

• 工业生物技术 •

肽聚糖水解酶基因缺失对解淀粉芽胞杆菌活菌数量及产碱性蛋白酶的影响

徐小健¹, 朱宝悦¹, 李昕悦¹, 张金方¹, 刘文龙², 路福平¹, 李玉¹

1 天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 山东隆科特酶制剂有限公司, 山东 沂水 276400

徐小健, 朱宝悦, 李昕悦, 张金方, 刘文龙, 路福平, 李玉. 肽聚糖水解酶基因缺失对解淀粉芽胞杆菌活菌数量及产碱性蛋白酶的影响. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1506-1517.

XU XJ, ZHU BY, LI XY, ZHANG JF, LIU WL, LU FP, LI Y. Effects of deleting peptidoglycan hydrolase genes on the viable cell counts of *Bacillus amyloliquefaciens* and the yield of alkaline protease. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1506-1517.

摘 要: 为了探究肽聚糖水解酶对解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 活细胞数量以及碱性蛋白酶产量的影响, 对解淀粉芽胞杆菌 TCCC111018 中的 5 个肽聚糖水解酶基因 (*lytC*、*lytD*、*lytE*、*lytF*、*lytG*) 分别进行敲除。通过分析对比基因缺失前后的生物量以及碱性蛋白酶酶活力发现, 敲除菌株 BA Δ *lytC*、BA Δ *lytE* 在 60 h 的活菌数分别达到 1.67×10^6 CFU/mL、 1.44×10^6 CFU/mL, 分别高出对照菌株 BA Δ *upp* 32.5%、14.3%; 其碱性蛋白酶酶活力分别为 20 264 U/mL、17 265 U/mL, 比对照菌株分别提高了 43.1%、27.3%。该结果表明肽聚糖水解酶的缺失可以有效维持解淀粉芽胞杆菌活细胞数量和提高碱性蛋白酶的酶活力, 为进一步构建工业酶生产宿主提供了新的思路和研究策略。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌; 肽聚糖水解酶; 基因敲除; 活菌数量; 碱性蛋白酶

Received: March 25, 2021; Accepted: September 8, 2021; Published online: September 24, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFB0308401)

Corresponding author: LI Yu. Tel: +86-22-60601958; E-mail: liyu@tust.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFB0308401)

Effects of deleting peptidoglycan hydrolase genes on the viable cell counts of *Bacillus amyloliquefaciens* and the yield of alkaline protease

XU Xiaojian¹, ZHU Baoyue¹, LI Xinyue¹, ZHANG Jinfang¹, LIU Wenlong², LU Fuping¹, LI Yu¹

¹ Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Shandong Longkete Enzyme Preparation Co., Ltd, Yishui 276400, Shandong, China

Abstract: In order to explore the effect of peptidoglycan hydrolase on the viable cell counts of *Bacillus amyloliquefaciens* and the yield of alkaline protease, five peptidoglycan hydrolase genes (*lytC*, *lytD*, *lytE*, *lytF* and *lytG*) of *B. amyloliquefaciens* TCCC111018 were knocked out individually. The viable cell counts of the bacteria and their alkaline protease activities before and after gene deletion were determined. The viable cell counts of the knockout mutants BA Δ *lytC* and BA Δ *lytE* achieved 1.67×10^6 CFU/mL and 1.44×10^6 CFU/mL respectively after cultivation for 60 h, which were 32.5% and 14.3% higher than that of the control strain BA Δ *upp*. Their alkaline protease activities reached 20 264 U/mL and 17 265 U/mL, respectively, which were 43.1% and 27.3% higher than that of the control strain. The results showed that deleting some of the peptidoglycan hydrolase genes effectively maintained the viable cell counts of bacteria and increased the activity of extracellular enzymes, which may provide a new idea for optimization of the microbial host for production of industrial enzymes.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; peptidoglycan hydrolase; gene knockout; viable cell counts; alkaline protease

解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 具有生长快、易于培养、不产生细胞毒素以及较强的分泌表达能力等优势, 在工业酶生产中具有广泛应用^[1-2], 但在高密度发酵过程中, 其菌体容易发生自溶的特点限制了目标产物产量的提高。因此有效改造解淀粉芽胞杆菌, 减缓菌体自溶, 成为了发酵生产中亟需解决的问题之一。

目前已知的与细胞自溶紧密相关的基因主要包括 3 类: 肽聚糖水解酶 (peptidoglycan hydrolase) 基因、原噬菌体相关基因以及细胞自噬相关基因^[3-4], 其中肽聚糖水解酶作为菌体

生长主要调节因子, 参与了细胞生长、分裂、自溶、蛋白分泌等多个细胞生长过程^[5]。在枯草芽胞杆菌中, 至少有 35 个编码肽聚糖水解酶的相关基因, 根据其作用位点的不同, 可分为酰胺酶、肽链内切酶、胞壁酸酶和氨基葡萄糖苷酶, 这些肽聚糖水解酶在细胞分裂过程中负责对细胞壁进行局部水解, 并与肽聚糖合成酶协调作用以保证细胞分裂的顺利进行, 但是当协调作用失调时就会导致肽聚糖球囊上出现大的缺口, 导致菌体自溶^[6-7]。此外, 肽聚糖水解酶还可以通过水解肽聚糖来对细胞的信号传递产生影响, 从而影响蛋白的分泌^[8]。

LytC (酰胺酶)、LytD (氨基葡萄糖苷酶)、LytE (肽链内切酶)、LytF (肽链内切酶)、LytG (氨基葡萄糖苷酶) 是芽胞杆菌中常见的肽聚糖水解酶。LytC、LytD 分别为 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶和 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 这两种酶的主要作用是对细胞壁水解从而使菌体自溶^[9]; LytE 和 LytF 是 DL-肽链内切酶 II 家族成员, 与细胞分裂过程中细胞壁分裂紧密相关^[10]; LytG 是一个 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 其作用机制与 LytD 相似^[11]。目前已有研究证明, 肽聚糖水解酶存在部分冗余基因, 通过敲除肽聚糖水解酶基因不仅可以有效地减缓细胞自溶^[12], 并且可以使菌株产胞外蛋白的能力得到有效提高^[13]。

本文以肽聚糖水解酶作为切入点, 通过对解淀粉芽胞杆菌中的肽聚糖水解酶基因 (*lytC*、*lytD*、*lytE*、*lytF*、*lytG*) 进行单个敲除来探究肽

聚糖水解酶对菌体生长以及碱性蛋白酶酶活力的影响, 进一步阐述解淀粉芽胞杆菌中肽聚糖水解酶基因对异源蛋白表达的影响, 为宿主菌的改造以及构建高产碱性蛋白酶生产菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究中使用的所有菌株、质粒均列于表 1 中。本研究选取的出发菌株为解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* TCCC111018 Δupp (BA Δupp), 该菌株与野生型菌株生长无明显差异, 作为本研究的出发菌株。本研究分别使用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 以及 EC135 pM.Bam 进行质粒构建以及甲基化修饰。

表 1 研究中使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i> JM109	Host for plasmid construction	Laboratory stock
<i>E. coli</i> EC135 pM.Bam	Methylated modification	Chinese Academy of Sciences
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 Δupp (BA Δupp)	Original strain	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 $\Delta lytC$ (BA $\Delta lytC$)	$\Delta lytC$	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 $\Delta lytD$ (BA $\Delta lytD$)	$\Delta lytD$	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 $\Delta lytE$ (BA $\Delta lytE$)	$\Delta lytE$	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 $\Delta lytF$ (BA $\Delta lytF$)	$\Delta lytF$	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 $\Delta lytG$ (BA $\Delta lytG$)	$\Delta lytG$	This study
pWH-T2	Kan marker	Hubei University
pWH-T2- $\Delta lytC$	Kan marker	This study
pWH-T2- $\Delta lytD$	Kan marker	This study
pWH-T2- $\Delta lytE$	Kan marker	This study
pWH-T2- $\Delta lytF$	Kan marker	This study
pWH-T2- $\Delta lytG$	Kan marker	This study
pWH980- <i>aprE</i>	Alkaline protease expression vector	Laboratory stock

1.1.2 主要培养基及仪器

LB (Luria Bertani)培养基:用于解淀粉芽胞杆菌和大肠杆菌的增殖培养。

发酵培养基:6.4%玉米淀粉、4%豆粕、0.4% Na_2HPO_4 、0.03% KH_2PO_4 、0.07%高温 α -淀粉酶 (Biotopped, 中国北京), pH 为 7.2–7.5。

MaxQ6000 型恒温调速摇床 (美国 Thermo Scientific 公司)。

Bio 电击转化仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的敲除

以实验室保存的 *B. amyloliquefaciens* TCCC111018 Δupp (BA Δupp) 菌株为出发菌株对肽聚糖水解酶 *lytC*、*lytD*、*lytE*、*lytF*、*lytG*

基因进行敲除,设计的敲除引物如表 2 所示。

大肠杆菌 *E. coli* JM109、*E. coli* EC135 pM.Bam 以及解淀粉芽胞杆菌 TCCC111018 Δupp 感受态的制备,根据相关文献^[14-16]中感受态制备的方法进行制备。

以 TCCC111018 Δupp 的基因组为模板,利用表 2 中的上,下游同源臂引物进行扩增,然后利用重叠 PCR 将上游同源臂与下游同源臂连接在一起。将连接产物回收后利用无缝克隆将其与线性质粒进行连接,得到敲除质粒 pWH-T2。并将其转至 *E. coli* JM109 感受态,37 °C 孵育 1 h 后涂布至含有 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 平板,将平板 37 °C 恒温培养 8–9 h,然后筛选转化子进行菌落 PCR 验证。

表 2 基因敲除涉及的引物序列

Table 2 Primers used in this study

Gene	Primers	Sequences (5'→3')
<i>lytC</i>	UP-F	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAACAATAAGGACAGCG
	UP-R	CTACCAATACTGTTGAATACACCTGCTTGAAAG
	DOWN-F	GTATTCAACAGTATTGGTAGAGACGGCTTTTATTACG
	DOWN-R	TTAACGAATTCCTGCAGCCCGGGCAAACACAATGTCCATGAATC
<i>lytD</i>	UP-F	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTTGCGCCGGGGCGCTCG
	UP-R	GCAGTGAGTATAACATAGGTGCAACGAATCTCTTTTTCATTC
	DOWN-F	ACCTATGTTATACTCACTGCTGGATGACTATACGCTTTACTATG
	DOWN-R	TTAACGAATTCCTGCAGCCCGGGTCCCATTCACCGAAGAACAGCTCACAAA
<i>lytE</i>	UP-F	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAATCGTGTCTGTACGTCTAATG
	UP-R	GGTAGCGAGGCGCAAACAAAGTCGTCCCTAAAACC
	DOWN-F	TTTGTTTGCGCCTCGCTACCTGGGCGCG
	DOWN-R	TTAACGAATTCCTGCAGCCCGGGCCCTGTACAATGACCCCG
<i>lytF</i>	UP-F	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATCCGATTAGGAATGATACCG
	UP-R	CGAGGTAGCGAGTCAAACCGACCGCTAAC
	DOWN-F	CGGTTTGACTCGCTACCTCGGAGCGAAACGC
	DOWN-R	TTAACGAATTCCTGCAGCCCGGGCCCTTTTTTGGACACGCTAAG
<i>lytG</i>	UP-F	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGAGTACGCCGCGTTCCG
	UP-R	CGATCAGCTCGAATATAAGAGATACAGCAAAAAGGCACCCAGC
	DOWN-F	TCTTATATTCGAGCTGATCGGCTGGGTTGACCAAAC
	DOWN-R	TTAACGAATTCCTGCAGCCCGGGCAGGCAAGCACGCTGACG

将构建的重组质粒转至 *E. coli* EC135 pM.Bam 感受态细胞中, 经过 37 °C 孵育 1 h 后涂布至含有 50 mg/mL 卡那霉素和 50 mg/mL 奇霉素的 LB 平板, 将平板 37 °C 培养 8–9 h, 然后筛选转化子进行菌落 PCR 验证, 将验证成功的转化子接种至含有卡那霉素和奇霉素的 LB 试管中, 于 37 °C 条件下培养, 当菌液 OD_{600} 值为 0.3–0.4 时, 向试管中添加 80 μ L 阿拉伯糖溶液, 随后在 30 °C 条件下诱导质粒甲基化, 培养过夜获得甲基化的转化质粒。

将甲基化成功的质粒电转至 BA Δupp 感受态细胞, 37 °C 孵育 3 h 后, 将其涂布于含有卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 恒温培养 8–9 h, 筛选转化子进行菌落 PCR 验证, 然后将验证成功的转化子接入至含有卡那霉素的 LB 试管培养基中进行传代培养, 42 °C 传代培养 2–3 代, 后将菌液稀释涂布于含有卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 恒温培养 8–9 h, 筛选转化子进行单交换验证。将验证成功的转化子接种至含 5-氟尿嘧啶的 LB 试管培养基中进行传代培养, 37 °C 传代培养 3–6 代, 后将菌液稀释涂布于含有 5-氟尿嘧啶的 LB 平板中, 37 °C 恒温培养 8–9 h, 筛选能够在含 5-氟尿嘧啶的 LB 平板生长但不能在含有卡那霉素的 LB 平板上生长的转化子, 将筛选得到的转化子进行菌落 PCR 验证, 并将样品送至金唯智 (GENEWIZ) 公司测序。

1.2.2 菌体生长曲线及活菌数的测定

将构建的基因缺失型菌株与对照菌株单菌落接至 5 mL 的 LB 试管中培养过夜, 吸取 1 mL 菌液接至 50 mL 的 LB 培养基中培养过夜, 然后以 2% 的接种量将不同菌株分别接种于 100 mL 的 LB 培养基和 100 mL 的发酵培养基中, 使用 500 mL 三角瓶在 37 °C、200 r/min 条件下培养, 其中 LB 培养基每隔 6 h 取样, 使用酶标仪检测

在 600 nm 波长下的吸光度, 测定各菌株的生长曲线。并对 24、36、48、60 h 的发酵培养基进行取样, 对所得样品参照 GB 4789.35-2016^[17] 中的方法进行活菌计数。

1.2.3 菌体形态的观察

对 1.2.2 中的发酵培养基在 12、48 h 时进行取样, 根据相关文献^[18]中电镜生物样品制备的方法制备观察样品, 并对基因缺失型菌株和对照菌株的菌体形态进行观察。

1.2.4 碱性蛋白酶活力的测定

对 1.2.2 中的发酵培养基在 24、36、48、60 h 时进行取样, 参照国标 GB/T 23527-2009^[19] 对本研究中的碱性蛋白酶活力进行测定。

1.2.5 数据分析

所有实验均重复至少 3 次, 并且每次设置 3 个平行。采用 Origin 8.5 和 SPSS 18.0 进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 不同功能肽聚糖水解酶氨基酸序列对比

为了进一步确定出发菌株 TCCC111018 Δupp 中不同肽聚糖水解酶的功能, 将 BA Δupp 中的 LytC、LytD、LytE、LytF、LytG 的氨基酸序列与枯草芽胞杆菌中相应的肽聚糖水解酶的氨基酸序列进行对比, 对比结果如表 3 所示。从对比结果可以发现, BA Δupp 中肽聚糖水解酶 LytC、LytD、LytE、LytF、LytG 与枯草芽胞杆菌中相应的肽聚糖水解酶的氨基酸序列相似性极高, 其同一性分别达到了 78.43%、60.80%、65.77%、75.20% 和 68.21%。

2.2 肽聚糖水解酶基因缺失菌株的构建

将不同种类的肽聚糖水解酶 LytC、LytD、LytE、LytF、LytG 为研究目标, 通过同源重组

趋势差异并不显著。当菌株进入衰亡期后,与其他菌株相比,敲除菌株 *BA ΔlytC*、*BA ΔlytE* 的 OD_{600} 值下降速度较为缓慢。在 24–48 h 时, *BA ΔlytC* 的 OD_{600} 值由 1.99 下降至 1.45, 下降了 0.54; *BA ΔlytE* 的 OD_{600} 值由 1.99 下降至 1.37, 下降了 0.62; 而 *BA Δupp* 的 OD_{600} 值由 1.99 下降至 1.28, 下降了 0.71。由此可以发现, *BA ΔlytC*、*BA ΔlytE* 的 OD_{600} 值的下降速率慢于 *BA Δupp*, 这表明 *BA ΔlytC*、*BA ΔlytE* 的菌体自溶速率较 *BA Δupp* 有所减慢。

此外, 还通过平板计数的方法对基因缺失型菌株以及对照菌株的不同时间点的活菌数进行了统计, 发现肽聚糖水解酶缺失菌株 *BA ΔlytC*、

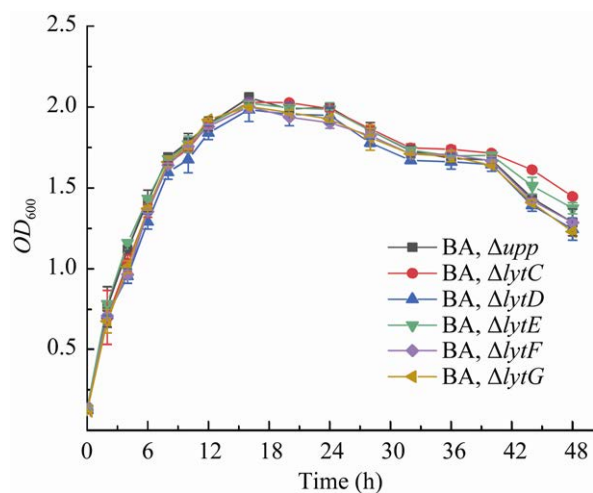


图2 基因敲除菌株及对照菌株生长曲线
Figure 2 Growth curve of knockout strains and control strain.

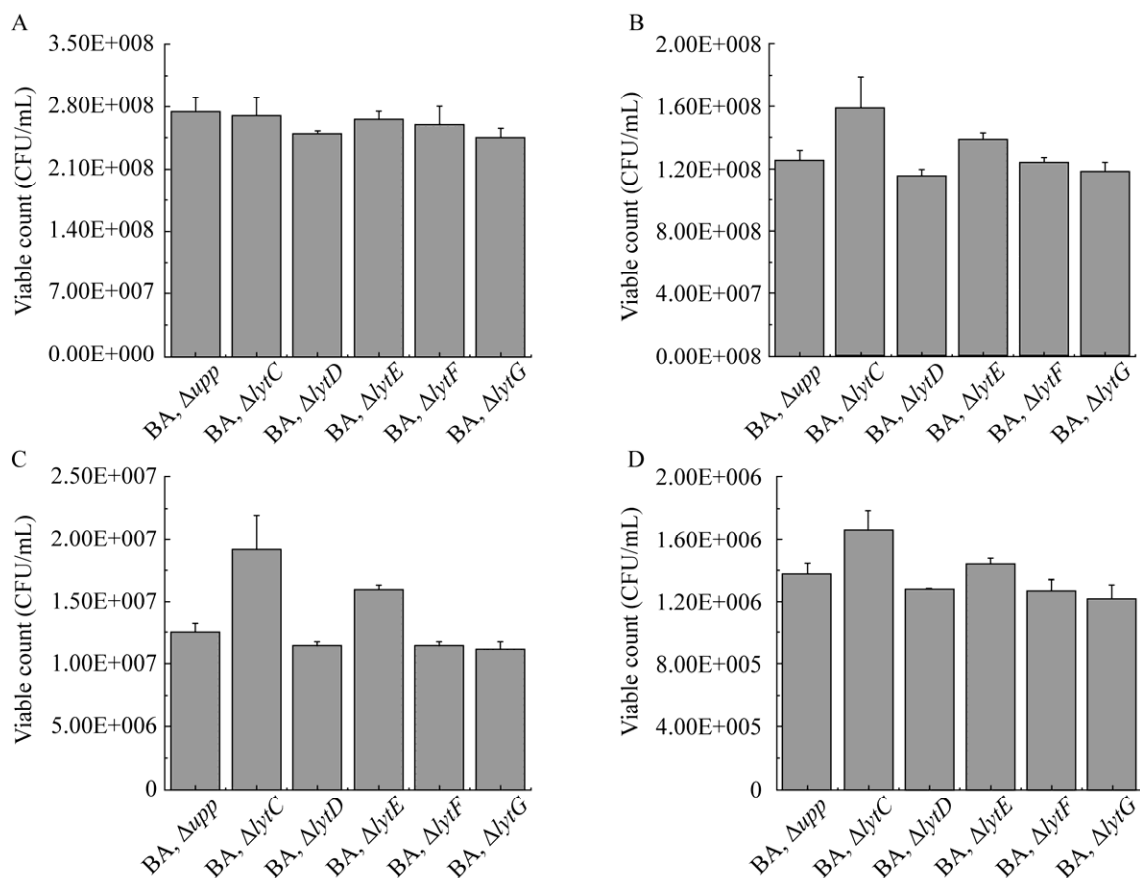


图3 敲除菌株和对照菌株的活菌数

Figure 3 Viable counts of knockout strains and control strain at 24 h (A), 36 h (B), 48 h (C) and 60 h (D).

BA $\Delta lytE$ 在 24 h 后的活菌数超过对照菌株 BA Δupp , 其 24、36、48、60 h 的活菌数统计结果如图 3 所示; 24 h 时敲除菌株的活菌数均低于 BA Δupp 的活菌数, 但差异并不显著; 在 36 h 时 BA $\Delta lytC$ 、BA $\Delta lytE$ 的活菌数分别为 1.59×10^8 CFU/mL、 1.39×10^8 CFU/mL, 比 BA Δupp 的活菌数高 26.19% 和 10.31%; 在 48 h 时菌株 BA $\Delta lytC$ 和 BA $\Delta lytE$ 活菌数分别达 1.93×10^7 CFU/mL 和 1.60×10^7 CFU/mL, 比 BA Δupp 的活菌数高 53.17% 和 26.98%; 在 60 h 发酵结束时, BA $\Delta lytC$ 和 BA $\Delta lytE$ 的活菌数为 1.67×10^6 CFU/mL 和 1.44×10^6 CFU/mL, 比 BA Δupp 的活菌数高 32.50% 和 14.30%; 其余基因缺失菌株的活菌数均低于对照菌株, BA $\Delta lytD$ 、BA $\Delta lytF$ 和 BA $\Delta lytG$ 在 60 h 的活菌数分别比 BA Δupp 的活菌数低 7.20%、7.90% 和 11.90%。

通过使用电子显微镜对基因缺失型菌株的细胞形态进行观察发现, 12 h 时 BA $\Delta lytC$ 、BA $\Delta lytD$ 、BA $\Delta lytE$ 、BA $\Delta lytF$ 、BA $\Delta lytG$ 的菌体

形态与对照菌株 BA Δupp 相比无明显变化 (图 4); 48 h 时在显微镜视野中观察到的 BA $\Delta lytC$ 和 BA $\Delta lytE$ 的菌体自溶率明显低于 BA Δupp , 这一结果也与生长曲线中 OD_{600} 的变化趋势相对应 (图 5)。

综合生长曲线、活菌计数以及电子显微镜观察的结果可以发现, 敲除肽聚糖水解酶相关基因对解淀粉芽胞杆菌的生长及生物量产生影响。其中敲除 *lytC*、*lytE* 基因可以有效减缓菌体衰亡期的自溶速率, 提高解淀粉芽胞杆菌的生物量; 敲除 *lytD*、*lytF*、*lytG* 基因并不会使菌体生物量发生明显变化。这一结果在一定程度上表明 *LytC* 对细胞自溶的影响最大^[20-21], 缺失基因 *lytC* 使菌体自溶受到阻碍作用, 细胞自溶减慢, 进而导致菌体的衰退期延迟, 生物量增加, 与前人在枯草芽胞杆菌中构建的 *lytC* 基因缺失菌株生物量大幅增加的结果相对应^[22]。而单独缺失基因 *lytD*、*lytF*、*lytG* 并不会对菌体自溶产生明显的影响^[23]; 而单独缺失基因 *lytE* 使

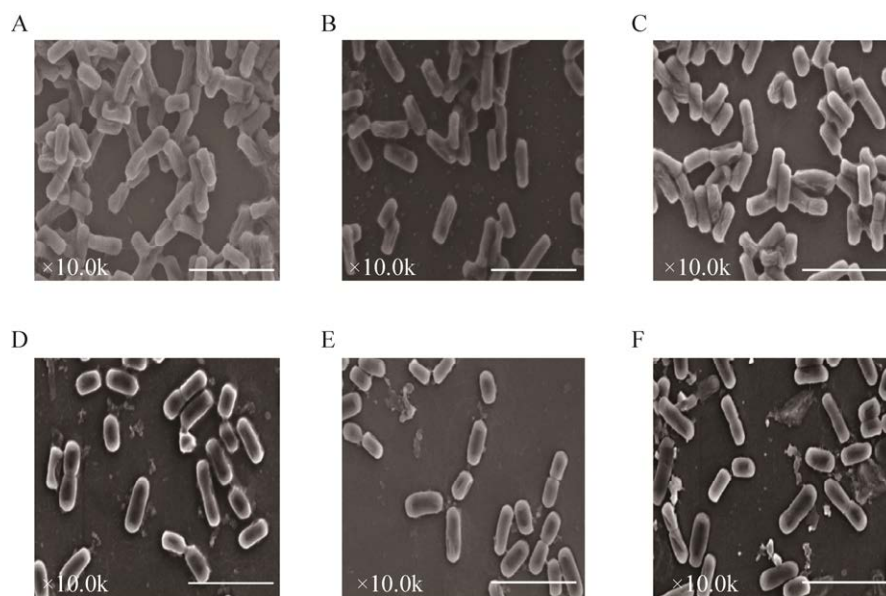


图 4 12 h 肽聚糖水解酶缺失菌株的菌体形态对比

Figure 4 Comparison of the morphology of peptidoglycan hydrolase gene deletion strains at 12 h. (A) BA $\Delta lytC$. (B) BA $\Delta lytD$. (C) BA $\Delta lytE$. (D) BA $\Delta lytF$. (E) BA $\Delta lytG$. (F) BA Δupp . The morphology of the above bacterias were observed using scanning electron microscope with 10 000 times magnification, and the scale bar was 5.00 μ m.

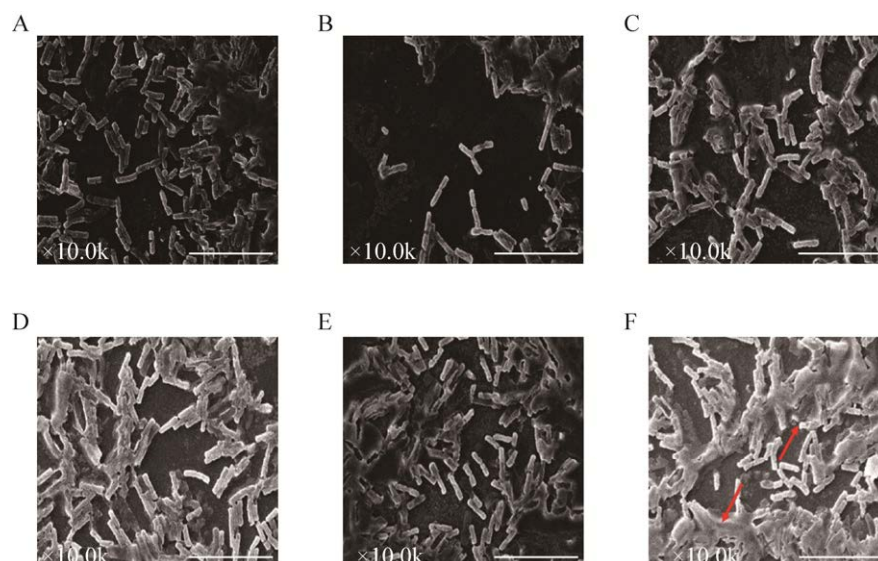


图5 48 h 肽聚糖水解酶缺失菌株的菌体形态对比

Figure 5 Comparison of the morphology of peptidoglycan hydrolase gene deletion strains at 48 h. (A) BA $\Delta lytC$. (B) BA $\Delta lytD$. (C) BA $\Delta lytE$. (D) BA $\Delta lytF$. (E) BA $\Delta lytG$. (F) BA Δupp (The arrow indicates obvious autolysis). The morphology of the above bacteria were observed using scanning electron microscope with 10 000 times magnification, and the scale bar was 5.00 μm .

菌体生物量有所增加则可能是因为 *LytE* 具有辅助 *LytC* 定位的作用^[24-25], 即 *LytE* 的缺失会降低 *LytC* 的效率, 所以基因 *lytE* 的缺失对菌体自溶也具有一定的阻碍作用, 有助于菌体生物量的提升。

2.4 肽聚糖水解酶基因缺失对产碱性蛋白酶的影响

为了验证肽聚糖水解酶基因缺失对胞外蛋白酶的影响, 将携带有碱性蛋白酶基因的 pWH980-*aprE* 质粒电转化至构建好的基因缺失型菌株中进行摇瓶发酵, 并对不同时间点的发酵液上清中的碱性蛋白酶活力进行检测, 结果如图6所示: 从图可以发现所有菌株在 48 h 酶活力达到峰值, 其中 BA $\Delta lytC$ 和 BA $\Delta lytE$ 的酶活力分别达到了 20 264 U/mL、17 265 U/mL, 较 BA Δupp 分别增长了 39.4%、20.2%。在 60 h 发酵末期时, BA $\Delta lytC$ 和 BA $\Delta lytE$ 的酶活力分别为 15 270 U/mL、13 580 U/mL, 较 BA Δupp

分别增长了 43.1%、27.3%。其余菌株碱性蛋白酶活力较 BA Δupp 均有所下降, BA $\Delta lytD$ 、BA $\Delta lytF$ 、BA $\Delta lytG$ 较 BA Δupp 相比分别下降了 6.4%、4.7%、5.4%。

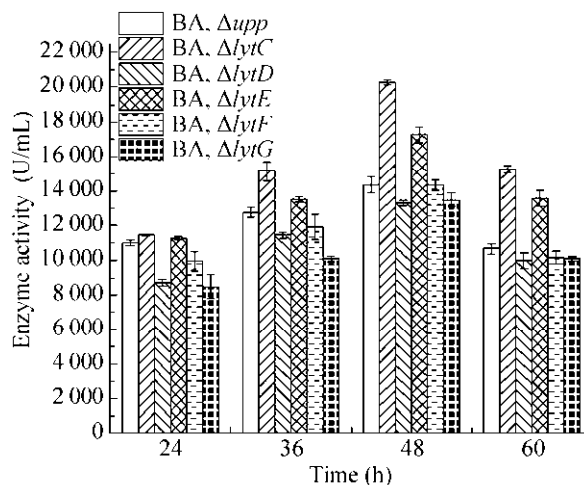


图6 敲除菌株及对照菌株碱性蛋白酶活力测定结果

Figure 6 The alkaline protease activities of the knockout strains and control strain.

对肽聚糖水解酶基因缺失菌株和对照菌株不同时间点的活菌数和碱性蛋白酶酶活力进行相关性分析,结果如表4所示;从表可以发现,在24、36、60 h时基因缺失菌株和对照菌株的活菌数和碱性蛋白酶酶活力极显著正相关,相关性系数分别为0.933、0.922和0.940;48 h时基因缺失菌株和对照菌株的活菌数和碱性蛋白酶酶活力显著正相关,相关性系数为0.865。这在一定程度上表明敲除 *lytC*、*lytE* 基因可以提高菌体生物量,进而有助于提高胞外蛋白酶的产量。本实验结果也与前人通过构建基因 *lytC* 的枯草芽孢杆菌的缺失菌株而使其淀粉酶酶活力大幅提高相印证^[26]。除了生物量对蛋白酶产量的影响外,由于肽聚糖水解酶的缺失,导致肽聚糖降解速率下降,进而降低了肽聚糖的合成速率,原本用于肽聚糖合成的碳源和能量就有可能用于其他的代谢过程,这其中就有胞外蛋白的合成,这也可能是 *BA ΔlytC* 和 *BA ΔlytE* 的碱性蛋白酶酶活力提高的一个原因^[27-28]。此外,还有实验证明肽聚糖水解酶可以通过水解肽聚糖,直接或者间接地影响着细胞蛋白的分泌以及蛋白复合体的装配,某些肽聚糖水解酶的水解功能能够通过水解细菌细胞壁中的肽聚糖网络来促进蛋白的分泌^[12,22],肽聚糖水解酶

表4 敲除菌株和对照菌株的不同时间点的活菌数及碱性蛋白酶酶活力相关性分析结果

Table 4 Correlation analysis between the viable cell counts and alkaline protease activity of the knockout strains and the control strain at different sampling time

Time (h)	Correlation coefficient between the number of viable bacteria and enzyme activity
24	0.933**
36	0.922**
48	0.865*
60	0.940**

Note: ** Significant at $P<0.01$; * Significant at $P<0.05$.

还可通过影响细胞间的信号传递来影响蛋白的合成及分泌^[29-30],这也可能是肽聚糖水解酶基因缺失菌株碱性蛋白酶酶活力变化的原因。

3 结论

本研究通过同源重组的原理构建了解淀粉芽孢杆菌 TCCC111018 的5种肽聚糖水解酶基因缺失菌株 *BA ΔlytC*、*BA ΔlytD*、*BA ΔlytE*、*BA ΔlytF*、*BA ΔlytG*。*BA ΔlytC* 和 *BA ΔlytE* 在60 h的菌体活菌数较对照菌株 *BA Δupp* 增长了32.5%、14.3%,其碱性蛋白酶的酶活力分别较对照菌株增长了43.1%、27.3%,*BA ΔlytD*、*BA ΔlytF*、*BA ΔlytG*的生物量以及碱性蛋白酶的酶活力与对照菌株相比无明显变化。*BA ΔlytC* 和 *BA ΔlytE* 的成功构建为高产工业宿主菌的构建奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 王世伟,王卿惠.解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究进展.生物技术通报,2020,36(1):150-159.
Wang SW, Wang QH. Research advances in functional mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens*. Biotechnol Bull, 2020, 36(1): 150-159 (in Chinese).
- [2] 邓鑫,刘潇逸,汤尼,等.一种中温淀粉酶在解淀粉芽孢杆菌 LT 的重组表达.食品工业科技,2018,39(23):117-122.
Deng X, Liu XY, Tang N, et al. Recombinant expression of a medium-temperature amylase production in *Bacillus amyloliquefaciens* LT. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(23): 117-122 (in Chinese).
- [3] Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. Microbiology (Reading), 2000, 146 (Pt 2): 249-262.
- [4] van Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011, 75(4): 636-663.

- [5] Wyckoff TJ, Taylor JA, Salama NR. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases. *Trends Microbiol*, 2012, 20(11): 540-547.
- [6] 王丹丹, 郭淑元. 芽胞杆菌肽聚糖水解酶的功能研究进展. *生物技术通报*, 2015, 31(2): 45-52.
- Wang DD, Guo SY. Research development of functions of peptidoglycan hydrolase produced by *Bacillus*. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(2): 45-52 (in Chinese).
- [7] Chodiseti PK, Reddy M. Peptidoglycan hydrolase of an unusual cross-link cleavage specificity contributes to bacterial cell wall synthesis. *PNAS*, 2019, 116(16): 7825-7830.
- [8] Vollmer W. Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases. *Mol Microbiol*, 2012, 86(5): 1031-1035.
- [9] Chen XM, Gao TT, Peng Q, et al. Novel cell wall hydrolase CwlC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(7): e02640-17.
- [10] 王轶. 通过自溶相关基因的敲除提高枯草芽胞杆菌的产量[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
- Wang Y. The improvement of *Bacillus subtilis* production by knocking-out lysis related genes[D]. Wuhan: Wuhan University, 2014 (in Chinese).
- [11] Horsburgh GJ, Atrih A, Williamson MP, et al. LytG of *Bacillus subtilis* is a novel peptidoglycan hydrolase: the major active glucosaminidase. *Biochemistry*, 2003, 42(2): 257-264.
- [12] Blackman SA, Smith TJ, Foster SJ. The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology (Reading)*, 1998, 144 (Pt 1): 73-82.
- [13] Zhao L, Ye J, Fu J, et al. Engineering peptidoglycan degradation related genes of *Bacillus subtilis* for better fermentation processes. *Bioresour Technol*, 2018, 248(pt a): 238-247.
- [14] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning. Laboratory Manual*. Third Edition ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] 叶棋浓. 现代分子生物学技术及实验技巧. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- Ye QN. *Modern Molecular Biology Techniques and Experimental Techniques*. Beijing: Chemical Industry Press, 2015 (in Chinese).
- [16] Zhou C, Liu H, Yuan F, et al. Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122: 329-337.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国国家标准: 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验 GB 4789.35-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, National Medical Products Administration of the People's Republic of China. National Standard (Mandatory) of the People's Republic of China: Food microbiology inspection Lactic acid bacteria inspection. GB 4789.35-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [18] 胡春辉, 徐青, 孙璇, 等. 几种典型扫描电镜生物样本制备. *湖北农业科学*, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402.
- Hu CH, Xu Q, Sun X, et al. Several biological typical samples preparation methods of scanning electron microscope. *Hubei Agric Sci*, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402 (in Chinese).
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国推荐性国家标准: 蛋白酶制剂 GB/T 23527-2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. National Standard (Recommended) of the People's Republic of China: Proteinase preparations. GB/T 23527-2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [20] Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, et al. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology (Reading)*, 2009, 155(Pt 7): 2223-2234.
- [21] Baidya AK, Rosenshine I, Ben-Yehuda S. Donor-delivered cell wall hydrolases facilitate nanotube penetration into recipient bacteria. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1938.
- [22] Wang Y, Chen Z, Zhao R, et al. Deleting multiple lytic

- genes enhances biomass yield and production of recombinant proteins by *Bacillus subtilis*. Microb Cell Fact, 2014, 13: 129.
- [23] Berg KH, Ohnstad HS, Håvarstein LS. LytF, a novel competence-regulated murein hydrolase in the genus *Streptococcus*. J Bacteriol, 2012, 194(3): 627-635.
- [24] Liu TY, Chu SH, Shaw GC. Deletion of the cell wall peptidoglycan hydrolase gene *cwlO* or *lytE* severely impairs transformation efficiency in *Bacillus subtilis*. J Gen Appl Microbiol, 2018, 64(3): 139-144.
- [25] Margot P, Karamata D. The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. Microbiology (Reading), 1996, 142(Pt 12): 3437-3444.
- [26] Kabisch J, Thürmer A, Hübel T, et al. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host. J Biotechnol, 2013, 163(2): 97-104.
- [27] Jiang XR, Wang H, Shen R, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. Metab Eng, 2015, 29: 227-237.
- [28] Chen GQ, Jiang XR. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. Synth Syst Biotechnol, 2017, 2(3): 192-197.
- [29] Levnikov VM, Blagova EV, McFeat A, et al. Structure of components of an intercellular channel complex in sporulating *Bacillus subtilis*. PNAS, 2012, 109(14): 5441-5445.
- [30] Rodrigues CD, Marquis KA, Meisner J, et al. Peptidoglycan hydrolysis is required for assembly and activity of the transenvelope secretion complex during sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2013, 89(6): 1039-1052.

(本文责编 郝丽芳)