

李晓楠,王 云,王 喆,等. 基于信号肽的 β -葡萄糖苷酶的分泌表达[J].江苏农业学报,2022,38(1):223-231.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.027

基于信号肽的 β -葡萄糖苷酶的分泌表达

李晓楠^{1,2}, 王 云², 王 喆¹, 刘小莉¹, 吴 寒¹, 周剑忠¹, 夏秀东^{1,2}

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏 南京 210014; 2.江苏大学食品与生物工程学院,江苏 镇江 212013)

摘要: 为提高大肠杆菌异源表达 β -葡萄糖苷酶的底物可及性,本研究以大肠杆菌 BL21(DE3) 为宿主细胞,使用信号肽 OprI、OsmY、PelB、OmpA 将纳豆芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因 *bglH* 锚定到大肠杆菌 BL21(DE3) 外膜和周质上。然后使用启动子 T7、Trc、LacUV5 诱导表达II型分泌途径的 SecB 伴侣蛋白,进而实现全细胞催化糖苷型底物水解。本研究通过表征不同细胞定位的 β -葡萄糖苷酶活性,发现信号肽 PelB 分泌效果明显高于其他信号肽,LacUV5 启动子与 SecB 伴侣蛋白组合表达 *bglH* 的重组菌株全细胞催化酶活性最高。此外,添加甘氨酸至质量分数为 1.0%时,全细胞催化 β -葡萄糖苷酶活性最高。并且通过优化诱导条件确定了 β -葡萄糖苷酶的最优发酵条件:初始细胞密度(OD_{600})为 1.0,发酵温度为 25℃,发酵时间为 24 h,发酵 pH 为 6.5,最终全细胞催化 β -葡萄糖苷酶活性可达 2.55 U/ml。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 分泌表达; 信号肽; 伴侣蛋白 SecB

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)01-0223-09

Secretory expression of β -glucosidase based on signal peptide

LI Xiao-nan^{1,2}, WANG Yun², WANG Zhe¹, LIU Xiao-li¹, WU Han¹, ZHOU Jian-zhong¹, XIA Xiu-dong^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To enhance the substrate accessibility of heterologous expression of β -glucosidase in *Escherichia coli*, *E. coli* BL21 (DE3) was used as the host cell in this study. β -glucosidase related gene (*bglH*) of *Bacillus natto* was anchored to the outer membrane and periplasm of *E. coli* BL21 (DE3) by using different signal peptides (OprI, OsmY, PelB, OmpA). Different promoters (T7, Trc, LacUV5) were used to induce the expression of SecB chaperonin in type II secretory pathway to realize the hydrolysis of glycoside-type substrate from the aspect of whole-cell catalysis. Through representation of the activities of β -glucosidase located in different cells, it was found that the secretion effect of signal peptide PelB was obviously higher than other signal peptides, and in the recombinant strain which combined LacUV5 promoter and SecB chaperonin to express *bglH*, the whole-cell catalytic enzyme activity was the highest. In addition, activity of β -glucosidase was the highest under the condition of whole-cell catalysis when the mass fraction of glycine in the solution was 1.0%. The optimum conditions for β -glucosidase fermentation were determined through optimizing the induction conditions, which were as follows: the initial cell density (OD_{600}) was 1.0, the fermentation temperature was 25℃, the fermentation time was 24 h and the fermentation pH was 6.5. Under these conditions, activity of β -glucosidase from the aspect of whole-cell catalysis can reach 2.55 U/ml.

Key words: β -glucosidase; secretory expression; signal peptides; chaperonin SecB

收稿日期:2021-08-17

基金项目:江苏省科技计划项目(BE2019355)

作者简介:李晓楠(1996-),女,山西晋中人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。(E-mail)jsulleey@163.com

通讯作者:夏秀东,(E-mail)86084056@163.com

糖苷是天然产物的重要组成成分,具有多种重要的生理活性,有些糖苷通过水解生成苷元(如槲皮素、京尼平和稀有人生皂苷等^[1-2]),可以产生更好的药理活性。 β -葡萄糖苷酶(BGL)是纤维素类水解酶,可水解末端、非还原性的羟基- β -葡萄糖苷或

芳香基- β -葡萄糖苷的 β -D-糖苷键, 释放出 β -葡萄糖和相应的配基^[3]。 β -葡萄糖苷酶对糖苷的水解有关键作用, 工业上通过向糖苷水解系统中添加 β -葡萄糖苷酶来提高糖苷的水解效率^[4]。糖苷类化合物转化方法包含商品酶催化、微生物转化和酸水解。目前, 从植物中很难直接纯化得到大量的 β -葡萄糖苷酶, 并且纯化蛋白质生产成本低^[5], 产生 β -葡萄糖苷酶能力强的野生型菌株不易获取, 而异源表达系统的建立能够有效解决这个问题, 该系统反应条件温和、操作简单、成本低、污染少, 因此常用基因工程手段进行异源表达, 实现外源蛋白质的高效表达, 有利于降低生产成本^[6]。由于全细胞可保护酶免受外界环境的影响, 且无需添加任何辅因子或酶, 因此全细胞催化已经逐渐替代粗酶或纯酶广泛应用于目标产物的生物合成中^[7]。大肠杆菌具有遗传背景清楚、表达周期短、操作简单、转化效率高等优点, 常用于外源蛋白质的表达^[8]。但是, 由于大肠杆菌缺乏有效的分泌系统, 细胞质空间有限, 外源蛋白质的大量表达会聚集形成包涵体, 而且胞内蛋白质种类多, 含量大, 破碎后的纯化步骤极易造成目的蛋白质的损失^[9-10]。研究表明, 胞外蛋白质种类和蛋白酶较少, 一般情况下可直接纯化得到高纯度、稳定的目的蛋白质^[11]。卢俊文^[12]将丙酮酸氧化酶基因在大肠杆菌中分别进行胞内和分泌表达, 发现丙酮酸氧化酶分泌表达酶活性比胞内表达提高了 61%。细胞循环发酵已被证明可以提高菌株生产效率, 降低生产成本, 通过向发酵罐中连续添加底物可使目标蛋白质分泌表达菌株连续生产^[13]。目前工程菌表达的糖苷酶多是胞质酶, 但糖苷型底物难以进入胞内与酶结合, 因此糖苷酶的可及性差, 难以实现全细胞高效催化^[14-16]。因此, 研究 β -葡萄糖苷酶的胞外分泌表达, 有利于提高酶和糖苷型底物的可及性, 提高全细胞催化效率。

II 型分泌系统是分泌表达外源蛋白质的常用方法, 该系统利用信号肽介导外源蛋白质至周质空间, 再透过外膜至培养基中实现分泌^[17]。SecB 途径是 II 型分泌途径的一种亚途径, SecB 途径通过转运信号肽 (PelB、OmpA 等) 帮助蛋白质定位^[18-19]。SecB 是一种特殊的伴侣蛋白质, 当前体蛋白质被翻译后, 含有信号肽的蛋白质前体跨过内膜之前与 SecB 蛋白结合, 阻止前体蛋白质自我折叠, 使其转移至周质空间后进行折叠^[20]。本研究选用来自枯

草纳豆芽孢杆菌 B.N.K 的具有高异黄酮糖苷水解活性的 2 个 β -葡萄糖苷酶基因 *bglH* (基因 ID: 64305721) 和 *yckE* (基因 ID: 17139092) 为研究对象, 将大肠杆菌 II 型分泌途径中的信号肽序列添加到 β -葡萄糖苷酶 N 端, 通过测定全细胞蛋白质、胞内蛋白质、周质空间蛋白质的表达量和酶活性衡量 β -葡萄糖苷酶跨膜表达效果, 除此之外, 考察伴侣分子 SecB 的表达对蛋白质内膜转运的影响, 通过添加甘氨酸及优化发酵条件提高 β -葡萄糖苷酶的分泌表达, 提高 β -葡萄糖苷酶与糖苷型底物的可及性, 进而实现糖苷型异黄酮向苷元型异黄酮的高效转化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的枯草纳豆芽孢杆菌 B.N.K 菌株由本实验室保存。

1.2 试剂与仪器

试剂: 胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂、氯化钠、氯霉素、氨苄青霉素、链霉素、丙三醇由南京寿德有限公司生产, 基因组提取试剂盒由天根生化科技 (北京) 有限公司生产; SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司生产; DNA Marker, 琼脂糖, *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司产品); Goldview I 型核酸染色剂由北京索莱宝科技有限公司生产。

仪器: DSX-280B 型压力蒸汽灭菌器由上海申安医疗器械厂生产; W-CJ-2G 型超净工作台、LRH-150 型生化培养箱由德国 Sartorius 生产; 3K15 型高速冷冻离心机由美国 Sigma 生产; WH-3 型漩涡混合仪由上海跃进医疗器械有限公司生产; PCR 仪、GelDocEQ 型凝胶成像仪和蛋白质电泳仪由 BIO-RAD 公司生产; 恒温水浴锅由常州国华电器有限公司生产; One Drop OD-2000 分光光度计由南京五义科技有限公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 β -葡萄糖苷酶的表达与发酵

1.3.1.1 β -葡萄糖苷酶基因重组质粒的构建 以枯草纳豆芽孢杆菌 B.N.K 菌株的基因组 DNA 作为模板, 通过同源臂引物 *bglH*-F 和 *bglH*-R 扩增 *bglH* 基因, 通过 *yckE*-F 和 *yckE*-R 扩增 *yckE* 基因, 引物序列见表 1。使用同源重组酶将扩增产物与经 *Bam* HI 和 *Nco* I 酶切

的载体 PACYCDuet-1 连接,得到重组质粒 A-*bglH*、A-*yckE*,将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 获得重组菌株,分别命名为 BglH、YckE。

1.3.1.2 纳豆芽孢杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶的定位研究 将 50 μ l 的样品与 50 μ l 5 mmol/L *p*NPG 在 100 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.0)中混合,37 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min,用 Na_2CO_3 终止反应,测量 405 nm 处的吸光度。1 个酶活性的单位定义为 1 min 释放 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量。直接测定得到的发酵液上清液 β -葡萄糖苷酶活性即为胞外 β -葡萄糖苷酶活性;将细胞悬浮于 200 μ l 30 mmol/L Tris-HCl 溶液中,冰浴 30 min 后离心,上清液即为周质空间组分;将离心得到的细胞悬浮于 400 μ l 的 25 mmol/L Tris-HCl 和 150 mmol/L NaCl 缓冲液中进行超声破碎,离心取上清液即为细胞质组分;离心得到的不溶物质即为细胞沉淀组分。

1.3.1.3 重组 β -葡萄糖苷酶的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 按照方法 1.3.1.2 的方法制备不同组分的样品,分别取 200 μ l 的样品,加入等体积的2 \times SDS 上样缓冲液,沸水浴处理 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心 5 min,取上清液进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.2 不同的信号肽与 BglH 的融合表达 以 A-BglH 为模板,用表 1 中的引物通过 PCR 的方法将信号肽 PelB、OmpA、OprI 和 OsmY 融合到 BglH 的 N 端,PCR 扩增产物使用限制性核酸内切酶(*Dpn* I)处理 1 h 后,将胶回收产物进行末端磷酸化,磷酸化产物使用 Soution I DNA 连接酶连接,获得重组质粒 A-*ompA-bglH*、A-*oprI-bglH*、A-*osmY-bglH* 和 A-*pelB-bglH*,转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 即得重组菌株,分别命名为 PelB-BglH、OmpA-BglH、OprI-BglH、OsmY-BglH。按照 1.3.1.2 和 1.3.1.3 的方法对其进行酶活性测定以及 SDS-PAGE 检测。

1.3.3 SecB 伴侣蛋白在不同启动子质粒下的表达

将 A-*pelB-bglH* 片段和线性化的 PACYCDuet-1 载体在 16 $^{\circ}$ C 用 T4 连接酶连接过夜,以获得 A-T7-*pelB-bglH*,通过 PCR 获得 Trc 启动子,与线性化的 A-*pelB-bglH* 连接获得 A-*Trc-pelB-bglH*。以大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组作为模板,扩增得到 *secB* 基因,将其与线性化 A-*Trc-pelB-bglH* 质粒在 16 $^{\circ}$ C 下用 T4 连接酶连接过夜,以获得 A-*Trc-pelB-bglH-T7-secB*。将 PCR 获得的 Trc 启动子与线性化 A-*Trc-pelB-bglH*

连接获得重组质粒 A-*Trc-pelB-bglH-Trc-secB*,用同样的方法构建重组质粒 A-*Trc-pelB-bglH-LacUV5-secB*。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 即得重组菌株 Trc-PelB-BglH、Trc-PelB-BglH-T7-SecB、Trc-PelB-BglH-Trc-SecB、Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB。按照 1.3.1.2 的方法对其进行酶活性测定。

1.3.4 甘氨酸对分泌表达的影响 在方法 1.3.3 的基础上,挑取含有重组 A-*Trc-pelB-bglH-LacUV5-secB* 单菌落接种于 LB 培养基(含 50 μ g/ml 氯霉素抗生素)中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养过夜。将种子液以 1% 接种量接种于含氯霉素的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 的条件下,培养至初始细胞密度(OD_{600})达到 0.45~0.55 时,加入 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达,同时加入甘氨酸至最终质量分数分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%。在 25 $^{\circ}$ C、100 r/min 的条件下诱导 24 h 后测定全细胞酶活性、全细胞破碎上清液酶活性以及 OD_{600} 。

表 1 本研究使用的基因引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

名称	序列(5'→3')
<i>bglH</i> -F	TAAGGAGATATACCATGGATATGAGTCAAATGAAAACG
<i>bglH</i> -R	TGATGGCTGCTGCCCATGGTCAGAGACTCTCTCCGTTTG
<i>yckE</i> -F	GGAGATATACCATGGATATGATCCACCAGCATCCAG
<i>yckE</i> -R	TGATGGCTGCTGCCCATGGTTATAAACTTTCTCCGTTTGTG
<i>pelB</i> -F	GAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGA
<i>pelB</i> -R	CCAGACTCGAGGCTACCTCAGAGACTCTCTCCG
<i>ompA</i> -F	GATATACATATGAAAAAACCGCGATTGCGATTGCGG
<i>ompA</i> -R	TTTACCAGACTCGAGGCTACCTCAGAGACTCTCTCCG
<i>oprI</i> -F	AGAAGGAGATATACATATGAACAACGTTCTGAAATT
<i>oprI</i> -R	CCAGACTCGAGGCTACCTCAGAGACTCTCTCCGT
<i>osmY</i> -F	CCATATGACTATGACAAGACTGAAG
<i>osmY</i> -R	CGGATCCCCGCGACCCTCAATTCCAGCACCTGCCTTAGTTTT-CAGATCATTTTTTAACGC
<i>Trc</i> -F	TGCGCCATTTCGATGGTGTG
<i>Trc</i> -R	CAGGGTTTTCCCACTCACGA
<i>LacUV5</i> -F	GCTTTACACTTTATGCTTCGCGCTCGTATAATGTGTGG
<i>LacUV5</i> -R	AAGCATAAAGTGTAAGCATTTCGCCGACACCATCG
<i>secB</i> -F	CGGGATCCAATGTCAGAACAAAACAACACTGAAATG
<i>secB</i> -R	TTCGCGCCGCTCAGGCATCCTGATGTTCCTCAGTA

1.3.5 发酵条件优化 在方法 1.3.4 的基础上,研究诱导时初始细胞密度 OD_{600} (0.5、0.8、1.0、1.5、2.0)、诱导时间(12 h、18 h、24 h、36 h,添加诱导剂 IPTG 时为 0 h)、诱导温度(15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30

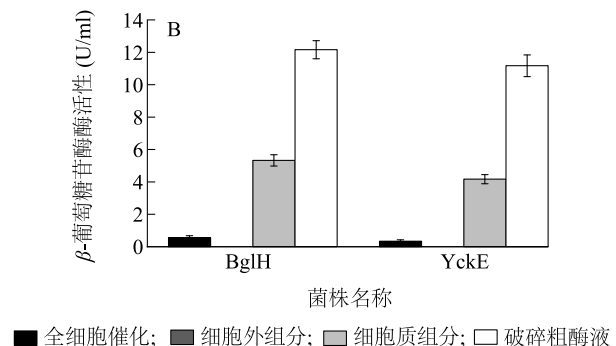
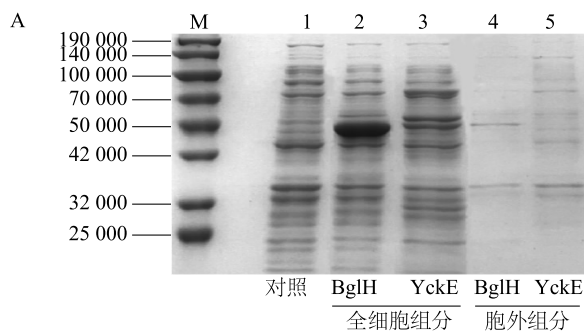
℃、35℃)以及初始 pH(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)对 β -葡萄糖苷酶分泌表达的影响。

2 结果与分析

2.1 β -葡萄糖苷酶工程菌的表达

2 株重组菌的全细胞蛋白质以及胞外蛋白质的 SDS-PAGE 结果如图 1A 所示,重组大肠杆菌 BglH 和 YckE 中 β -葡萄糖苷酶主要存在于细胞质中,胞外组分中几乎观察不到目标蛋白质。如图 1B 所示,在细胞质组分中,重组大肠杆菌 BglH 和 YckE 的 β -葡萄糖苷酶酶活性分别可达到 5.33 U/ml 和 4.17 U/ml。而在发酵液上清液中并未检测到葡萄糖苷酶活性。这一结果表明,重组大肠杆菌 BglH、YckE 中 β -葡萄糖

糖苷酶主要存在于细胞内部,属于胞质酶,并没有分泌到细胞外与糖苷型底物充分结合。对重组大肠杆菌 BglH 和 YckE 的破胞粗酶液进行比较,发现重组大肠杆菌 BglH 的 β -葡萄糖苷酶酶活性略高于 YckE,可达到 12 U/ml,说明重组大肠杆菌 BglH 的水解糖苷能力高于 YckE。Kuo 等^[21]也发现 BglH 在水解糖苷型异黄酮方面比 YckE 更加有效,BglH 更适用于异黄酮去糖基化。此外,利用上述菌株的粗提液进行全细胞催化,在重组大肠杆菌 BglH 和 YckE 中均检测到少量的 β -葡萄糖苷酶活力,但是重组大肠杆菌 BglH 的 β -葡萄糖苷酶酶活性略高于 YckE,说明重组大肠杆菌 BglH 更能有效地进行全细胞催化,因此选用 BglH 进行后续研究。



A:目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果;B:重组菌 β -葡萄糖苷酶活性。

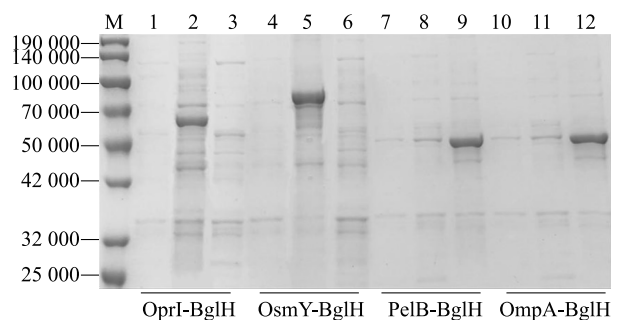
图 1 重组菌 β -葡萄糖苷酶十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果与酶活性

Fig.1 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) results and determination of β -glucosidase activity of recombinant bacteria

2.2 不同信号肽对 β -葡萄糖苷酶分泌表达的影响

信号肽是辅助前体蛋白质折叠以及前体蛋白质跨膜的重要元件,对于异源蛋白质的分泌表达效率及产量具有重要影响,筛选信号肽可以实现异源蛋白质的高效表达以及提高目的蛋白质的产量^[22]。

本研究从信号肽 OprI、OsmY、PelB、OmpA 中进行筛选。如图 2 所示,融合蛋白 OprI-BglH、OsmY-BglH 绝大部分在胞内以沉淀的形式存在,泳道 2、泳道 5 的沉淀中大部分为目标蛋白质。这是因为 β -葡萄糖苷酶在大肠杆菌中高水平表达时,其表达蛋白会折叠不正确而形成无天然活性的包涵体,从而导致蛋白质无法利用,降低了该酶的产量和利用率^[23-24]。而泳道 1、泳道 4 细胞周质组分和泳道 3、泳道 6 细胞质组分中几乎无目标蛋白质。融合蛋白 PelB-BglH、OmpA-BglH 多以可溶状态存在,主要存在于细胞质组分中,在细胞周质中观察到少量目标蛋白质。



1、4、7、10:细胞周质组分;2、5、8、11:沉淀组分;3、6、9、12:细胞质组分。

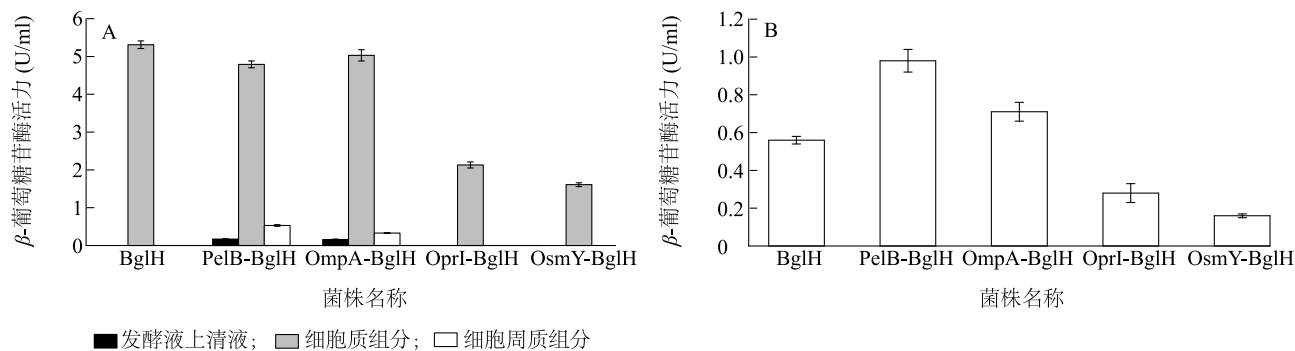
图 2 信号肽与葡萄糖苷酶融合蛋白在大肠杆菌细胞中的定位

Fig.2 Localization of the fusion protein of signal peptide and glucosidase in *Escherichia coli* cells

以未与信号肽融合表达的 BglH 菌株作为对照,对不同的信号肽 OprI、OsmY、PelB、OmpA 与 BglH 共表达的重组菌株各组分的酶活性进行测定,如图 3A

所示,信号肽 OprI、OsmY 表达后在细胞周质和发酵液上清液中未检测到葡萄糖苷酶活性,说明 OprI、OsmY 的表达并未将葡萄糖苷酶锚定到膜上与底物之间进行充分结合。沙冲^[25]将 OsmY 与脂肪酶融合表达,经过细胞定位分析,发现该融合蛋白存在于细胞质中,而非定位于细胞表面或分泌到细胞外,说明 OsmY 信号肽的适用蛋白需要进一步甄别。如图 3B 所示,由 OprI、OsmY 与 BglH 共表达后的全细胞催化酶活性远低于对照组,根据图 2 的电泳结果推测这 2 个信号肽形成了包涵体,从而导致酶活性下降。对于信号肽 PelB、OmpA 与 BglH 共表达的重组菌株,细胞质组分中的酶活性均有下降,且在细胞周质和发酵液上清液中都检测到了较低的葡萄糖苷酶活性,这说明 PelB、OmpA 的表达能使 β -葡萄糖苷酶分泌到细胞周

质中,进一步分泌到细胞外。如图 3B 所示,全细胞催化的结果与对照组相比,信号肽 PelB 和 OmpA 与 BglH 共表达的菌株进行全细胞催化后酶活性明显提高。Wang 等^[26]利用 PelB 天然信号肽分泌表达内切葡萄糖酶,其酶活性可达到 75.22 U/mg。Yamabhai 等^[27]发现大肠杆菌外膜蛋白 OmpA 能够提高重组蛋白在大肠杆菌表达系统中的分泌效率,实现了 α -淀粉酶、甘露聚糖酶以及壳多糖酶的胞外分泌表达量。李琦等^[28]同样发现信号肽 PelB 和 OmpA 的表达可提高重组蛋白的可溶性表达量。图 3A 显示, PelB 表达的菌株细胞周质中酶活性明显高于 OmpA。如图 3B 所示, PelB-BglH 对于底物 pNPG 的催化效率最高,发酵 24 h 后酶活性可达 0.98 U/ml,因此信号肽 PelB 的共表达能够使酶更高效地分泌表达。



A:不同信号肽重组菌株在大肠杆菌不同组分中的酶活性;B:不同信号肽重组菌株全细胞催化酶活性。

图3 不同信号肽对 β -葡萄糖苷酶 BglH 表达分泌的影响

Fig.3 Effect of different signal peptides on expression and secretion of β -glucosidase BglH

2.3 不同启动子表达伴侣蛋白 SecB 对 BglH 分泌表达的影响

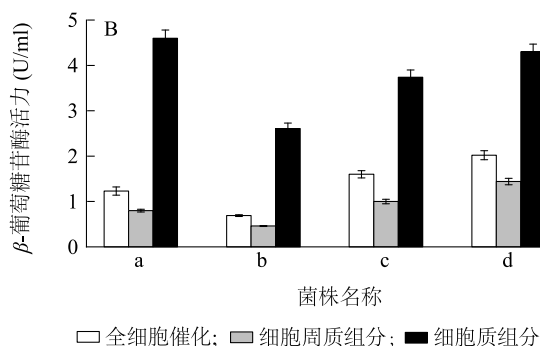
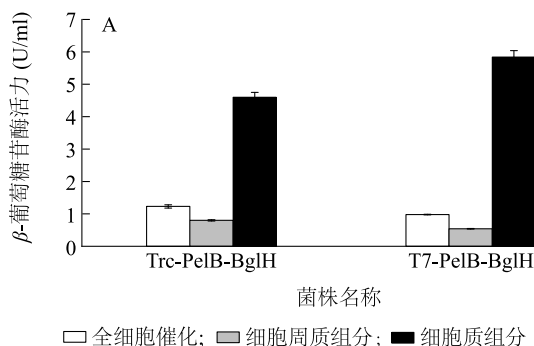
启动子是基因转录调控的重要表达元件,筛选强启动子能够明显提高异源基因的转录水平^[29]。如图 4A 所示,使用 Trc 启动子的重组菌株在细胞周质中 β -葡萄糖苷酶活性稍高,全细胞催化的 β -葡萄糖苷酶活性能达到 1.23 U/ml。因此选用 Trc 启动子实现信号肽 PelB 与 BglH 融合表达进行下一步试验。据报道 SecB 伴侣蛋白有利于 II 型分泌系统信号肽的分泌表达^[30],由于 Trc 启动子表达的 PelB-BglH 菌株全细胞催化酶活性仍然低于细胞质组分,考虑通过伴侣蛋白 SecB 提高外源蛋白质的分泌效率。

为了进一步提高伴侣蛋白 SecB 的表达效率,本研究选用 T7、Trc、LacUV5 启动子表达伴侣蛋白 SecB。如图 4B 所示,T7 启动子与伴侣蛋白 SecB

共表达后的重组菌株中各组分的糖苷酶活性均比对照组低。这可能是因为伴侣蛋白 SecB 的过量表达是大肠杆菌细胞的负担,导致包涵体形成的增加,降低 β -葡萄糖苷酶活性^[31]。而 Trc 启动子和 LacUV5 启动子与伴侣蛋白 SecB 共表达的菌株细胞质酶活性均有一定程度的降低,细胞周质中 β -葡萄糖苷酶活性有所提升,这表明 Trc 启动子和 LacUV5 启动子与伴侣蛋白 SecB 共表达使得 β -葡萄糖苷酶能更好地从胞内向胞外转移,与糖苷型底物更充分地结合。将上述菌株进行全细胞催化,LacUV5 启动子与 SecB 的组合表达后全细胞催化酶活性最高,可达 2.02 U/ml,因此选用 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 可进行下一步的表达优化。由于伴侣蛋白有利于异源蛋白质分泌,但是伴侣蛋白的过量表达会对重组大肠杆菌造成负担,因此有必要对不同的异源蛋白质和伴侣蛋白

进行分析研究。Lu 等^[32] 选用 3 个启动子 (T7、lac、bla) 共表达伴侣蛋白 SecB 来实现丙酮酸氧化

酶的细胞外表达,与 T7 和 Lac 启动子相比,弱启动子 bla 提供了最佳的细胞外丙酮酸氧化酶活性。



A:不同启动子表达 PelB;B:不同启动子表达 SecB。a:Trc-PelB-BglH;b:Trc-PelB-BglH-T7-SecB;c:Trc-PelB-BglH-Trc-SecB;d:Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB。

图 4 用不同启动子 (T7、Trc、LacUV5) 表达 SecB 对 β -葡萄糖苷酶 BglH 表达分泌的影响

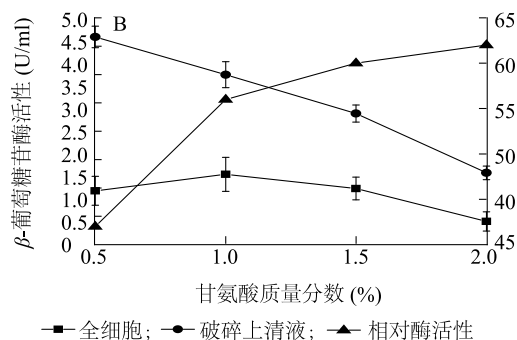
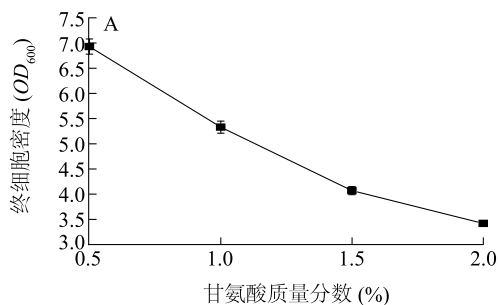
Fig.4 Effect of SecB expression under different promoters (T7, Trc, LacUV5) on the expression and secretion of β -glucosidase BglH

2.4 甘氨酸对 β -葡萄糖苷酶表达分泌的影响

酶的分泌表达不仅受酶的表达效率的影响,还与细胞膜的通透性有关,若不能及时分泌到胞外,就会造成累积,从而堵塞分泌通道^[33]。通过添加甘氨酸破坏重组大肠杆菌细胞壁和 Cu^{2+} 作为 bglH 稳定剂,使周质空间的外膜蛋白渗透至胞外,可以进一步提高重组蛋白质分泌表达量^[34]。

添加甘氨酸对大肠杆菌 A-trc-pelB-bglH-lacUV5-secB 细胞密度和 β -葡萄糖苷酶活性的影响如图 5 所示。由图 5A 可知,甘氨酸对细胞生长具有显著的负

面影响,随着甘氨酸含量的增加,菌体浓度降低,这可能是因为甘氨酸对细胞生长具有一定的毒害作用^[34]。从图 5B 可知,甘氨酸的添加对细胞质中 β -葡萄糖苷酶活性也有负面影响,细胞质的酶活性随着甘氨酸质量分数的增加呈现下降的趋势。而全细胞催化酶活性随着甘氨酸质量分数的增加呈现先上升后下降的趋势,甘氨酸质量分数为 1% 时酶活性最高,可达到 2.24 U/ml。细胞外的 β -葡萄糖苷酶活性的提高证明了甘氨酸对蛋白质渗漏的影响,与前期优化甘氨酸以实现蛋白质渗漏的研究结果类似^[35]。



A:甘氨酸对细胞生长的影响;B:甘氨酸对重组菌 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 的 β -葡萄糖苷酶活性的影响。

图 5 甘氨酸质量分数对重组菌 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 各组分 β -葡萄糖苷酶活性、胞外相对 β -葡萄糖苷酶活性以及重组菌的终细胞密度 (OD_{600}) 的影响

Fig.5 Effect of mass fraction of glycine on the activity of β -glucosidase, extracellular relative activity of β -glucosidase and final cell density (OD_{600}) in different parts of recombinant *Escherichia coli* A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB

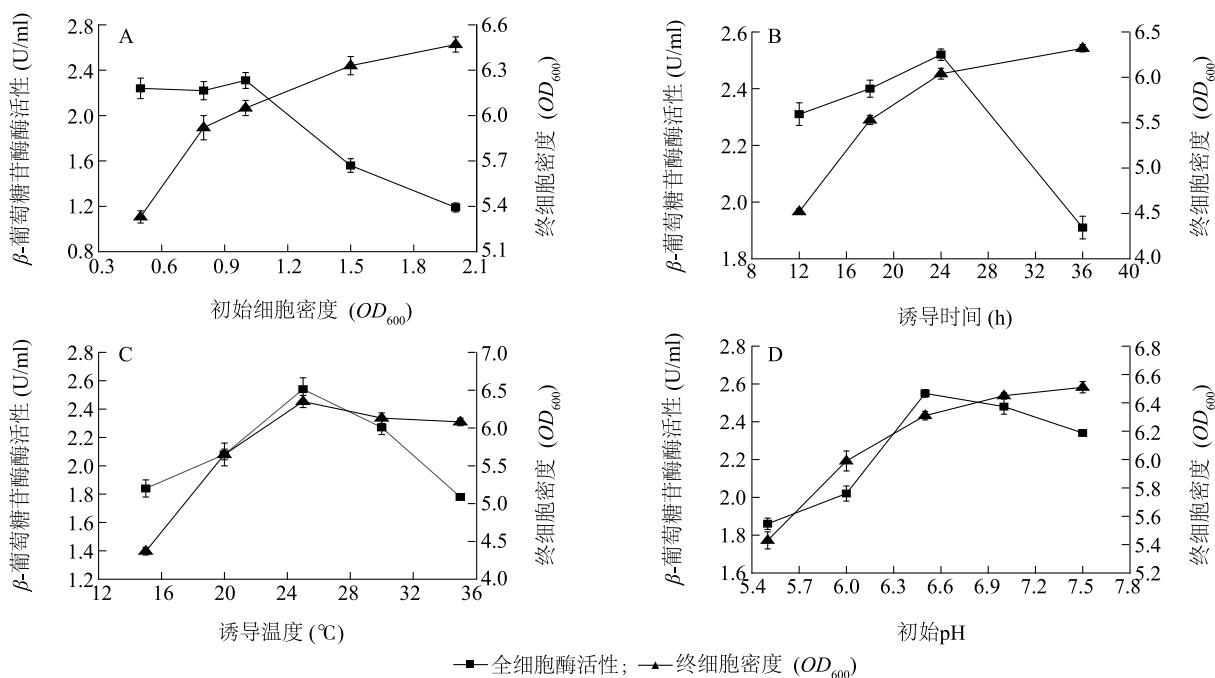
2.5 重组表达菌株培养条件优化

分子水平的操作可以提高 β -葡萄糖苷酶的细胞外分泌表达产量,优化培养条件也可以提高 β -葡

萄糖苷酶的胞外分泌量^[35]。本研究通过对诱导表达过程中初始菌体密度、诱导时间、诱导温度以及初始 pH 进行优化,进一步提高胞外分泌量。

大肠杆菌 A-trc-pelB-bglH-lacUV5-secB 在不同初始细胞密度(OD_{600})下诱导后的生长曲线以及全细胞 β -葡萄糖苷酶活性变化如图 6A 所示,细胞初始密度(OD_{600})为 0.4~1.6 时, β -葡萄糖苷酶酶活性显著增加,而在细胞初始密度大于 1.5 后 β -葡萄糖苷酶酶活性保持相对稳定。随着初始细胞密度的增加,全细胞酶活性整体表现为先缓慢上升后迅速下降,在初始细胞密度(OD_{600})为 1.0 时进行诱导,发酵 24 h 后全细胞酶活性最高,达到 2.31 U/ml,初始细胞密度大于 1.0 之后进行诱导不利于 β -葡萄糖苷酶的分泌表达,说明诱导时机过晚比过早对表达的影响更大^[36]。杨涛等^[33]也发现诱导时菌体生长时期会对蛋白质的表达和分泌造成影响,他们考察了诱导时菌体 OD_{600} 对多铜氧化酶在大肠杆菌中分泌的影响,结果表明当 $OD_{600}=1$ 时,多铜氧化酶胞内、胞外酶活性均为最高。由图 6B 可知,发酵 24 h 后重组大肠杆菌 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 的终细胞密度随着诱导时间的增加上升,而全细胞催化酶活性随着诱导时间的延长呈现先上升后下降的趋

势,诱导时间为 24 h 时,全细胞 β -葡萄糖苷酶活性最高,可达 2.52 U/ml。图 6C 显示了诱导温度对重组大肠杆菌 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 的细胞密度以及 β -葡萄糖苷酶活性的影响,总体而言,在 20~35 $^{\circ}\text{C}$ 获得高细胞密度,诱导温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, β -葡萄糖苷酶活性最高,且较高温度和较低温度均不利于 β -葡萄糖苷酶的胞外表达。这是因为诱导温度是影响蛋白质表达的一个重要因素,温度过高会形成包涵体,温度过低会造成外源基因表达不足^[37]。诱导期的初始 pH 对大肠杆菌 A-Trc-PelB-BglH-LacUV5-SecB 的细胞密度和 β -葡萄糖苷酶活性有显著影响(图 6D)。在 pH 为 5.5~7.5 时 β -葡萄糖苷酶的全细胞催化酶活性先上升后下降,初始 pH 为 6.5 时,全细胞催化酶活性最高,达到 2.55 U/ml,且 pH 为 6.0~7.5 时能够保持较高酶活性,这与何成等^[38]的研究结果一致。因此通过优化诱导条件确定 β -葡萄糖苷酶的最优发酵条件为,初始细胞密度(OD_{600})=1.0,诱导时间为 4 h,初始 pH 为 6.5,诱导温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。



A: 初始细胞密度(OD_{600}); B: 诱导时间; C: 诱导温度; D: 初始 pH。

图 6 重组大肠杆菌菌株表达条件优化

Fig.6 Optimization of expression conditions for recombinant *Escherichia coli* strains

3 结论

本研究以 β -葡萄糖苷酶 *BglH* 为模式酶,结合

信号肽结构特点对大肠杆菌 II 型分泌系统中 4 种信号肽进行筛选,发现在 N 端融合 PelB 实现了 β -葡萄糖苷酶 *BglH* 在大肠杆菌中的胞外分泌表达。并

使用4种不同的启动子调控伴侣蛋白SecB的表达,提高信号肽PelB对 β -葡萄糖苷酶BglH的分泌效率。此外,通过添加甘氨酸以及优化培养条件,进一步提高 β -葡萄糖苷酶全细胞催化活性,进而提高其与糖苷型底物的可及性,使其转化为具有更高利用效率的苷元型物质。

参考文献:

- [1] 原野,胡彦波,周义发,等. 糖苷水解酶-生物转化制备活性糖苷与苷元的有效工具[J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1219-1234.
- [2] ZHAO Y, KANG L P, LIU Y X, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities[J]. *Planta Medica*, 2009, 75(4): 356-363.
- [3] PAVEL V, VOLKOV A M, ROZHKOVA I N, et al. Cloning, purification and study of recombinant GH3 family β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*[J]. *Biochimie*, 2020, 168(1): 231-240.
- [4] 朱龙宝,汤斌,陶玉贵,等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因克隆及在毕赤酵母中分泌表达[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 973-977.
- [5] 何成,吴言,孟春雨,等. 新型 β -葡萄糖苷酶BglD2异源表达及水解虎杖苷能力[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 580-592.
- [6] 蔡小雨,闫培生,高秀君,等. 人参皂苷生物转化的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(4): 52-60.
- [7] 徐春英. 高效分泌表达耐热性 β -葡萄糖苷酶工程菌的构建[D]. 南京: 南京师范大学, 2013.
- [8] HABIMANA, 乔郅钠,徐美娟,等. 重组谷氨酸棒杆菌全细胞催化一步法合成高果糖浆[J]. 食品与发酵工业, 2021(6): 1-9.
- [9] THOMAS J G, AYLING A, BANEYX F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli* to fold or to refold[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 66(3): 197-238.
- [10] 王培立,王平,田健,等. 芽胞杆菌高效分泌表达异源蛋白的研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(2): 95-102.
- [11] 张伟. 谷氨酸棒杆菌外源蛋白分泌表达系统的开发及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [12] 卢俊文. 丙酮酸氧化酶在大肠杆菌中的胞内表达及分泌表达的研究[D]. 上海: 上海理工大学, 2019.
- [13] SCHLUESENER D, FISCHER F, KRUIP J, et al. Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Proteomics*, 2005, 5(5): 1317-1330.
- [14] 刘艺婷. 淀粉分支酶在大肠杆菌中的分泌表达及其分子改造研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [15] 丁小娟. 嗜酸乳杆菌 β -葡萄糖苷酶及其与槲皮素糖苷底物作用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [16] 崔世修. 黑曲霉胞内 β -葡萄糖苷酶的酶学性质研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [17] MERGULHÃO F J, SUMMERS D K, MONTEIRO G A, et al. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(3): 177-202.
- [18] KHOKHLOVA O V, NESMEIANOVA M A. Interaction of SecB and SecA with the N-terminal region of mature alkaline phosphatase on its secretion in *Escherichia coli*[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2003, 37(4): 712-718.
- [19] 黄磊,谢玉娟,李申,等. 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2007(5): 199-202.
- [20] YAMABHAI M, EMRAT S, SUKASEM S, et al. Secretion of recombinant *Bacillus hydrolytic* enzymes using *Escherichia coli* expression systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 133(1): 50-57.
- [21] KUO L C, LEE K T. Cloning, expression, and characterization of two beta-glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 6(1): 119-25.
- [22] YAO D, SU L, LI N. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection[J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 69.
- [23] 张瑶. β -葡萄糖苷酶分泌表达型乙醇发酵 *E. coli* 工程菌的构建[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [24] KAWAKAMI Y, TSURUGASAKI W, NAKAMURA S. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol[J]. *Nutr Biochem*, 2005, 16(4): 205-212.
- [25] 沙冲. 华根霉(*Rhizopus chinensis*)脂肪酶在异源宿主中的高效分泌表达[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [26] WANG P, MA J, ZHANG M, et al. Efficient secretory overexpression of endoinulinase in *Escherichia coli* and the production of inulinoligosaccharides[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(5): 880-894.
- [27] YAMABHAI M, EMRAT S, SUKASEM S, et al. Secretion of recombinant *Bacillus hydrolytic* enzymes using *Escherichia coli* expression systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 133(1): 50-57.
- [28] 李琦,童欣怡,蒋玉洁,等. 全细胞催化剂pelB-Xln-DT构建及其在水解三七皂苷R1中的应用[J]. 林业工程学报, 2020, 5(4): 114-120.
- [29] SONG Y F, NIKOLOFF J M, FU G. Promoter screening from *Ba-*

- cillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications[J]. PLoS One, 2016, 11(7):e0158447.
- [30] 周颖,张青,殷长传,等. 分子伴侣 *SecB* 基因和人淋巴毒素基因在大肠杆菌中的共表达[J]. 生物工程学报, 1997, 13(4):433-436.
- [31] JIA Q, LUO Y. The selective roles of chaperone systems on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(11):1667-1675.
- [32] LU J, ZHANG J. Extracellular expression of *Aerococcus viridans* pyruvate oxidase in recombinant *Escherichia coli* through *SecB* co-expression[J]. J RSC Advances, 2019, 9(45):26291-26301.
- [33] 杨涛,陈坚,方芳. 多铜氧化酶在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 过程工程学报, 2020, 20(10):1210-1217.
- [34] BAO R M, YANG H M, YU C M, et al. An efficient protocol to enhance the extracellular production of recombinant protein from *Escherichia coli* by the synergistic effects of sucrose, glycine, and Triton X-100[J]. Protein Expr Purif, 2016, 126(10):9-15.
- [35] OLUSESAN A T, AZURA L K, ABUBAKAR F. Enhancement of thermostable lipase production by a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8 in a continuous bioreactor[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2011, 20(2):105-115.
- [36] 周勇,徐刚,杨立荣,等. 信号肽优化在枯草芽孢杆菌体系中对脂肪酶 *LipS* 分泌表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9):42-49.
- [37] 李海军,王林刚,王治泽,等. 枯草杆菌脂肪酶基因在大肠杆菌中的诱导分泌表达[J]. 生物技术通报, 2010, 26(3):90-94.
- [38] 何成,吴言,孟春雨. 新型 β -葡萄糖苷酶 *BglD2* 异源表达及水解虎杖苷能力[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2):580-592.

(责任编辑:陈海霞)