

## • 工业生物技术 •

# 基于表达元件和宿主优化促地衣芽胞杆菌高效表达 L-天冬酰胺酶

杨新愿, 饶忆, 张梦茜, 王佳琪, 刘文渊, 蔡冬波, 陈守文\*

湖北大学生命科学学院 湖北省环境微生物工程技术研究中心 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

杨新愿, 饶忆, 张梦茜, 王佳琪, 刘文渊, 蔡冬波, 陈守文. 基于表达元件和宿主优化促地衣芽胞杆菌高效表达 L-天冬酰胺酶[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1096-1106.

YANG Xinyuan, RAO Yi, ZHANG Mengxi, WANG Jiaqi, LIU Wenyuan, CAI Dongbo, CHEN Shouwen. Efficient production of L-asparaginase in *Bacillus licheniformis* by optimizing expression elements and host[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1096-1106.

**摘 要:** L-天冬酰胺酶(L-asparaginase, L-ASN)广泛用于恶性肿瘤治疗及低丙烯酰胺食品生产, 然而其较低的表达水平限制了应用推广。异源蛋白表达是提高目标酶表达水平的有效策略, 芽胞杆菌广泛用于酶蛋白的高效生产, 本研究拟通过表达元件及宿主优化提高芽胞杆菌(*Bacillus*)中 L-天冬酰胺酶产量。首先, 筛选了 5 种信号肽(SP<sub>SacC</sub>、SP<sub>AmyL</sub>、SP<sub>AprE</sub>、SP<sub>YwbN</sub>、SP<sub>WapA</sub>)用于 L-天冬酰胺酶的分泌表达, 其中 SP<sub>SacC</sub> 介导下 L-天冬酰胺酶分泌效果最好, 酶活达到 157.61 U/mL。随后, 选取了 4 种芽胞杆菌强启动子(P43、P<sub>ykzA-P43</sub>、P<sub>Ubay</sub>、P<sub>bacA</sub>), 其中串联启动子 P<sub>ykzA-P43</sub> 介导的 L-天冬酰胺酶表达量最高, 较对照菌株提高了 52.94%。最后, 筛选了 3 种芽胞杆菌表达宿主: 地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) Δ0F3 和 BL10、枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*) WB800, 其中, 地衣芽胞杆菌 BL10 作为宿主时, L-天冬酰胺酶酶活最高, 达到了 438.3 U/mL, 较对照菌株提高了 81.83%, 为目前报道的 L-天冬酰胺酶摇瓶酶活最高水平。综上所述, 本研究成功构建了一株高产 L-天冬酰胺酶的地衣芽胞杆菌工程菌株 BL10/P<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ, 为 L-天冬酰胺酶工业化生产奠定了基础。  
**关键词:** L-天冬酰胺酶; 地衣芽胞杆菌; 信号肽; 启动子; 表达宿主

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100200).

\*Corresponding author. Tel: +86-27-88666081, E-mail: chenshouwen@hubu.edu.cn

Received: 2022-08-14; Accepted: 2022-11-15; Published online: 2022-11-24

# Efficient production of L-asparaginase in *Bacillus licheniformis* by optimizing expression elements and host

YANG Xinyuan, RAO Yi, ZHANG Mengxi, WANG Jiaqi, LIU Wenyuan, CAI Dongbo, CHEN Shouwen\*

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

**Abstract:** L-asparaginase (L-ASN) is widely applied in the treatment of malignant tumor and low-acrylamide food production, however, the low expression level hampers its application. Heterologous expression is an effective strategy to increase the expression level of target enzymes, and *Bacillus* is generally used as the host for efficient production of enzymes. In this study, the expression level of L-asparaginase in *Bacillus* was enhanced through optimization of expression element and host. Firstly, five signal peptides (SP<sub>SacC</sub>, SP<sub>AmyL</sub>, SP<sub>AprE</sub>, SP<sub>YwbN</sub> and SP<sub>WapA</sub>) were screened, among which SP<sub>SacC</sub> showed the best performance, reaching an activity of 157.61 U/mL. Subsequently, four strong promoters (P43, P<sub>ykzA-P43</sub>, P<sub>Ubay</sub> and P<sub>bacA</sub>) from *Bacillus* were screened, and tandem promoter P<sub>ykzA-P43</sub> showed the highest yield of L-asparaginase, which was 52.94% higher than that of control strain. Finally, three *Bacillus* expression hosts (*B. licheniformis* ΔOF3 and BL10, *B. subtilis* WB800) were investigated, and the maximum L-asparaginase activity, 438.3 U/mL, was reached by *B. licheniformis* BL10, which was an 81.83% increase compared with that of the control. This is also the highest level of L-asparaginase in shake flask reported to date. Taken together, this study constructed a *B. licheniformis* strain BL10/P<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ capable of efficiently producing L-asparaginase, which laid the foundation for industrial production of L-asparaginase.

**Keywords:** L-asparaginase; *Bacillus licheniformis*; signal peptide; promoter; expression host

L-天冬酰胺酶(L-asparaginase, L-ASN)可催化 L-天冬酰胺水解生成 L-天冬氨酸和氨<sup>[1]</sup>, 因而可降解血液中天冬酰胺, 达到抑制肿瘤细胞生长的作用, 在儿童急性白血病、淋巴瘤等疾病的临床治疗中具有重要研究与应用价值。此外, 天冬酰胺可通过多种途径合成丙烯酰胺, 而 L-ASN 可通过催化天冬酰胺水解从而降低食品中丙烯酰胺含量。因此, L-ASN 在医药、食品安全等方面具有重要应用价值<sup>[2]</sup>。L-ASN 来源广泛, 可来源于细菌、真菌、植物、动物, 其中来源于细菌和真菌的 L-ASN 研究报道较多<sup>[1,3]</sup>。然而, L-ASN 发酵生产酶活较低, 限制了其应

用推广。

目前, L-ASN 的异源表达主要以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为宿主。其中, 以大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主表达 L-ASN, 摇瓶水平酶活达到 17.39 U/mL<sup>[4]</sup>。Ferrara 等利用 *P. pastoris* 表达 L-ASN, 结合发酵工艺优化, L-ASN 酶活达到 85.6 U/mL<sup>[5]</sup>。Feng 等通过信号肽筛选、N 端氨基酸删除、启动子优化等策略, 实现 *B. subtilis* 168 来源的 L-ASN 在 *B. subtilis* WB600 中高效表达, 摇瓶水平酶活达到 102.41 U/mL<sup>[6]</sup>。

近年来,随着合成生物学和代谢工程育种技术的不断发展,越来越多的表达元件设计优化和代谢工程育种思路被用于微生物异源蛋白的高效表达。Degering 等构建了 *B. subtilis* 和 *B. licheniformis* 信号肽文库,筛选得到了多个可显著提高枯草芽胞杆菌蛋白酶(*Bacillus protease novo type*, BPN')分泌水平的信号肽<sup>[7]</sup>。Zhang 等通过设计优化启动子,获得了可显著提高  $\beta$ -环糊精糖苷转移酶和普鲁兰酶表达水平的串联启动子 PHpaII-PamyQ<sup>[8]</sup>。Wei 等通过构建胞外蛋白酶缺失菌株地衣芽胞杆菌 BL10,使得纳豆激酶酶活提高了 39%<sup>[9]</sup>。由此可见,优化表达元件和宿主是提高目的蛋白产量的有效策略。

地衣芽胞杆菌是公认的生物安全菌株,具有蛋白分泌能力强、发酵周期短等优点,是优良的异源蛋白表达宿主,目前已实现了多种酶蛋白( $\alpha$ -淀粉酶、戊聚糖酶、 $\beta$ -甘露聚糖酶、纳豆激酶等)的高效生产。本研究选用地衣芽胞杆菌  $\Delta$ 0F3 为出发菌株,通过筛选信号肽、启动子及表达宿主,构建高效表达 L-ASN 的地衣芽胞杆菌菌株,为 L-ASN 工业化生产奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所用到的质粒和菌株见表 1,相关引物见表 2。

#### 1.1.2 酶和试剂

*Pfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Protein Marker (Broad)、DNA 分子量标准 Marker (DL 5000 Marker)购自 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒购自武汉伊曼生

物科技有限公司;蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖购自 Spanish 公司;抗生素(Kan、Tet)、L-天冬酰胺及蛋白胶配制所需试剂购自 Sigma 公司;玉米浆购自绿康生化股份有限公司,其他主要生化试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母提取物 5、氯化钠 10, pH 7.2, LB 固体培养基另加 1.5% 琼脂粉。

L-ASN 发酵培养基(g/L):葡萄糖 20、蛋白胨 20、玉米浆 10、酵母提取物 10、氯化钠 10、磷酸氢二钾 3、硫酸铵 6, pH 7.2。

## 1.2 方法

### 1.2.1 天冬酰胺酶表达载体的构建

以 L-ASN 表达载体 pP43-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 构建为例,首先设计引物扩增来源于枯草芽胞杆菌 168 来源的 P43 启动子、SP<sub>SacC</sub> 信号肽和 L-ASN 基因 *ansZ* 及地衣芽胞杆菌 WX-02 来源的淀粉酶基因 *amyL* 的终止子 TamyL,再通过重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)得到 P43-SP<sub>SacC</sub>-ansZ-TamyL 表达框,将其和质粒 pHY300PLK 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,并用 T4 DNA 连接酶进行酶连反应,酶连产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。通过菌落 PCR 验证、抽提质粒并测序。若测序成功,即得到游离表达载体 pP43-SP<sub>SacC</sub>-ansZ。

### 1.2.2 信号肽/启动子筛选重组工程菌株的构建

不同信号肽介导的 L-ASN 表达载体构建:选取 5 种不同信号肽,分别是来源于地衣芽胞杆菌 WX-02 的淀粉酶信号肽 SP<sub>AmyL</sub>,来源于枯草芽胞杆菌 168 的果聚糖酶信号肽 SP<sub>SacC</sub>、淀粉酶信号肽 SP<sub>AmyL</sub>、细胞壁合成相关 tRNA 核酸酶前体信号肽 SP<sub>WapA</sub>、双精氨酸易位底物信号肽 SP<sub>YwbN</sub>。根据 1.2.1 所述方法进行不同信号肽介导的 L-ASN 表达载体构建,构建流程见图 1。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Lab collection
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>B. subtilis</i> VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient <i>B. subtilis</i> ( <i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>epr</i> , <i>bpr</i> , <i>mpr::ble</i> , <i>nprB::bsr</i> , <i>vpr</i> , <i>wprA::hyg</i> )	Lab collection
<i>B. licheniformis</i> $\Delta$ 0F3	DW2 ( $\Delta$ <i>spo0F</i> , $\Delta$ <i>aprE</i> , $\Delta$ <i>bprA</i> , $\Delta$ <i>pgs</i> )	Lab collection
<i>B. licheniformis</i> BL10	WX-02 ( $\Delta$ <i>mpr</i> , $\Delta$ <i>vpr</i> , $\Delta$ <i>aprX</i> , $\Delta$ <i>epr</i> , $\Delta$ <i>bpr</i> , $\Delta$ <i>wprA</i> , $\Delta$ <i>aprE</i> , $\Delta$ <i>bprA</i> , $\Delta$ <i>hag</i> , $\Delta$ <i>amyL</i> )	Lab collection
$\Delta$ 0F3/pP43-SP <sub>AmyL</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP43-SP <sub>AmyL</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP43-SP <sub>AprE</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP43-SP <sub>AprE</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP43-SP <sub>SacC</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP43-SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP43-SP <sub>WapA</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP43-SP <sub>WapA</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP43-SP <sub>YwbN</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP43-SP <sub>YwbN</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pPU <sub>bay</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pPU <sub>bay</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP <sub>bacA</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP <sub>bacA</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
$\Delta$ 0F3/pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	$\Delta$ 0F3 containing plasmid pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
BL10/pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	BL10 containing plasmid pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
WB800/pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	WB800 containing plasmid pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	This study
Plasmids		
pP43-SP <sub>AmyL</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P43 promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of AmyL and <i>amyL</i> terminator	This study
pP43-SP <sub>AprE</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P43 promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of AprE and <i>amyL</i> terminator	This study
pP43-SP <sub>SacC</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P43 promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of SacC and <i>amyL</i> terminator	This study
pP43-SP <sub>WapA</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P43 promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of WapA and <i>amyL</i> terminator	This study
pP43-SP <sub>YwbN</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P43 promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of YwbN and <i>amyL</i> terminator	This study
pPU <sub>bay</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring PU <sub>bay</sub> promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of SacC and <i>amyL</i> terminator	This study
pP <sub>bacA</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P <sub>bacA</sub> promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of SacC and <i>amyL</i> terminator	This study
pP <sub>ykzA-P43</sub> -SP <sub>SacC</sub> -ansZ	pHY300PLK harboring P <sub>ykzA-P43</sub> promoter, gene <i>ansZ</i> , signal peptide of SacC and <i>amyL</i> terminator	This study

不同启动子介导的 L-ASN 表达载体构建：选取 4 种常用于芽胞杆菌基因表达的强启动子，分别是来源于地衣芽胞杆菌 DW2 的杆菌肽合成酶基因簇 *bacABC* 启动子 P<sub>bacA</sub>，来源于枯

草芽胞杆菌 168 中 P43 启动子，本课题组饶忆等构建的杂合启动子 PU<sub>bay</sub><sup>[10]</sup>及串联启动子 P<sub>ykzA-P43</sub><sup>[11]</sup>。根据 1.2.1 所述方法进行不同启动子介导的 L-ASN 表达载体构建。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
P43-F	<b>CGGGAATTCT</b> GATAGGTGGTATGTTTTCG
P43-R	GTGTACATTCCTCTCTTACC
ansZ-F	TCTGAAAAAAGGATCTG
ansZ-R	<u>TCCGTCCTCTCTGCTCTT</u> CAATACTCATTGAAATAAGC
TamyL-F	AAGAGCAGAGAGGACGGATT
TamyL-R	<b>GCTCTAGAC</b> GCAATAATGCCGTCGCACTG
pHY-F	CAGATTTCGTGATGCTTGTC
pHY-R	GTTTATTATCCATACCCTTAC
SP <sub>AmyL</sub> -F	<u>GGTAAGAGAGGAATGTACAC</u> ATGAAACAACACAAACGG
SP <sub>AmyL</sub> -R	<u>CAGATCCTTTTTTTCAGACG</u> CCGCTGCTGCAGAGTG
SP <sub>AprE</sub> -F	<u>GGTAAGAGAGGAATGTACAC</u> ATGATGAGGAAAAAGAGT
SP <sub>AprE</sub> -R	<u>CAGATCCTTTTTTTCAGA</u> AGCAGAAGCGGAATCGCTG
SP <sub>SacC</sub> -F	<u>GGTAAGAGAGGAATGTACAC</u> ATGAAAAAGAGACTGATTC
SP <sub>SacC</sub> -R	<u>CAGATCCTTTTTTTCAGAT</u> GCATCTGCCGAAAATGCC
SP <sub>WapA</sub> -F	<u>GGTAAGAGAGGAATGTACAC</u> ATGAAAAAAGAAAGAGGC
SP <sub>WapA</sub> -R	<u>CAGATCCTTTTTTTCAGAT</u> GCTAGTACATCGGCTGG
SP <sub>YwbN</sub> -F	<u>GGTAAGAGAGGAATGTACAC</u> ATGAGCGATGAACAGAAAAAG
SP <sub>YwbN</sub> -R	<u>CAGATCCTTTTTTTCAGA</u> AGCCGCAGTCTGAACAAG
PU <sub>bay</sub> -F	<b>CGGGAATTCC</b> CTGCGATTTCGGCGAGATTC
PU <sub>bay</sub> -R	<u>GAATCAGTCTCTTTTTCAT</u> ACAAATCTCCCCCTTTGTTG
P <sub>bacA</sub> -F	<b>CGGAATTCC</b> CTGCGATTTCGGCGAGATTC
P <sub>bacA</sub> -R	<u>GAATCAGTCTCTTTTTCAT</u> ATAAAAATTCTCCTTTTTG
P <sub>yzkA-P43</sub> -F	<b>CGGGAATTCC</b> GAAATATTGATGTGACAC
P <sub>yzkA-P43</sub> -R	<u>GAATCAGTCTCTTTTTCAT</u> TGATCCTTCCTCCTTTAG

Bold indicates the restriction enzyme site, and underlined is the repetitive sequence for SOE-PCR.

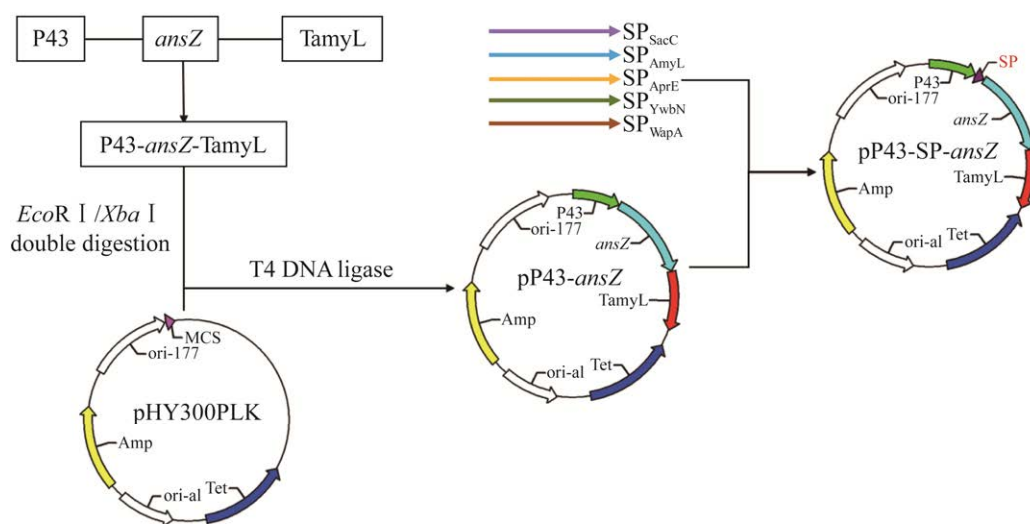


图 1 不同信号肽介导的 L-ASN 表达载体构建流程

Figure 1 Construction of L-ASN expression vectors mediated by different signal peptides.

将上述构建成功的 L-ASN 表达载体电转入地衣芽胞杆菌  $\Delta$ 0F3 中, 分别得到不同启动子、信号肽介导的 L-ASN 表达菌株。

### 1.2.3 L-ASN 在地衣芽胞杆菌中表达

将含有 L-ASN 表达载体的地衣芽胞杆菌在 LB 平板(20 mg/L 四环抗生素)上活化, 37 °C 培养 12–16 h。挑取单菌落于含有 5 mL 液体 LB (20 mg/L 四环抗生素)的 PA 瓶中, 37 °C、230 r/min 过夜培养。将培养好菌液转接于含有 50 mL 液体 LB (20 mg/L 四环抗生素)的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、230 r/min 培养至  $OD_{600} \approx 4$ , 按照 3% 接种量将种子液转至含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、230 r/min 培养 48 h。

### 1.2.4 L-ASN 酶活检测

采用纳氏试剂显色法计量测定酶促反应产生的氨气含量, 进而检测 L-ASN 酶活<sup>[2]</sup>。首先绘制得到氯化铵标准曲线(图 2), 再配置酶反应体系[900  $\mu$ L  $KH_2PO_4$ - $K_2HPO_4$  (20 mmol/L, pH 7.5)、200  $\mu$ L L-天冬酰胺(189 mmol/L)、100  $\mu$ L 酶液]进行酶促反应, 37 °C 反应 10 min。随后加入 100  $\mu$ L 三氯乙酸(1.5 mmol/L)终止反应, 10 000 r/min 离心 10 min。随后进行显色反应, 取 100  $\mu$ L 反应液, 加入 3.4 mL 去离子水和 500  $\mu$ L 纳氏试剂(碘化汞法配制), 混匀后静置 10 min, 于 420 nm 处检测吸光值。

L-ASN 单位酶活(U)定义: 37 °C 条件下 1 min 水解 L-天冬酰胺释放 1  $\mu$ mol  $NH_3$  所需要的酶量。

### 1.2.5 基因转录水平分析

基因转录水平分析方法参照本课题组已报道的方法<sup>[11]</sup>。其中采用 TRIzol 提取总 RNA, DNase I 消化痕量 DNA, 采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo)扩增得到 cDNA。表达载体 pHY300PLK 上的四环素抗性基因 *Tet* 作为参考基因。将重组菌株中基因 *ansZ* 的转录水平与参考基因 *Tet* 标准化后进行

比较, 以 P43 启动子介导的基因 *ansZ* 转录水平作为对照。

### 1.3 统计分析

所有实验均重复 3 次, 每个数据均设置 3 个平行, 采用 Origin 2018 和 SPSS 18.0 进行数据处理和分析, 其中, \*:  $P < 0.05$  表示差异显著, \*\*:  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 信号肽筛选对 L-ASN 表达的影响

信号肽作为一种引导蛋白分泌的表达元件, 在目标蛋白高效生产中发挥重要作用, 信号肽筛选也是提高蛋白分泌表达水平的有效策略。L-ASN 自身信号肽是脂蛋白质信号肽, 其并不分泌到细胞膜外<sup>[2]</sup>。为提高 L-ASN 分泌水平, 本研究首先构建了 5 种信号肽(SP<sub>SacC</sub>、SP<sub>AmyL</sub>、SP<sub>AprE</sub>、SP<sub>YwbN</sub>、SP<sub>WapA</sub>)介导的 L-ASN 表达载体, 并将其电转至地衣芽胞杆菌  $\Delta$ 0F3 中, 得到 L-ASN 表达菌株, 分别命名为  $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>SacC</sub>-*ansZ*、 $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>AmyL</sub>-*ansZ*、 $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>AprE</sub>-*ansZ*、 $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>YwbN</sub>-*ansZ* 和  $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>WapA</sub>-*ansZ*。

将已成功构建的不同信号肽介导的 L-ASN 表达菌株进行摇瓶发酵, 并根据 1.2.4 中所述方法进行酶活测定。由图 2A 可知, 5 种信号肽介导下的 L-ASN 酶活各不相同, 其酶活水平依次为: SP<sub>SacC</sub> > SP<sub>WapA</sub> > SP<sub>AprE</sub> > SP<sub>AmyL</sub> > SP<sub>YwbN</sub>, 其中 SP<sub>SacC</sub> 信号肽介导的天冬酰胺酶酶活最高, 达到 157.61 U/mL。与此同时, SDS-PAGE 电泳检测的结果与酶活数据一致(图 2B)。此外, 分别检测了菌株  $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>AmyL</sub>-*ansZ*、 $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>SacC</sub>-*ansZ* 和  $\Delta$ 0F3/pP43-SP<sub>AprE</sub>-*ansZ* 胞内总蛋白(图 2C)。结果表明, 虽然 3 种信号肽介导下 L-ASN 的分泌量各有不同, 其胞内蛋白表达情况基本相同。通过对胞内 L-ASN 酶活检测发现,

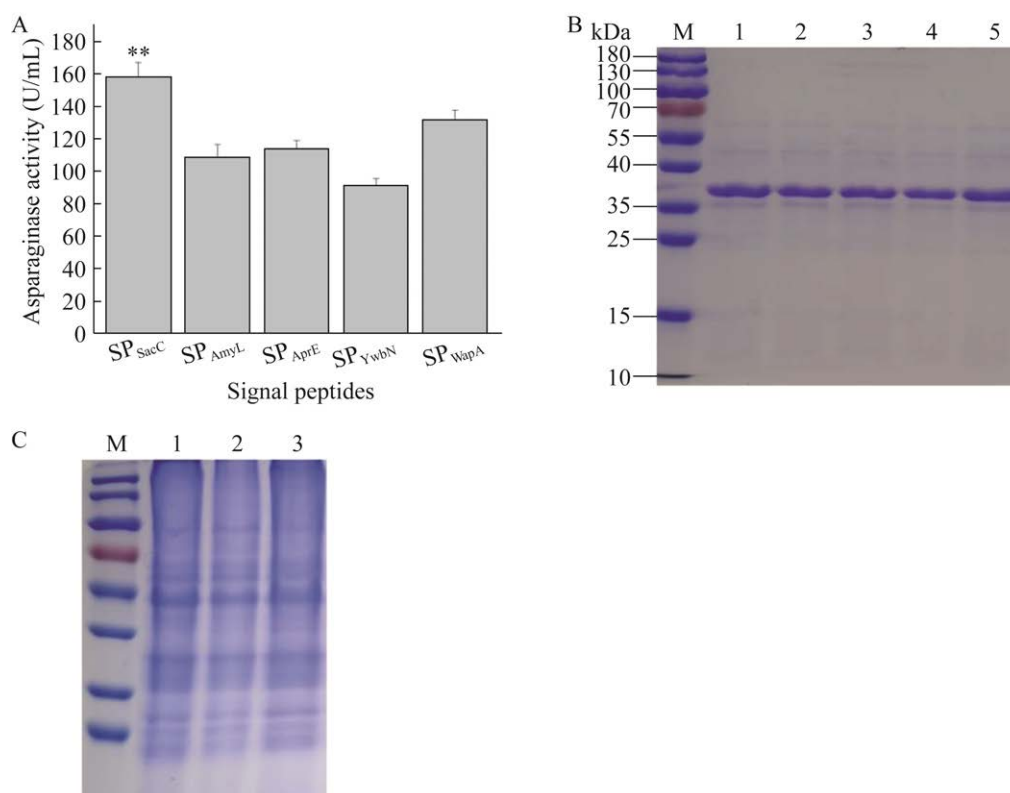


图2 不同信号肽对天冬酰胺酶表达的影响

Figure 2 Effects of different signal peptides on L-ASN production. A: L-ASN activity.  $**P<0.01$ . B: SDS-PAGE of extracellular proteins. Lane 1:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$ ; Lane 2:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{AmyL}\text{-}ansZ$ ; Lane 3:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{AprE}\text{-}ansZ$ ; Lane 4:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{YwbN}\text{-}ansZ$ ; Lane 5:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{WapA}\text{-}ansZ$ ; M: Protein marker. C: SDS-PAGE of intracellular proteins. Lane 1:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{AmyL}\text{-}ansZ$ ; Lane 2:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$ ; Lane 3:  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{AprE}\text{-}ansZ$ ; M: Protein marker.

不同菌株中 L-ASN 酶活也基本相同。之前关于抗生素、氨基酸等产物高产的代谢工程育种研究中,人们发现代谢物转运子的强化表达能够促进目的产物的高效合成<sup>[12-13]</sup>。因此,信号肽筛选优化在促进蛋白分泌的同时,也有利于目标蛋白的合成。

## 2.2 启动子筛选对 L-ASN 表达的影响

启动子在目的基因转录中发挥重要作用,启动子强度直接影响目的蛋白表达水平。在信号肽筛选的基础上,选取了 4 种启动子 P43、P<sub>ykzA-P43</sub>、P<sub>Ubay</sub>、P<sub>bacA</sub>,分别构建了不同启动子介导的 L-ASN 表达载体,并电转至地衣芽胞杆菌  $\Delta 0F3$  中,重组菌株分别命名为  $\Delta 0F3/pP43\text{-}$

$SP_{SacC}\text{-}ansZ$ 、 $\Delta 0F3/pP_{ykzA-P43}\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$ 、 $\Delta 0F3/pP_{Ubay}\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$  和  $\Delta 0F3/pP_{bacA}\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$ 。

将已成功构建的不同启动子介导的 L-ASN 表达菌株进行摇瓶发酵,并根据 1.2.4 中所述方法进行酶活检测。由图 3A 可知,不同启动子介导的 L-ASN 酶活水平依次为: P<sub>ykzA-P43</sub>>P<sub>Ubay</sub>>P<sub>bacA</sub>>P43,其中 P<sub>ykzA-P43</sub> 介导的 L-ASN 酶活最高,达到 241.06 U/mL,相比于对照菌株  $\Delta 0F3/P43\text{-}SP_{SacC}\text{-}ansZ$  提高了 52.94%。此外,转录水平实验表明,串联启动子 P<sub>ykzA-P43</sub> 介导的基因 *ansZ* 转录水平无论是对数期(16 h)还是在稳定期(36 h)都高于其他菌株(图 3B),说明串联启动子能够提高发酵过程 *ansZ* 转录水平,进而提高 L-ASN 酶活。

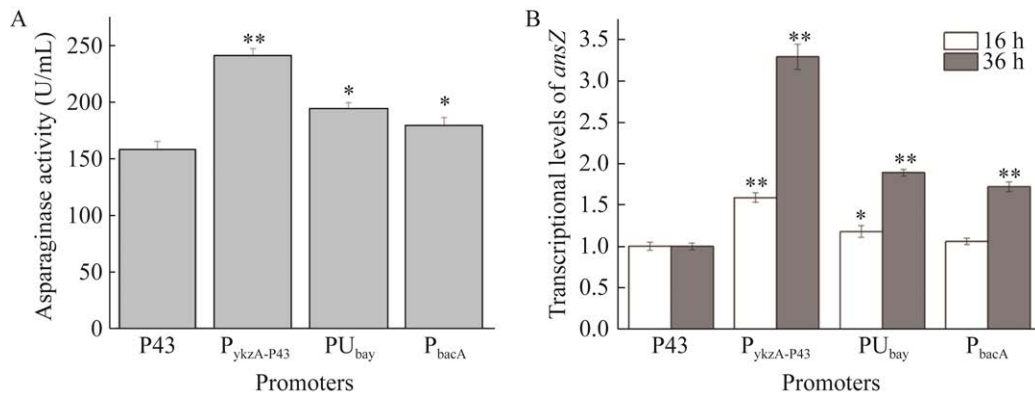


图3 不同启动子对 L-ASN 表达的影响

Figure 3 Effects of different promoters on L-ASN production. A: L-ASN activity. B: Transcriptional levels of gene *ansZ*. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

### 2.3 宿主菌筛选

为进一步提高 L-ASN 表达水平, 筛选了本课题组常用的 3 种蛋白表达宿主菌: 地衣芽胞杆菌  $\Delta 0F3$ 、地衣芽胞杆菌 BL10 和枯草芽胞杆菌 WB800, 并将 L-ASN 表达载体 pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 电转化至 3 种表达宿主中, 获得菌株分别命名为 BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ、 $\Delta 0F3$ /pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ、WB800/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ。

将已成功构建的 3 种 L-ASN 表达菌株进行摇瓶发酵。图 4 结果表明, 不同蛋白酶缺失菌株的 L-ASN 表达水平有明显差异, 酶活水平依次为: BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ >  $\Delta 0F3$ /pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ > WB800/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ, 地衣芽胞杆菌 BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 的酶活最高, 达到 438.3 U/mL。

同时, 对 L-ASN 高产菌株 BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 和对照菌株  $\Delta 0F3$ /pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 的发酵过程进行分析(图 5)。菌株 BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 在整个发酵周期中的菌体生长状况和酶活均优于对照菌株, 最高生物量较对照菌株提高了 26.88%, 最高酶活较对照菌株提高了 81.83%。此外, 高产菌株的单位菌体酶活在整

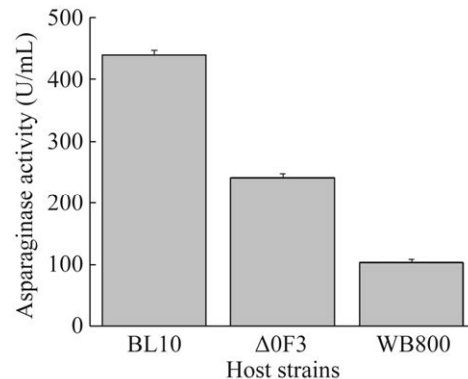


图4 不同宿主菌对 L-ASN 表达的影响

Figure 4 Effects of different host strains on L-ASN production.

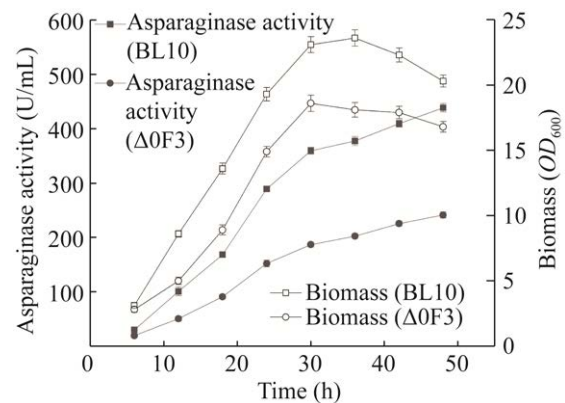


图5 菌株  $\Delta 0F3$ /pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 和 BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ 的发酵过程曲线

Figure 5 Fermentation curves of strains  $\Delta 0F3$ /pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ and BL10/pP<sub>ykzA-P43</sub>-SP<sub>SacC</sub>-ansZ.



个发酵周期中明显高于对照菌株, 发酵终点 BL10/ $P_{\text{yKzA-P43}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-ansZ}$  单位菌体酶活较对照菌株提高了 50.47%。由此可见, 地衣芽胞杆菌 BL10 作为表达宿主时, 在提高发酵过程生物量的同时, 也提高了单位菌体 L-ASN 酶活, 进而有利于 L-ASN 高效合成。

### 3 讨论

L-ASN 可催化 L-天冬酰胺的水解反应, 因此在医疗、食品健康等领域受到人们广泛关注, 目前 L-ASN 较低的表达水平限制了其进一步应用推广。本研究通过优化信号肽与启动子, 并结合宿主菌筛选, 获得了一株高产 L-ASN 的工程菌株 BL10/ $pP_{\text{yKzA-P43}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-asnZ}$ , 其最高酶活可达 438.3 U/mL, 是目前已报道的 L-ASN 摇瓶水平最高酶活的 2.77 倍, 是芽胞杆菌中 L-ASN 摇瓶水平最高酶活的 3.91 倍(表 3)。本研究证实了表达元件和宿主优化是提高蛋白表达水平的有效策略, 地衣芽胞杆菌 BL10 可以作为异源蛋白表达的优良宿主, 并提供了一株具有工业应用潜力的 L-ASN 生产菌株。

表达元件优化是提高蛋白表达水平的常用策略。本研究选取 5 种信号肽( $\text{SP}_{\text{SacC}}$ 、 $\text{SP}_{\text{AmyL}}$ 、 $\text{SP}_{\text{AprE}}$ 、 $\text{SP}_{\text{YwbN}}$ 、 $\text{SP}_{\text{WapA}}$ )用于 L-ASN 的分泌表达。之前的研究报道指出,  $\text{SP}_{\text{SacC}}$ <sup>[9]</sup>和  $\text{SP}_{\text{WapA}}$ <sup>[14]</sup>可高效介导纳豆激酶在地衣芽胞杆菌中的分泌表达,  $\text{SP}_{\text{AmyL}}$ 可显著提高  $\alpha$ -淀粉酶分泌水平<sup>[15]</sup>,

$\text{AprE}$  是地衣芽胞杆菌中分泌量最大的胞外蛋白酶<sup>[16]</sup>,  $\text{SP}_{\text{YwbN}}$  可介导枯草芽胞杆菌蛋白酶和地衣芽胞杆菌淀粉酶的高效分泌<sup>[17]</sup>。本研究结果表明, 枯草芽胞杆菌 168 中果聚糖酶  $\text{SacC}$  的信号肽  $\text{SP}_{\text{SacC}}$  更适宜于 L-ASN 的分泌表达, 相比于其他 4 种信号肽( $\text{SP}_{\text{AmyL}}$ 、 $\text{SP}_{\text{AprE}}$ 、 $\text{SP}_{\text{YwbN}}$  和  $\text{SP}_{\text{WapA}}$ ), 菌株  $\Delta\text{OF3}/pP43\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-ansZ}$  酶活分别提高了 45.52%、38.40%、74.45%和 19.99%。而通过  $\text{SP}_{\text{SacC}}$  氨基酸序列分析(MKKRLIQVMIMFTLLLTMAFSADA), 发现其 N 端带正电荷数量和 H 端疏水性也符合芽胞杆菌信号肽优化的一般规律<sup>[18]</sup>, 这可能正是  $\text{SP}_{\text{SacC}}$  适宜于芽胞杆菌中异源蛋白高效分泌的原因之一。此外, 串联启动子  $P_{\text{yKzA-P43}}$  是本课题组饶忆等<sup>[11]</sup>将  $\sigma^B$  型启动子  $P_{\text{yKzA}}$  与 P43 串联得到的强启动子, 之前的研究中该启动子使得  $\alpha$ -淀粉酶酶活提高了 1.85 倍。本研究得出串联启动子  $P_{\text{yKzA-P43}}$  介导下  $\text{ansZ}$  的转录水平在对数期和稳定期均有所提高, 本课题组关于其他酶蛋白(碱性蛋白酶、角蛋白酶等)表达实验也证实, 串联启动子  $P_{\text{yKzA-P43}}$  是地衣芽胞杆菌中异源蛋白表达的优良启动子。

芽胞杆菌是蛋白分泌表达的优良宿主, 本研究选取了地衣芽胞杆菌 BL10<sup>[9]</sup>、地衣芽胞杆菌  $\Delta\text{OF3}$ <sup>[19]</sup>及枯草芽胞杆菌 WB800<sup>[20]</sup>用来研究不同宿主对 L-ASN 表达的影响。结果表明, 地衣芽胞杆菌 BL10 作为宿主时, L-ASN 酶活最高, 达到 438.3 U/mL, 分别是另外两种宿主(地

表 3 摇瓶条件下不同微生物中 L-ASN 酶活水平

Table 3 L-ASN produced by different microorganisms in shake flask

Sources	Host strains	Enzyme activities (U/mL)	References
<i>E. coli</i> YG 002	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	17.4	[4]
<i>Nocardiopsis alba</i> NIOT-VKMA08	<i>E. coli</i> M15	158.1	[21]
<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> WB600	102.4	[6]
<i>P. carotovorum</i> MTCC 1428	<i>B. subtilis</i> WB800	105.0	[22]
<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> WB600	112.2	[2]

衣芽胞杆菌  $\Delta$ 0F3、枯草芽胞杆菌 WB800)的 1.81 倍和 4.23 倍。本课题组之前研究表明,地衣芽胞杆菌 BL10 能够显著提高纳豆激酶的表达水平,酶活较对照提高了 39%<sup>[9]</sup>。本研究证实了地衣芽胞杆菌 BL10 可以作为一种具有工业应用潜力的芽胞杆菌表达宿主。

## REFERENCES

- [1] COSTA IM, SCHULTZ L, de ARAUJO BIANCHI PEDRA B, LEITE MSM, FARSKY SHP, de OLIVEIRA MA, PESSOA A, MONTEIRO G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36239.
- [2] 冯岳. *Bacillus subtilis* 天冬酰胺酶高效表达与分子改造[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2018.  
FENG Y. High-efficiency expression and molecular modification of *Bacillus subtilis* L-asparaginase[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [3] EISELE N, LINKE DA, BITZER K, NA'AMNIEH S, NIMTZ M, BERGER RG. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3316-3321.
- [4] GHOSHON MB, BERENJIAN A, HEMMATI S, DABBAGH F, KARIMI Z, NEGAHDARIPOUR M, GHASEMI Y. Extracellular production of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*: medium optimization using response surface methodology[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2015, 21(4): 487-495.
- [5] FERRARA MA, SEVERINO NMB, MANSURE JJ, MARTINS AS, OLIVEIRA EMM, SIANI AC, PEREIRA N Jr, TORRES FAG, BON EPS. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(7): 1457-1463.
- [6] FENG Y, LIU S, JIAO Y, GAO H, WANG M, DU GC, CHEN J. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(4): 1509-1520.
- [7] DEGERING C, EGGERT T, PULS M, BONGAERTS J, EVERS S, MAURER KH, JAEGER KE. Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6370-6376.
- [8] ZHANG K, SU LQ, DUAN XG, LIU LN, WU J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-15.
- [9] WEI XT, ZHOU YH, CHEN JB, CAI DB, WANG D, QI GF, CHEN SW. Efficient expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis*: host strain construction and signal peptide optimization[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42(2): 287-295.
- [10] RAO Y, LI PF, XIE XX, LI JM, LIAO YQ, MA X, CAI DB, CHEN SW. Construction and characterization of a gradient strength promoter library for fine-tuned gene expression in *Bacillus licheniformis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(9): 2331-2339.
- [11] RAO Y, CAI DB, WANG H, XU YX, XIONG SJ, GAO L, XIONG M, WANG Z, CHEN SW, MA X. Construction and application of a dual promoter system for efficient protein production and metabolic pathway enhancement in *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 312: 1-10.
- [12] QIU JF, ZHUO Y, ZHU DQ, ZHOU XF, ZHANG LX, BAI LQ, DENG ZX. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(2): 337-345.
- [13] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. Bioresource Technol, 2017, 245: 1588-1602.
- [14] 何孝天, 刘中美, 崔文璟, 周哲敏. 介导纳豆激酶分泌表达的信号肽比较[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 62-68.  
HE XT, LIU ZM, CUI WJ, ZHOU ZM. Comparison of signal peptides for nattokinase secretory expression[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 62-68 (in Chinese).
- [15] CHEN JQ, FU G, GAI YM, ZHENG P, ZHANG DW, WEN JP. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic

- gene overexpression[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-15.
- [16] 饶忆, 师璐, 王豪, 熊世颀, 蔡冬波, 陈守文, 李顺意. 通过优化表达元件及培养基组分提高地衣芽胞杆菌中碱性丝氨酸蛋白酶产量[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1327-1335.
- RAO Y, SHI L, WANG H, XIONG SJ, CAI DB, CHEN SW, LI SY. Enhancement production of subtilisin in *Bacillus licheniformis* by screening promoters and signal peptides and optimization of fermentation medium[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1327-1335 (in Chinese).
- [17] KOLKMAN MAB, van der PLOEG R, BERTELS M, van DIJK M, van der LAAN J, van DIJL JM, FERRARI E. The twin-arginine signal peptide of *Bacillus subtilis* YwbN can direct either tat- or sec-dependent secretion of different cargo proteins: secretion of active subtilisin via the *B. subtilis* tat pathway[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(24): 7507-7513.
- [18] LOW KO, MUHAMMAD MAHADI N, MD ILLIAS R. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(9): 3811-3826.
- [19] CAI D, WEI X, QIU Y, CHEN Y, CHEN J, WEN Z, CHEN S. High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 704-712.
- [20] NGUYEN TT, QUYEN TD, LE HT. Cloning and enhancing production of a detergent- and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 1-11.
- [21] MEENA B, ANBURAJAN L, VINITHKUMAR NV, SHRIDHAR D, RAGHAVAN RV, DHARANI G, KIRUBAGARAN R. Molecular expression of L-asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: a prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy[J]. *Gene*, 2016, 590(2): 220-226.
- [22] CHITYALA S, VENKATA DASU V, AHMAD J, PRAKASHAM RS. High yield expression of novel glutaminase free L-asparaginase II of *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in *Bacillus subtilis* WB800N[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(11): 2271-2284.

(本文责编 郝丽芳)