 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺、Ca²⁺使 α -环糊精酶活性达到 117.9% 及 121.9%。而 Cu²⁺、Mn²⁺、Na⁺、Zn²⁺、Al³⁺、EDTA、Triton、SDS 对 α -环糊精酶活性具有不同程度的抑制作用，其中 Na⁺及 SDS 抑制作用显著， α -环糊精酶活性降至初始值的 72.1% 及 33.5%。此外 Fe²⁺、Li⁺、K⁺对 α -环糊精酶活性的影响不显著。

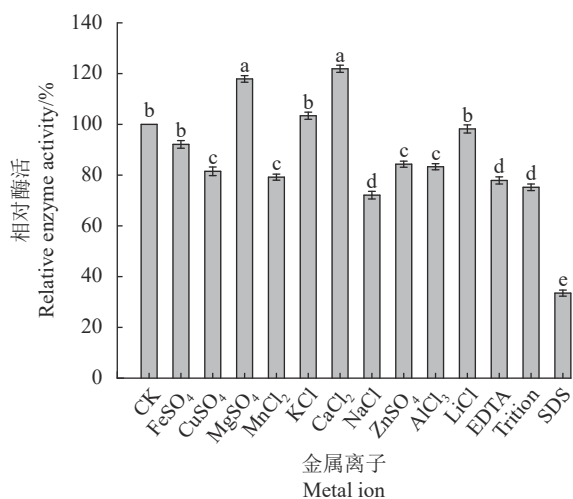


图 11 不同金属离子及抑制剂对 α -环糊精酶活力的影响

Fig. 11 Effect of metal ions and inhibitors on α -CGTase activity

3 讨论

枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一种公认的符合食品安全标准的基因工程菌，在生物工程研究及食品工业中应用潜力巨大。枯草芽胞杆菌含有 173 种信号肽，大量研究表明，外源蛋白的表达与特定信号肽之间存在着明显的适配性；信号肽的结构特征、基因转录及翻译水平的高低对蛋白分泌表达效率具有重要影响^[19]。因此针对外源蛋白基因，建立信号肽库，筛选与目标蛋白匹配度最高的信号肽，已经成为提高外源蛋白分泌的有效手段。袁林等^[20]对来源于枯草芽胞杆菌的 9 种信号肽进行筛选，获得引导 PFA 高效分泌表达的信号肽 YfkN。与 α -淀粉酶 PFA 的自身信号肽相比，表达量提高了约 10 倍。Guan C 等^[21]通过筛选来源于枯草芽胞杆菌的 19 种信号肽，获得分泌表达氨基肽酶效率更优的信号肽 YncM，是氨基肽酶自身信号肽胞外表达效率的 1.2 倍。Zhang W 等^[22]通过筛选来源于枯草芽胞杆菌的 138 种信号肽 (114 个 Sec 和 24 个 Tat 途径信号肽)，获得分泌碱性木聚糖酶效率较优的信号肽

PhoB。本研究以枯草芽胞杆菌 173 种信号肽为对象，筛选获得了与 α -环糊精酶分泌表达匹配度较优信号肽 9 条，其中 *citH* 信号肽引导分泌 α -环糊精酶活性是初始 *aprE* 信号肽的 1.8 倍，达到 $(9.6 \pm 0.29) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

有研究表明，外源蛋白的分泌表达并不完全决定于信号肽，其还与启动子强弱、蛋白酶分泌量、信号肽 mRNA 的稳定性差异、蛋白质跨膜过程涉及的分子伴侣及异位复合物的有效性、发酵诱导条件等有关^[23-24]。祝发明等^[25]通过定点突变使 AmyX 蛋白信号肽 N 端正电荷增加，H 端疏水性降低，最终使 β -半乳糖苷酶分泌效率提高了 2.3 倍。Caspers 等^[26]对来自枯草芽胞杆菌的信号肽 Amy E 的 N 端 4 个氨基酸进行突变，改变信号肽 N 端带电荷数，研究突变信号肽对来源于 *Fusarium solanipisi* 的角质酶在枯草芽胞杆菌中分泌表达的影响，结果表明信号肽带正电荷氨基酸数量与其分泌表达效率并无正相关性。袁林等^[20]通过对信号肽 Yfk N 的 N 端中非正电荷氨基酸 Ile3 和 Gln4 进行饱和突变，获得引导分泌效率更优的突变体 I3G/Q4R，亦表明信号肽 Yfk N 的 N 端带正电荷数量与其引导 PFA 的分泌效率并无正相关性。本研究通过对信号肽 *citH* 信号肽的 N 端中非正电荷氨基酸 Gly、Asn3、Thr4 进行饱和突变，考察 N 端信号肽正电荷数变化对酶蛋白表达效率的影响，结果获得多个表达效率更高的单突变体、双突变体及三突变体信号肽，研究结果亦显示信号肽 *citH* 的 N 端正电荷数量与 α -环糊精酶分泌效率无明显正相关性。

本研究对 *citH* 信号肽进行多点复合突变，获得分泌表达效率更高的信号肽三点突变体 G2R-N3K-T4L，其引导分泌 α -环糊精酶的胞外环化活性达到 $(14.2 \pm 0.11) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，相比未突变信号肽 $[(9.6 \pm 0.29) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$ ，分泌效率提高了 47.9%；是野生菌株嗜热地芽胞杆菌 *Geobacillus caldoxylosilyticus*.CHB1 ($0.66 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 21.5 倍^[27]。本研究通过对枯草芽胞杆菌信号肽文库的筛选与优化，实现了 α -环糊精酶在枯草芽胞杆菌中的高效表达，并研究了重组 α -环糊精酶的酶学性质，其最适反应 pH 为 6.0，最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ ，在 50 $^{\circ}\text{C}$ 范围内稳定；Mg²⁺、Ca²⁺对 α -环糊精酶活性具有一定的激活。尽管本研究较大程度提高了 α -环糊精酶胞外分泌表达能力，但其仍无法满足规模化应用的要求，接下来的工作考虑通过更大范围内信号肽筛选优化及工程菌发酵条件优化等进一步提高 α -环糊精酶表达水平。

参考文献:

- [1] DEL VALLE E M M. Cyclodextrins and their uses: A review [J].

- Process Biochemistry*, 2004, 39 (9) : 1033–1046.
- [2] LI Z F, WANG M, WANG F, et al. Gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77 (2) : 245–255.
- [3] SZEJTLI J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 1998, 98 (5) : 1743–1754.
- [4] ASTRAY G, GONZALEZ-BARREIRO C, MEJUTO J C, et al. A review on the use of cyclodextrins in foods [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23 (7) : 1631–1640.
- [5] SZENTE L, SZEMÁN J. Cyclodextrins in analytical chemistry: Host-guest type molecular recognition [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85 (17) : 8024–8030.
- [6] DER VEEN BA V, UITDEHAAG J C, DIJKSTRA B W, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1543 (2) : 336–360.
- [7] KELLY R M, DIJKHUIZEN L, LEEMHUIS H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84 (1) : 119–133.
- [8] LEEMHUIS H, KELLY R M, DIJKHUIZEN L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (4) : 823–835.
- [9] LIU L, LIU Y F, SHIN H D, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (14) : 6113–6127.
- [10] VAN DIJL J M, HECKER M. *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 3.
- [11] 张佳瑜, 吴丹, 李兆丰, 等. 来源于软化芽胞杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶在毕赤酵母和枯草杆菌中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25 (12) : 1948–1954.
- ZHANG J Y, WU D, LI Z F, et al. Expression of *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (12) : 1948–1954. (in Chinese)
- [12] KANG Z, YANG S, DU G C, et al. Molecular engineering of secretory machinery components for high-level secretion of proteins in *Bacillus* species [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41 (11) : 1599–1607.
- [13] 姚小琳, 张涛, 江波. 来源于 *Paenibacillus campinasensis* SK_{13.001} 的 β -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达和反应条件优化 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46 (12) : 153–157, 165.
- YAO X L, ZHANG T, JIANG B. Expression of β -cyclodextrin glucosyltransferase from *Paenibacillus campinasensis* SK_{13.001} in *Escherichia coli* and the optimization of reaction conditions [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46 (12) : 153–157, 165. (in Chinese)
- [14] 黄燕, 汪天, 吴敬, 等. 重组 *Bacillus subtilis* 产 *B. stearothermophilus* 环糊精葡萄糖基转移酶的发酵优化 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39 (2) : 629–635.
- HUANG Y, WANG T, WU J, et al. Fermentation optimization of *B. stearothermophilus* cyclodextrin glucosyl transferase produced by recombinant *Bacillus subtilis* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39 (2) : 629–635. (in Chinese)
- [15] 陈龙军, 陈济琛, 林晓棚, 等. 嗜热芽胞杆菌 CHB1 环糊精酶基因优化及其在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37 (9) : 994–999.
- CHEN L J, CHEN J C, LIN X X, et al. Codon optimization and expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *gebacillus* sp. CHB₁ in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37 (9) : 994–999. (in Chinese)
- [16] 陈龙军, 陈济琛, 林新坚, 等. 环糊精酶基因在毕赤酵母中的组成型表达 [J]. *福建农业学报*, 2017, 32 (1) : 82–86.
- CHEN L J, CHEN J C, LIN X J, et al. Constitutive expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (1) : 82–86. (in Chinese)
- [17] 蔡海松, 林晓棚, 郭永华, 等. 信号肽及化学通透剂对环糊精葡萄糖基转移酶胞外分泌的影响 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44 (3) : 601–610.
- CAI H S, LIN X X, GUO Y H, et al. Effects of different signal peptides and chemical penetrators on extracellular production of recombinant cyclodextrin glycosyltransferase [J]. *Microbiology China*, 2017, 44 (3) : 601–610. (in Chinese)
- [18] GREEN M R, SAMBROOK J. Molecular cloning –A laboratory manual[M]. New York: Cold spring harbor laboratory, 2012.
- [19] 刘金岚, 付刚, 董会娜, 等. 通过信号肽筛选优化耐高温 α -淀粉酶在枯草芽胞杆菌中的分泌 [J]. *工业微生物*, 2017, 47 (1) : 17–23.
- LIU J L, FU G, DONG H N, et al. Optimization of thermostable α -amylase secretion by screening of optimal signal peptide in *Bacillus subtilis* [J]. *Industrial Microbiology*, 2017, 47 (1) : 17–23. (in Chinese)
- [20] 袁林, 曾静, 郭建军, 等. 极端嗜热酸性 α -淀粉酶 PFA 在枯草芽胞杆菌中的高效分泌表达 [J]. *食品科学*, 2018, 39 (18) : 100–108.
- YUAN L, ZENG J, GUO J J, et al. Efficient secretory expression of hyperthermoacidophilic α -amylase PFA in *Bacillus subtilis* WB600 [J]. *Food Science*, 2018, 39 (18) : 100–108. (in Chinese)
- [21] GUAN C R, CUI W J, CHENG J T, et al. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis* [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33 (3) : 372–379.
- [22] ZHANG W W, YANG M M, YANG Y D, 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.
- [23] BROCKMEIER U, CASPERS M, FREUDL R, et al. 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.
- [24] ANNÉ J, ECONOMOU A, BERNARTS K. Protein secretion in

- gram-positive bacteria: From multiple pathways to biotechnology [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 404: 267–308.
- [25] 祝发明, 刘辉, 曹要玲, 等. 枯草芽孢杆菌AmyX基因信号肽性能优化研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34 (9): 11–16.
- ZHU F M, LIU H, CAO Y L, et al. Studies on optimizing the signal peptide of AmyX protein from *B. subtilis* [J]. *Journal of Northwest A& F University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition)*, 2006, 34 (9): 11–16. (in Chinese)
- [26] CASPERS M, BROCKMEIER U, DEGERING C, et al. 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.
- [27] 叶学军. 地芽孢杆菌CHB1产CGTase的分离纯化及基因的克隆与表达[D]. 福州: 福州大学, 2014.
- YE X J. Purification, characterization, gene cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus caldxylosilyticus* CHB1[D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2014. (in Chinese)
- (责任编辑: 张梅)