

# $\beta$ -葡萄糖苷酶与透明颤菌血红蛋白在大肠杆菌中的共表达

邓发军, 潘宇, 常飞, 房伟, 方泽民, 肖亚中

安徽大学 现代生物制造安徽省重点实验室 安徽省微生物与生物催化工程研究中心, 安徽 合肥 230601

邓发军, 潘宇, 常飞, 等.  $\beta$ -葡萄糖苷酶与透明颤菌血红蛋白在大肠杆菌中的共表达. 生物工程学报, 2018, 34(3): 379–388.  
Deng FJ, Pan Y, Chang F, et al. Co-expression of  $\beta$ -glucosidase and *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 379–388.

**摘要:** 为解决大肠杆菌高密度发酵生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶过程中溶氧不足的问题, 分别采用双顺反子和  $T_7$  启动子系统在 *Escherichia coli* 中引入透明颤菌血红蛋白 (VHb) 以改善溶氧的利用、提高菌体的生物量, 进而增加  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产量。以双顺反子形式诱导表达 VHb 时, 在摇瓶低溶解氧条件下的最高生物量达到  $4.24 \pm 0.29$  ( $OD_{600}$ ), 与无 VHb 表达的对照组相比提高了 35.03%, 同时  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵酶活达到了  $(9.78 \pm 0.55)$  U/mL, 比对照组提高了 25.38%。在 3 L 发酵罐中使用双顺反子形式共表达 VHb 时,  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵总酶活达到 141.23 U/mL, 与无 VHb 表达的对照相比提高了 35.57%。以  $T_7$  启动子对 VHb 进行表达后, 在摇瓶和发酵罐中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的发酶活均低于对照组。这些结果表明, 在大肠杆菌中以双顺反子形式共表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb 能够提升菌体对低溶氧的耐受能力, 提高菌体生物量和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产量。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 大肠杆菌, 透明颤菌血红蛋白 (VHb), 双顺反子

## Co-expression of $\beta$ -glucosidase and *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli*

Fajun Deng, Yu Pan, Fei Chang, Wei Fang, Zemin Fang, and Yazhong Xiao

Anhui Key Laboratory of Modern Biomufacturing, Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

**Abstract:** In producing recombinant  $\beta$ -glucosidase in *Escherichia coli* by high-cell density cultivation (HCDC), insufficient soluble oxygen is always a problem. To address it, *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) was introduced into *Escherichia coli* by the bicistron and  $T_7$  promoter expression systems, to improve soluble oxygen by bacterial cells and thereby to enhance the biomass

**Received:** May 14, 2017; **Accepted:** June 12, 2017

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA093515), National Natural Science Foundation of China (No. 31300062), National Innovation Experiment Program for University Students (No. 201510357026).

**Corresponding authors:** Yazhong Xiao. Tel/Fax: +86-551-63861861; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

Zemin Fang. Tel/Fax: +86-551-63861861; E-mail: zemin\_fang@ahu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA093515), 国家自然科学基金 (No. 31300062), 大学生科研训练计划项目 (No. 201510357026) 资助。

and recombinant  $\beta$ -glucosidase production. In the case of bicistron expression system, cell density in shaking flask reached  $OD_{600}=(4.24\pm 0.29)$ , 35.03% higher than that of the control without VHb. Correspondingly, the maximum activity of  $\beta$ -glucosidase co-expressed with VHb was  $(9.78\pm 0.55)$  U/mL, 25.38% higher than that of the control. In a 3-L fermentor, the maximum activity of  $\beta$ -glucosidase was 141.23 U/mL, 35.57% higher than that of the control. In contrast, the activity of  $\beta$ -glucosidase co-expressed with VHb under  $T_7$  promoter was lower than that of the control, either in flask or in fermentor. Co-expressing  $\beta$ -glucosidase with VHb using the bicistron expression system may improve the tolerance of *E. coli* to insufficient soluble oxygen and thus promote the bacterial biomass and the enzyme yield.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase, *Escherichia coli*, *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), bicistron

$\beta$ -葡萄糖苷酶 (E.C. 3.2.1.21) 能催化水解或转移  $\beta$ -1,4-糖苷键,是糖苷水解酶类的重要成员<sup>[1-2]</sup>。早期研究表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶广泛存在于生物体内,其在纤维素降解、生物燃料炼制中有广泛的应用潜力<sup>[3-5]</sup>。随着研究的深入,  $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品加工及活性苷元制备等方面也逐步展现出巨大的应用潜力<sup>[6-8]</sup>。由于原核生物来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有较好的催化能力和较高的产量,近年来关于其表达及性质研究的报道越来越多<sup>[9-12]</sup>。与原始产酶菌株相比,利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 作为宿主细胞诱导表达原核生物来源重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶,具有发酵周期更短、酶蛋白产量更高等优势,因此其在  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产中有广泛的应用<sup>[13-15]</sup>。然而,在大肠杆菌高密度发酵生产过程中,菌体生物量和异源蛋白表达量往往受到溶解氧不足的限制而难以达到较高的水平<sup>[16]</sup>。因此,改进大肠杆菌异源表达方法、提高大肠杆菌对低溶氧环境的适应能力,对于提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产量、加快推进其工业化生产应用具有重要意义。

透明颤菌 *Vitreoscilla* 最早发现于湖泊等淡水沉积物中,是一种革兰氏阴性细菌,属于贝日阿托氏菌属 (*Beggiatoa* sp.)。为了适应其生存的厌氧环境,透明颤菌能够合成一种类似于动物血红蛋白的多肽,被称为透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* Hemoglobin, VHb)。研究发现 VHb 在不同的胞内环境下可以呈现出不同的状态 (氧化态、氧合态和还原态) 并且可以互相转化并具

有氧结合性<sup>[17]</sup>。Wang 等将 VHb 和耶罗维亚酵母脂肪酶在毕赤酵母中共表达,在 10 L 发酵罐微氧环境中脂肪酶的产量增加了约 84%<sup>[18]</sup>。Pablos 等在大肠杆菌菌株 W3110 中表达 VHb 后,微氧环境中菌体生物量提高了约 33%,同时菌体比生长速率提高了约 30%<sup>[19]</sup>。

本实验室前期构建获得  $\beta$ -葡萄糖苷酶突变体蛋白 Bgl1A (A24S/F297Y),其具有葡萄糖和乙醇双耐受的特性,在大豆异黄酮苷元制备中表现出优秀的应用潜力<sup>[20]</sup>。然而在使用大肠杆菌高密度发酵制备 Bgl1A (A24S/F297Y) 时,溶解氧不足阻碍了酶蛋白产量的进一步提高。为了缓解大肠杆菌菌体在高密度发酵中的溶解氧不足的限制,本研究将 VHb 和 Bgl1A (A24S/F297Y) 在大肠杆菌中进行共表达,并在摇瓶水平和 3 L 发酵罐水平考察了 VHb 的表达对菌体生物量和酶活变化的影响情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株和培养基

突变体蛋白 Bgl1A (A24S/F297Y) 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-bgl 为本实验室构建。质粒 pET-22b 为本实验室保存。透明颤菌血红蛋白基因序列 (*vgb*) 根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化,并由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。表达菌株 BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司。

摇瓶培养基采用 LB 培养基和 TB 培养基。LB 培养基 (1 L): 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g。TB 培养基 (1 L): 酵母提取物 24 g, 胰蛋白胨 12 g, 甘油 4 mL, 使用时加入终浓度为 17 mmol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 72 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液。发酵罐初始培养基为改良 TB 培养基 (增加甘油至终浓度 15 g/L)。发酵罐补料培养基 (1 L): 酵母提取物 45 g, 胰蛋白胨 45 g, 甘油 500 mL。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) 购自 Sigma 公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。大肠杆菌的高密度发酵使用 Eppendorf BioFlo 115 的 3 L 发酵罐。

## 1.2 方法

### 1.2.1 表达质粒的构建

以  $T_7$  启动子表达 VHb 的质粒 pET22b- $T_7$ -*vgb* 构建: 以 pUC57-*vgb* 为模板, 使用引物 *vgb*-F 和 *vgb*-R 克隆出 *vgb* 片段, 使用内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对 *vgb* 片段和 pET22b 质粒进行双酶切, 并对酶切后的片段进行回收。使用 T4 DNA 连接酶将回收后的 *vgb* 片段和 pET22b 片段进行连接, 并转化至表达菌株 BL21 (DE3)。

以双顺反子形式共表达 VHb 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl1A (A24S/F297Y) 的质粒 pET22b-*bgl*-*Bic*-*vgb* 构建: 以 pET22b-*bgl* 和 pUC57-*vgb* 为模板, 使用引物 *bgl*-F、*bgl*-*Bic*-R 和引物 *vgb*-*Bic*-F、*vgb*-*Bic*-R 分别克隆出 *bgl* 和 *vgb* 片段, 以获得的 *bgl* 和 *vgb* 片段为模板, 使用重叠延伸 PCR 进一步获得 *bgl*-*Bic*-*vgb* 片段。使用内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对 *bgl*-*Bic*-*vgb* 片段和 pET22b 质粒进行双酶切, 并对酶切后的片段进行回收。使用 T4 DNA 连接酶

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this research

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>vgb</i> -F	GATATACATATGATGCTGGACCAACAG ACTATCA
<i>vgb</i> -R	GTGGTGCTCGAGTTATTCAACGGCCTG CGC
<i>bgl</i> -F	GATATACATATGATGACTAAAATATCTT TACCAACTTGTT
<i>bgl</i> - <i>Bic</i> -R	TGATAGTCTGTTGGTCCAGCATTATATA TCTCCTTCTATTGAGATTAATGCTT TATAG
<i>vgb</i> - <i>Bic</i> -F	ATGCTGGACCAACAGACTATCA
<i>vgb</i> - <i>Bic</i> -R	GTGGTGCTCGAGTTATTCAACGGCCTG CGC
$T_7$ -Pro-F	ATCGCTACGTGACTGGGTCAGATCTCG ATCCCGCGAA
$T_7$ -Ter-R	CAGCCATGACCCAGTCCAAAAAACC CTCAAGACCC

将回收后的 *bgl*-*Bic*-*vgb* 片段和 pET22b 片段进行连接, 并转化进入表达菌株 BL21 (DE3)。双顺反子形式中, *bgl* 和 *vgb* 的间隔序列为 GAAGGAGATATATAATG, 其中 GAAGGAG 为核糖体结合位点 RBS, *bgl* 终止密码子 TAA 与 *vgb* 起始密码子 ATG 重叠, 保证 VHb 的表达。

以  $T_7$  启动子形式共表达 VHb 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl1A (A24S/F297Y) 的共表达质粒 pET22b-*bgl*- $T_7$ -*vgb* 构建: 以按上述方法构建获得的 pET22b-*vgb* 为模板, 使用引物  $T_7$ -Pro-F 和  $T_7$ -Ter-R 克隆获得  $T_7$ -*vgb* 片段。使用内切酶 *Thi*111 I 分别对  $T_7$ -*vgb* 片段和 pET22b-*bgl* 质粒进行双酶切, 并对酶切后的片段进行回收。使用 T4 DNA 连接酶将回收后的  $T_7$ -*vgb* 片段和 pET22b-*bgl* 片段进行连接, 并转化进入表达菌株 BL21 (DE3)。

### 1.2.2 发酵培养方法

挑取活化的表达菌株单克隆接种于含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡过夜培养。将培养获得的种子液以 1% 接种量 (V/V) 接种于发酵培养基中, 同时添加氨苄青霉素至终浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 放置于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇

床中振荡培养。当发酵液菌体生物量  $OD_{600}$  值达到 0.6 时, 添加终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 并将诱导温度设置为 28 °C, 在不同诱导时间进行取样, 并对样品的生物量和发酵酶活进行测定。在摇瓶水平 (250 mL 三角瓶) 中模拟低溶氧环境进行诱导表达时设置装液量为 200 mL, 摇床转速为 120 r/min; 高溶氧诱导表达条件为装液量 50 mL, 摇床转速为 220 r/min。

在 3 L 发酵罐中进行高密度发酵时, 将过夜培养的种子液以 1% 接种量 (V/V) 接种于 50 mL 含有 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中继续扩大培养, 当  $OD_{600}$  达到 1.5–2.5 时, 按 5% 接种量接种于 3 L 发酵罐中。发酵罐中的初始培养基为 1 L 的改良 TB 培养基。用 25% (V/V) 氨水控制发酵过程中的发酵液 pH 在 6.8–7.2 之间, 适当调节通气量和搅拌速度来控制溶氧。采用三阶段控制: 第一阶段为接种后至菌体生物量达到  $OD_{600}=25$  时, 调节搅拌转速和通气量控制溶氧在 10% 以上; 当菌体生物量达到  $OD_{600}=25$  时, 进入第二阶段, 将空气流速控制在 3.5 L/min、搅拌转速控制在 500 r/min 并维持 6 h; 第三阶段提高转速至 1 000 r/min, 并在通气中加入 0.5 L/min 的氧气直至发酵结束。发酵过程中温度控制在 28 °C, 当发酵液溶氧 (DO) 上升幅度超过 30% 时, 开始进行补料, 补料速率设置为 6 mL/(L·h)。当菌体生物量达到  $OD_{600}=25$  时, 添加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 进行诱导, 在不同诱导时间进行取样并对样品的生物量和发酵酶活进行测定。

### 1.2.3 分析方法

将不同诱导条件下取得的样品在 4 000 r/min 离心 20 min 获得菌体, 用适当体积 50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 6.5) 重悬菌体。随后使用超声破碎的方法对细胞壁进行破碎, 超声条件设置为: 超声 4 s, 静置 6 s, 超声时间设置为 15 min。将超声破碎后的破碎液在 12 000 r/min 离心

10 min, 分别收集上清和沉淀, 并对样品采用 SDS-PAGE 进行分析。

$\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定: *p*NPG 溶液 (100 mmol/L) 和缓冲液各取 25 µL 和 450 µL 并混匀。预热 3 min 后, 向反应液中加入适当稀释的酶液 25 µL 开始反应。反应时间设置为 10 min, 终止反应方法为加入 500 µL 的碳酸钠溶液 (母液浓度为 1 mol/L)。在 405 nm 处测量终止反应后的反应液的  $OD$  值。依据 *p*NP 标准曲线公式计算 *p*NP 的浓度和酶的活性及相对活性。酶活单位 (U) 定义: 即在酶最适作用条件下, 每分钟催化水解 *p*NPG 生成 1 µmol *p*NP 所需要的酶量为 1 U。

## 2 结果与分析

### 2.1 单独表达 VHb 对大肠杆菌的影响

在高溶氧条件下, LB 培养基中加入 IPTG 对 VHb 诱导表达 8 h 后, 菌体生物量即可达到  $OD_{600}$  值为  $4.44\pm 0.19$ , 无 VHb 表达的对照组  $OD_{600}$  值仅为  $2.24\pm 0.12$  (图 1A)。在低溶氧条件下诱导 VHb 表达 24 h 后, 重组菌生物量比对照组提高了 70.21% (图 1B)。

高溶氧条件下, 在营养更为丰富的 TB 培养基诱导 VHb 表达 8 h 后的菌体生物量达到  $4.41\pm 0.22$ , 对照组为  $2.9\pm 0.15$ ; 随诱导时间的延长, 含 VHb 的菌体  $OD_{600}$  值达到  $13.8\pm 0.96$ , 无 VHb 的对照组为  $11.4\pm 0.79$  (图 2A)。在低溶氧环境中 TB 培养基中诱导表达 24 h 后的菌体生物量  $OD_{600}$  值为  $2.99\pm 0.32$ , 比对照组的生物量提高了 45.82% (图 2B)。初步实验结果表明, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达 VHb 能够提高菌体的生物量。

### 2.2 摇瓶水平共表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb

为了获得不同的诱导表达强度, 分别使用双顺反子形式和  $T_7$  启动子形式对 VHb 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶在大肠杆菌中进行共表达, 考察不同共表达

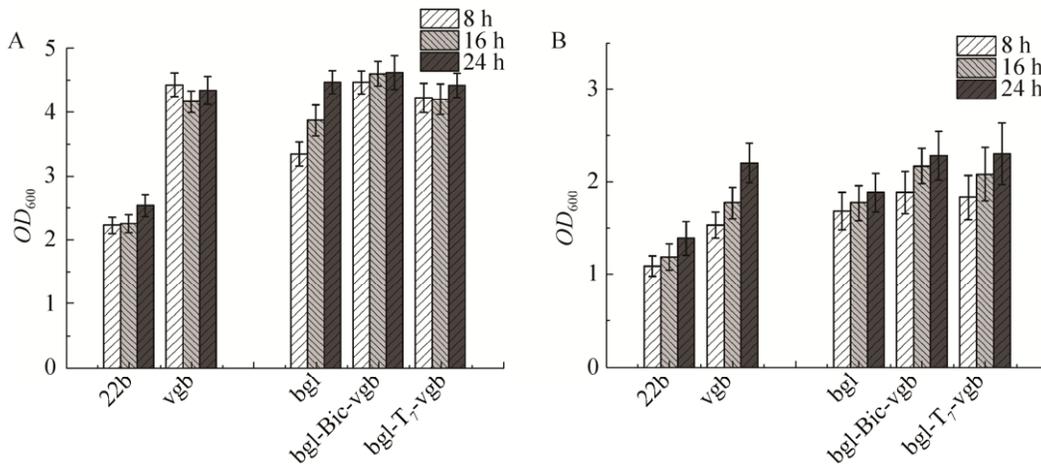


图 1 LB 培养基中生物量随诱导时间的变化情况 (A 为高溶氧条件, B 为低溶氧条件)  
Fig. 1 Changes of biomass in the LB medium with time under aerobic (A) and microaerobic (B) conditions.

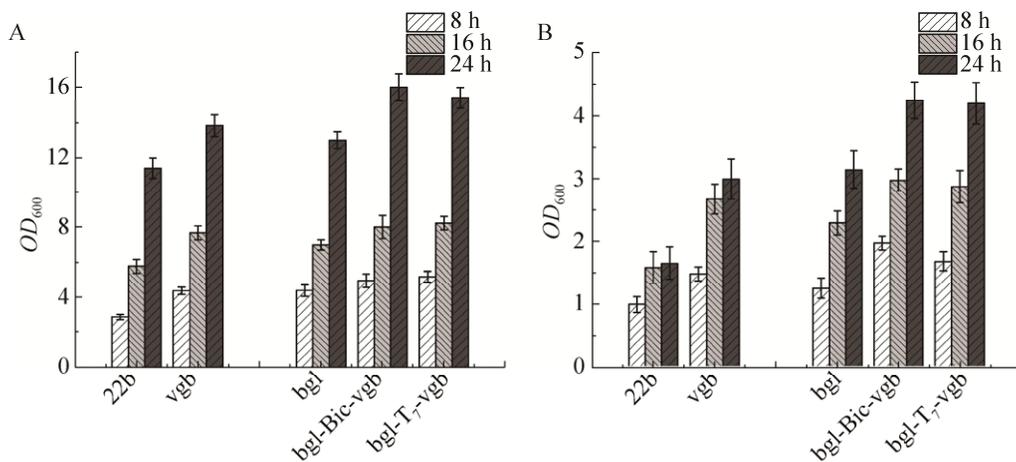


图 2 TB 培养基中生物量随诱导时间的变化情况 (A 为高溶氧条件, B 为低溶氧条件)  
Fig. 2 Changes of biomass in the TB medium with time under aerobic (A) and microaerobic (B) conditions.

形式对菌体生物量和  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响。高溶氧条件下, 在 LB 培养基中以两种形式诱导表达 VHb 均能够在诱导前期促进菌体生物量增加。

### 2.2.1 摇瓶水平中双顺反子形式共表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb

双顺反子情况下, 在诱导 8 h 时生物量较对照组均能增加 33.33% 左右; 随诱导时间延长到 24 h, 实验组和对照组的生物量趋于一致 (图 1A)。在 TB 培养基中, 高溶氧条件下 VHb 的

表达能够持续促进生物量增加, 以双顺反子形式表达 VHb 菌株的生物量在诱导 24 h 后达到  $OD_{600}$  值为  $16.25 \pm 0.98$ , 比无 VHb 表达的对照组提高 25.09% (图 2A)。

低溶氧条件下, 在两种培养基中诱导表达 VHb 后菌体的生物量均得到明显提高。LB 培养基中采用双顺反子共表达方法在诱导 8 h 后的生物量达到  $OD_{600}$  值为  $1.89 \pm 0.34$ , 持续诱导至 24 h 后的生物量增加到  $OD_{600}$  值  $2.29 \pm 0.36$ , 比对照组

提高了 21.12% (图 1B)。在 TB 培养基中使用双顺反子对 VHb 诱导表达 24 h 后, 菌体生物量达到  $4.24 \pm 0.29$ , 比对照组提高了 35.03% (图 2B)。

以双顺反子形式共表达 VHb 能够提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的发酵总酶活。图 3 中的实验结果显示, 在 LB 培养基中以双顺反子形式共表达 VHb, 高溶氧条件诱导 8 h 后  $\beta$ -葡萄糖苷酶的发酵酶活达到  $(10.35 \pm 0.45)$  U/mL, 比对照组提高 19.79%; 低溶氧条件诱导 24 h 后酶活达到  $(5.68 \pm 0.45)$  U/mL, 比对照组提高 15.92%。在 TB 培养基中以双顺反子形式共表达 VHb 后, 高溶氧条件下  $\beta$ -葡萄糖苷酶的发酵酶活达到  $(36.4 \pm 2.2)$  U/mL, 比对照组提高 20.93%; 在低溶氧条件下发酵总酶活为  $(9.78 \pm 0.55)$  U/mL, 比对照组提高 25.38%。

### 2.2.2 摇瓶水平中 $T_7$ 启动子形式共表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb

LB 培养基中采用  $T_7$  启动子共表达方法, 在诱导 8 h 后的生物量达到  $OD_{600}$  值为  $1.86 \pm 0.33$ , 持续诱导至 24 h 后的生物量增加到  $OD_{600}$  值为  $2.31 \pm 0.43$ , 比对照组提高了 22.22% (图 1B)。在 TB 培养基中使用  $T_7$  启动子对 VHb 诱导表达 24 h 后, 菌体生物量  $OD_{600}$  值为  $4.19 \pm 0.33$ , 比对照组提高了 31.85% (图 2B)。

以  $T_7$  启动子表达 VHb 时  $\beta$ -葡萄糖苷酶的总酶活均低于对照组, 在高溶氧条件 LB 和 TB 培养基中仅为  $(5.47 \pm 0.35)$  U/mL 和  $(21.14 \pm 1.31)$  U/mL; 在低溶氧条件下的总酶活仅为  $(2.91 \pm 0.29)$  U/mL 和  $(6.47 \pm 0.48)$  U/mL。SDS-PAGE 结果显示, 以  $T_7$  启动子表达 VHb 时, 有部分 VHb 以包涵体的形式存在 (图 4)。

### 2.3 3 L 发酵罐水平共表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb

为了考察大肠杆菌高密度发酵中共表达 VHb 对菌体生物量和  $\beta$ -葡萄糖苷酶产量的影响, 本实验通过对搅拌浆转速和通气量进行调节, 将高密度发酵过程分为三个阶段。在第一阶段中, 由于维持了较高的溶氧水平, 发酵菌体能够快速进入对数生长期, 重组工程菌在发酵 6 h 后菌体密度均能够达到  $OD_{600}$  值为 25 左右, 此时加入 IPTG 对目标蛋白进行诱导。诱导表达 2 h 后, 调节搅拌转速至 500 r/min 和降低通气量至 3.5 L/min 使发酵溶氧水平降至 5% 以下。在第二阶段中使用双顺反子形式和  $T_7$  启动子形式共表达 VHb 的工程菌生物量均超过对照组。经过 6 h 的低溶氧发酵后, 增大搅拌转速至 1 000 r/min 并在通气中增加氧气 0.5 L/min 进行第三阶段发酵。共表达 VHb 的工程菌对氧气的利用能力均高于对照组。大肠杆菌

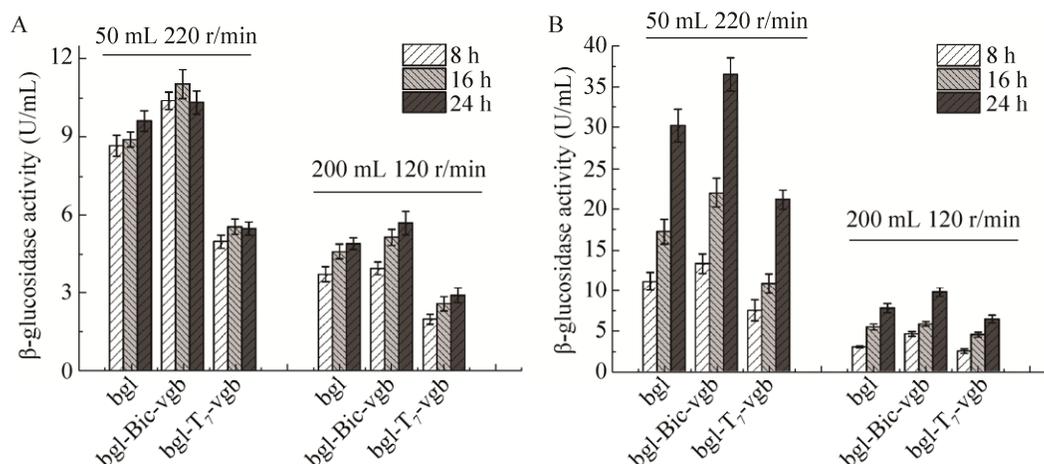


图 3 LB 培养基和 TB 培养基中  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的变化情况 (A 为 LB 培养基, B 为 TB 培养基)  
Fig. 3 Changes of  $\beta$ -glucosidase activity in LB medium (A) and TB medium (B) with time.

生物量在第三阶段增长迅速,其中以双顺反子形式共表达 VHb 的工程菌生物量在发酵 20 h 时达到最大生物量 ( $OD_{600}$  值为  $67.14 \pm 2.98$ ),以  $T_7$  启动子共表达 VHb 的工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*bgl-T<sub>7</sub>-vgb* 生物量达到最大 ( $OD_{600}$  值为  $73.28 \pm 3.21$ ),无 VHb 表达的对照菌株生物量仅为  $OD_{600}$  值  $48.83 \pm 3.24$  (图 5A)。以双顺反子形式共表达 VHb 能够显著提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的发酵酶活,诱导 14 h 后达到最大发酵酶活 ( $141.23 \pm 6.84$ ) U/mL。而以  $T_7$  启动子表达 VHb 的工程菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵酶活为 ( $110.12 \pm 5.26$ ) U/mL,无 VHb 表达的对照菌发酵酶活为 ( $104.45 \pm 6.98$ ) U/mL (图 5B)。

### 3 讨论

$\beta$ -葡萄糖苷酶在生物能源、食品工业、保健品行业、农业、医药等领域有着广泛的应用,但是在利用大肠杆菌高密度发酵生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶时,溶解氧不足往往阻碍了酶蛋白产量的进一步提高。在供氧不足的情况下,大肠杆菌糖酵解代谢和三羧酸循环代谢不平衡引发的乙酰辅酶 A 积累,进而积累的乙酰辅酶 A 在酰基转移酶和乙酸激酶等作用下生成乙酸等其他副产物<sup>[16, 21-22]</sup>。本研究通过在大肠杆菌中共表达透明颤菌血红蛋白 VHb 并对共表达方法进行优化对比,提高了大肠

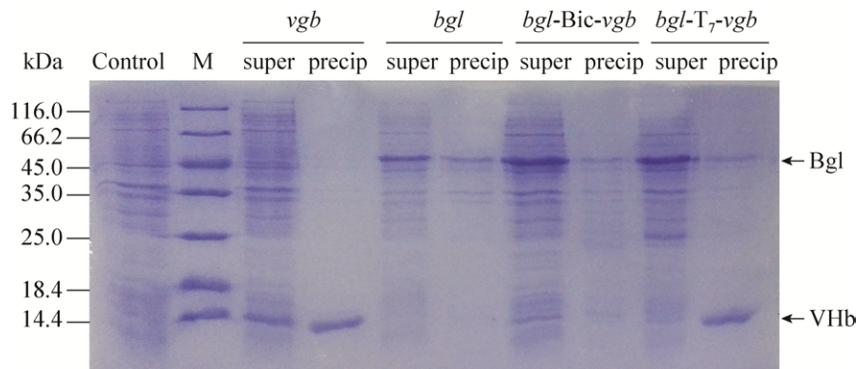


图 4 SDS-PAGE 分析三角瓶中低溶氧条件下  $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb 的表达情况 (TB 培养基)

Fig. 4 SDS-PAGE assay for the expression of  $\beta$ -glucosidase and VHb in TB medium under microaerobic condition in triangular flask. M stands for molecular marker, super and precip denote the supernatant and precipitate components of broken cells.

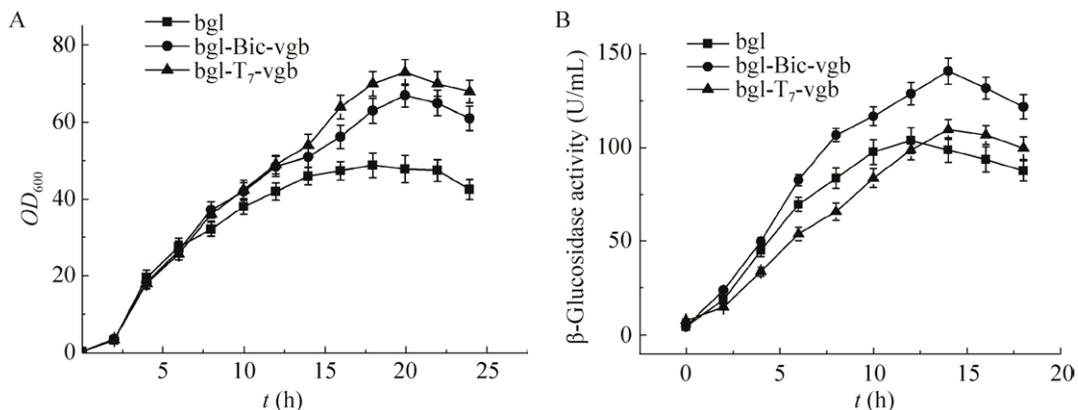


图 5 3 L 发酵罐中生物量和酶活变化情况

Fig. 5 Changes of biomass and  $\beta$ -glucosidase activity in 3 L fermentor with time.

杆菌对溶氧的利用和对低溶氧环境的耐受能力。Pablos 等对 VHb 影响大肠杆菌代谢进行研究,发现, VHb 能加快三羧酸循环进程,提高菌体对乙酰辅酶 A 的消耗速度,进而在一方面能够促进菌体生物量的增加,另一方面可以抑制乙酸等代谢副产物的生成<sup>[16, 23]</sup>。本研究在摇瓶水平中的实验结果显示, VHb 与目标蛋白的共表达能够在高溶氧环境中最大提高 23.17% 的生物量,在低溶氧环境中最大能够提高 35.03% 的生物量。与我们的结果类似, Liu 等在大肠杆菌中共表达 VHb 和 eGFP,在摇瓶中的低溶氧条件下提高了 eGFP 蛋白的表达量<sup>[24]</sup>。值得注意的是,在高溶氧条件下, IPTG 对 VHb 诱导表达后的菌体生物量比无 VHb 表达的对照组高。此结果暗示 VHb 在摇瓶中模拟高溶氧环境时,也能够提高大肠杆菌菌体对溶解氧的利用效率,并在一定程度上缓解了异源蛋白表达所带来的代谢压力。Li 等将空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni* 中的血红蛋白 CBh 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行异源表达,在 500 mL 三角瓶中装液量 100 mL, 200 r/min 条件下,诱导表达 CBh 的菌株生物量 ( $OD_{600}$  值) 在平台期较对照组有 22.2% 的提高<sup>[25]</sup>。Kim 等使用 BL21 (DE3) 作为表达宿主,将 VHb 与目标蛋白进行共表达,最终在发酵罐中获得了提高 1.9 倍的目标蛋白产量<sup>[26]</sup>。

本研究中对发酵罐获得的发酵样品进行 SDS-PAGE 检测结果显示,使用  $T_7$  启动子表达

VHb 虽然比双顺反子形式能够获得更多的蛋白表达量,但有部分 VHb 形成了不可溶的包涵体,不能够发挥其相应的氧传递功能 (图 4, 图 7)。过量表达的 VHb 虽然能够帮助大肠杆菌对溶氧的利用 (图 5C),但也在一定程度上消耗了大肠杆菌的资源,进而导致  $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达受到限制。以双顺反子形式进行异源蛋白的共表达,所获得的 VHb 表达量较  $T_7$  启动子获得的表达量低,但均为可溶的活性形式存在于细胞中,这不仅有利于获得较高的菌体生物量, $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达量也得到提高。以上结果表明,在大肠杆菌中以双顺反子形式共表达 VHb 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶能够提高低溶氧环境中的生物量水平和酶蛋白的表达水平,是有开发应用前景的一种蛋白表达方法。

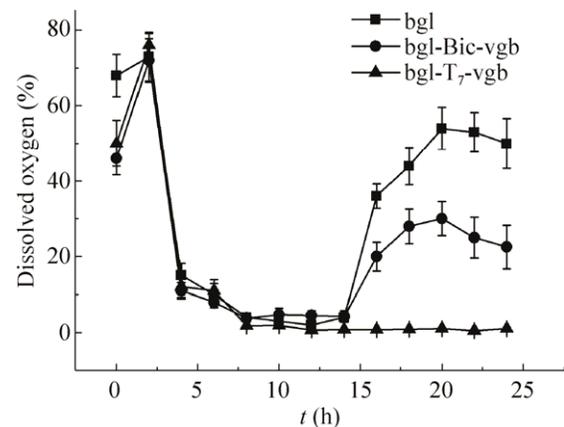


图 6 3 L 发酵罐中溶氧变化情况

Fig. 6 Changes of soluble oxygen in 3 L fermentor with time.

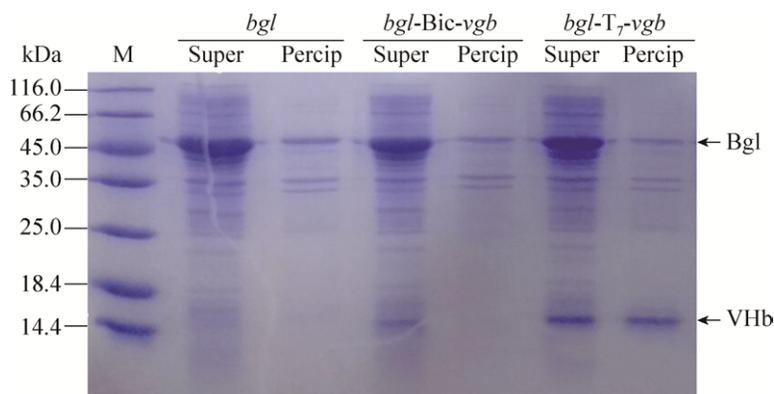


图 7 SDS-PAGE 分析 3 L 发酵罐中  $\beta$ -葡萄糖苷酶和 VHb 的表达情况

Fig. 7 SDS-PAGE assay for the expression of  $\beta$ -glucosidase and VHb in 3 L fermentor. M stands for molecular marker, super and precip denote the supernatant and precipitate components of broken cells.

## REFERENCES

- [1] Leah R, Kigel J, Svendsen I, et al. Biochemical and molecular characterization of a barley seed  $\beta$ -glucosidase. *J Biol Chem*, 1995, 270: 15789–15797.
- [2] Chamoli S, Kumar P, Navani NK, et al. Secretory expression, characterization and docking study of glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *B. subtilis*. *Int J Biol Macromol* 2016, 85: 425–433.
- [3] Youn SY, Park MS, Ji GE. Identification of the  $\beta$ -glucosidase gene from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its expression in *B. bifidum* BGN4. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(12): 1714–1723.
- [4] Yao GS, Wu RM, Kan QB, et al. Production of a high-efficiency cellulase complex via  $\beta$ -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 78.
- [5] Cripwell R, Favaro L, Rose SH, et al. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. *Appl Energ*, 2015, 160: 610–617.
- [6] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, et al. A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *J Agr Food Chem*, 1996, 44(8): 2336–2340.
- [7] Yan FY, Xia W, Zhang XX, et al. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(6): 455–464.
- [8] Kaya M, Ito J, Kotaka A, et al. Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(1): 51–60.
- [9] Gu MZ, Wang JC, Liu WB, et al. Expression and displaying of  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces coelicolor* A3 in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(7): 1713–1723.
- [10] Mai ZM, Su HF, Zhang S. Characterization of a metagenome-derived  $\beta$ -glucosidase and its application in conversion of polydatin to resveratrol. *Catalysts*, 2016, 6(3): 35.
- [11] Cui CH, Kim JK, Kim SC, et al. Characterization of a ginsenoside-transforming  $\beta$ -glucosidase from *Paenibacillus mucilaginosus* and its application for enhanced production of minor ginsenoside F-2. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85727.
- [12] Maki ML, Armstrong L, Leung KT, et al. Increased expression of  $\beta$ -glucosidase A in *Clostridium thermocellum* 27405 significantly increases cellulase activity. *Bioengineered* 2013, 4(1): 15–20.
- [13] Naz S, Ikram N, Rajoka MI, et al. Enhanced production and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2010, 75(4): 513–518.
- [14] Ohmiya K, Takano M, Shimizu S. Cloning of a  $\beta$ -glucosidase gene from *Ruminococcus albus* and its expression in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 646: 41–52.
- [15] Shin KC, Lee HJ, Oh DK. Substrate specificity of  $\beta$ -glucosidase from *Gordonia terrae* for ginsenosides and its application in the production of ginsenosides Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, and Rh<sub>1</sub> from ginseng root extract. *J Biosci Bioeng*, 2015, 119(5): 497–504.
- [16] Pablos TE, Sigala JC, Le Borgne S, et al. Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2014, 9(6): 791–799.
- [17] Tyree B, Webster DA. Electron-accepting properties of cytochrome o purified from *Vitreoscilla*. *J Biol Chem*, 1978, 253(21): 7635–7637.
- [18] Wang XF, Sun YC, Shen XG, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves production of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in a recombinant *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 50(1): 22–28.
- [19] Pablos TE, Mora EM, Le Borgne S, et al. *Vitreoscilla* hemoglobin expression in engineered *Escherichia coli*: improved performance in high cell-density batch cultivations. *Biotechnol J*, 2011, 6(8): 993–1002.
- [20] Fang W, Yang Y, Zhang XX, et al. Improve ethanol tolerance of  $\beta$ -glucosidase Bgl1A by semi-rational engineering for the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *J Biotechnol*, 2016, 227: 64–71.

- 
- [21] Stark BC, Dikshit KL, Pagilla KR. Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla*. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(9): 1705–1714.
- [22] Khosla C, Curtis JE, DeModena J, et al. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1990, 8(9): 849–853.
- [23] Khleifat KM, Abboud MM, Al-Mustafa AH, et al. Effects of carbon source and *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) on the production of  $\beta$ -galactosidase in *Enterobacter aerogenes*. *Curr Microbiol*, 2006, 53(4): 277–281.
- [24] Liu T, Chen JY, Zheng Z, et al. Construction of highly efficient *E. coli* expression systems containing low oxygen induced promoter and partition region. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 346–354.
- [25] Xu L, Xiong W, Yang JK, et al. Recombinant *Escherichia coli* Strains with inducible *Campylobacter jejuni* single domain hemoglobin CHb expression exhibited improved cell growth in bioreactor culture. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0116503.
- [26] Kim D, Hwang DS, Kang DG, et al. Enhancement of mussel adhesive protein production in *Escherichia coli* by co-expression of bacterial hemoglobin. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(3): 663–666.

(本文责编 郝丽芳)