

分类号：Q81

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2220520121

碱性蛋白酶 AprEbl 的热稳定性改造及高效表达
Thermal Stability Modification and High-efficiency
Expression of Alkaline Protease AprEbl

学生姓名：罗雅妮

指导教师：刘艳 教授

专 业：生物与医药

研究方向：生物技术与工程

论文答辩日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：罗雅妮

日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：

罗雅妮

指导教师签名：

马乾

日期： 2025 年 5 月 15 日

日期： 2025 年 5 月 15 日

碱性蛋白酶 AprEbl 的热稳定性改造及高效表达

摘 要

碱性蛋白酶作为一类重要的工业用酶，在洗涤剂、皮革制造、食品加工等众多领域均有广泛且深入的应用。它能够有效分解蛋白质，助力各行业提升生产效能与产品质量。然而，其在实际应用中常面临热稳定性不足以及表达量受限的问题，极大地制约了生产效率与应用范围。提升碱性蛋白酶的热稳定性并实现高效表达，对拓展其工业应用、降低生产成本具有关键意义。

本文利用氯化锂和常压室温等离子体（ARTP）诱变对野生产酶菌株 B66 进行复合诱变，成功获得一株产酶量显著提升的地衣芽孢杆菌（B66-1）。结合计算机技术对主要产酶基因 AprEbl 进行定点突变，以获得热稳定性提升的优质蛋白酶，并将其异源表达在更为安全的宿主枯草芽孢杆菌 168 蛋白酶 E 缺陷型中，再对枯草芽孢杆菌中的转录因子进行组合调控，进一步提升碱性蛋白酶 AprEbl 的表达量。

（1）本文以野生产酶优势菌株 B66 为出发菌株，采用 LiCl-ARTP 复合诱变技术，利用牛奶平板初筛和福林-酚试剂法复筛，最终得到一株碱性蛋白酶高产菌株地衣芽孢杆菌（B66-1），所产碱性蛋白酶活力为： 801.21 ± 1.37 U/mL，比诱变前提高 77.51%，但热稳定性没有明显提升。

(2) 鉴于野生型菌株的局限性, 将 B66-1 的碱性蛋白酶序列 AprEbl 序列在枯草芽孢杆菌中进行异源表达, 并命名为 BS-A。同时对 AprEbl 同源建模后进行分子动力学模拟, 结合 RMSF 值及虚拟饱和突变的结果对目的基因进行定点突变, 成功构建了七株突变菌株, 其中单点突变体 N183W、G186I、S265H、S267F、Y320W, 双突变体 N183W/G186I, S265H/S267F, 分别命名为 BS01、BS02、BS03、BS04、BS05、BS06、BS07, 以半衰期为评判指标, 最终 BS07 在比活力和野生型基本持平的情况下, 热稳定性大幅提升, 在 55°C 达到 148.81 min, 是野生型的 7.35 倍。75°C 下半衰期为 27.28 min, 是野生型的 5.01 倍。

(3) 为了提升优质蛋白酶的表达量, 进一步利用枯草芽孢杆菌代谢过程中的关键转录因子对碱性蛋白酶表达量进行调控。通过同源重组对 3 个激活因子进行过表达, 对 3 个抑制因子进行敲除, 根据酶活测定分析, 过表达激活因子 *degU* 和 *phrG* 对 AprEbl 的表达量有着显著的作用, 结合上述结果, 构建重组菌株 BS07-03A, BS07-03D, BS07-06A, BS07-06D, BS07-036A, BS07-036D, BS07-03AD, BS07-06AD, BS07-036AD 探究多因子协同效应对碱性蛋白酶产量的变化, 最终得到 BS07-036D 表现最为突出, 酶活高达 1561.74 U/mL, 相较于初始菌株 BS07 提升了 239.78%, 实现了耐热碱性蛋白酶的高效表达。

本研究通过物理-化学复合诱变、计算机辅助酶设计与合成生物学调控策略的协同应用, 实现了碱性蛋白酶的热稳定性强化与高效异

源表达,为工业酶制剂的理性改造与规模化生产提供了理论依据与技术支持。

关键词：碱性蛋白酶, LiCl-ARTP 复合诱变, 理性设计, 分子动力学模拟, 枯草芽孢杆菌, 合成生物学

THERMAL STABILITY MODIFICATION AND HIGH-EFFICIENCY EXPRESSION OF ALKALINE PROTEASE APREBL

ABSTRACT

Alkaline protease, as an important industrial enzyme, has extensive and in-depth applications in various fields such as detergents, leather manufacturing, and food processing. It can effectively break down proteins, helping industries enhance production efficiency and product quality. However, in practical applications, it often faces issues of insufficient thermal stability and limited expression levels, which greatly restricts production efficiency and application scope. Improving the thermal stability of alkaline protease and achieving efficient expression are of crucial significance for expanding its industrial applications and reducing production costs.

This study employed a combined mutagenesis approach using lithium chloride and atmospheric room-temperature plasma (ARTP) to mutate the wild-type enzyme-producing strain B66, successfully obtaining *Bacillus licheniformis* (B66-1) with significantly enhanced enzyme production. The main enzyme-producing gene AprEbl was

subjected to site-directed mutagenesis using computer technology to obtain a high-quality protease with improved thermal stability, and it was heterologously expressed in the safer host *Bacillus subtilis* 168 protease E-deficient strain. The transcription factors in *Bacillus subtilis* were then combinatorially regulated to further increase the expression level of alkaline protease AprEbl.

(1) Using the wild-type enzyme-producing strain B66 as the starting strain, a combined mutagenesis technique of LiCl-ARTP was employed. After initial screening on milk plates and re-screening with the Folin-Phenol reagent, a high-yield strain of *Bacillus licheniformis* (B66-1) was obtained. The activity of the alkaline protease produced was 801.21 ± 1.37 U/mL, a 77.51% increase compared to the pre-mutagenesis level, but there was no significant improvement in thermal stability.

(2) Given the limitations of the wild-type strain, the AprEbl sequence of B66-1 was heterologously expressed in *Bacillus subtilis* and named BS-A. Molecular dynamics simulation was conducted after homology modeling of AprEbl, and site-directed mutagenesis was performed based on the RMSF values and results of virtual saturation mutagenesis. Seven mutant strains were successfully constructed, including single mutants N183W, G186I, S265H, S267F, Y320W, and double mutants N183W/G186I, S265H/S267F, named BS01, BS02, BS03, BS04, BS05, BS06, and BS07, respectively. Using half-life as the

evaluation criterion, BS07 showed a significant improvement in thermal stability while maintaining a specific activity comparable to the wild type. At 55 °C the half-life reached 148.81 min, which was 7.35 times that of the wild type. At 75 °C, the half-life was 27.28 min, which was 5.01 times that of the wild type.

(3) To enhance the expression level of the high-quality protease, the expression of alkaline protease was further regulated by key transcription factors in the metabolic process of *Bacillus subtilis*. Three activators were overexpressed and three inhibitors were knocked out through homologous recombination. Based on the enzyme activity determination analysis, overexpression of the activators *degU* and *phrG* had a significant effect on the expression of AprEbl. Combining the above results, recombinant strains BS07-03A, BS07-03D, BS07-06A, BS07-06D, BS07-036A, BS07-036D, BS07-03AD, BS07-06AD and BS07-036AD were constructed to explore the synergistic effect of multiple factors on the production of alkaline protease. Ultimately, BS07-036D performed the most prominently, with an enzyme activity of 1561.74 U/mL, a 239.78% increase compared to the initial strain BS07, achieving efficient expression of heat-resistant alkaline protease. This study achieved the thermal stability enhancement and efficient heterologous expression of alkaline protease through the synergistic application of physical-chemical composite mutagenesis, computer-aided enzyme design and synthetic

biology regulation strategies, providing theoretical basis and technical support for the rational modification and large-scale production of industrial enzyme preparations.

KEY WORDS: Alkaline Protease, LiCl-ARTP Combined Mutagenesis, Rational Design, Molecular Dynamics Simulation, *Bacillus subtilis*, Synthetic Biology

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
目 录	VIII
第 1 章 绪论	1
1.1 碱性蛋白酶的概述	1
1.1.1 碱性蛋白酶的简介	1
1.1.2 碱性蛋白酶的来源	1
1.1.3 碱性蛋白酶在工业上的应用	2
1.2 碱性蛋白酶的酶学性质改造	4
1.2.1 酶活性改造	4
1.2.2 酶稳定性改造	5
1.2.3 催化效率改造	6
1.3 枯草芽孢杆菌表达系统	7
1.3.1 枯草芽孢杆菌表达策略	7
1.3.2 枯草芽孢杆菌表达优势	8
1.4 本课题的研究意义与内容	8
1.4.1 立题依据和研究意义	8
1.4.2 主要研究内容	9
第 2 章 复合诱变选育蛋白酶高产菌株	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 实验菌株	11
2.1.2 实验仪器	12
2.1.3 实验试剂	12
2.1.4 培养基及溶液	13
2.2 实验方法	13

2.2.1 菌种的活化及生长曲线的测定	13
2.2.2 酶活标准曲线的制作	14
2.2.3 酶活力的测定	14
2.2.4 LiCl 预处理	15
2.2.5 ARTP 诱变选育	15
2.2.6 初筛与复筛	15
2.2.7 稳定性验证	15
2.3 实验结果	16
2.3.1 生长曲线的测定	16
2.3.2 菌株存活率及正突变率的测定	16
2.3.3 复合诱变的初筛结果	17
2.3.4 复合诱变的复筛结果	18
2.3.5 热稳定性及遗传稳定性验证	19
2.4 本章小结	20
第 3 章 基于理性设计提高蛋白酶 AprEbl 的热稳定性	21
3.1 实验材料	21
3.1.1 菌株与质粒	21
3.1.2 试剂与仪器	22
3.1.3 培养基及溶液	22
3.2 实验方法	23
3.2.1 AprEbl 的同源建模及 MD 分析	23
3.2.2 重组质粒及突变体的构建	23
3.2.3 野生型及突变体酶的表达与纯化	25
3.2.4 AprEbl 及突变体活性及比活力的测定	26
3.2.5 pH 和温度对 AprEbl 及其突变体的影响	26
3.3 实验结果	27
3.3.1 AprEbl 的序列分析及建模	27
3.3.2 AprEbl 突变体的预测与筛选	28
3.3.3 AprEbl 突变体的构建与表达	29

3.3.4 AprEbl 及其突变体的活力与比活力	30
3.3.5 单点突变体的酶学性质研究	31
3.3.6 复合突变体的酶学性质研究	32
3.3.7 突变体的热稳定性及半衰期	33
3.3.8 突变体酶分子结构变化分析	34
3.4 本章小结	36
第 4 章 整合表达提升碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的表达	37
4.1 实验材料	37
4.1.1 菌株和质粒	37
4.1.2 主要试剂及仪器	38
4.1.3 培养基及溶液	39
4.2 实验方法	40
4.2.1 枯草芽孢杆菌的活化、生长曲线以及感受态的制备	40
4.2.2 枯草芽孢杆菌全基因组与质粒的抽提	40
4.2.3 重组菌株（敲除和过表达）的构建	40
4.2.4 氯霉素抗性的祛除	46
4.2.5 荧光强度的测定	46
4.2.6 摇瓶发酵及酶活测定	47
4.3 实验结果	47
4.3.1 AprEbl 过表达菌株的构建	47
4.3.2 过表达菌株的构建	47
4.3.3 敲除菌株的构建	49
4.3.4 工程菌株的酶活测定及分析	50
4.3.5 整合表达及酶活测定	52
4.4 本章小结	53
第 5 章 结论与展望	55
5.1 结论	55
5.2 展望	56
参考文献	57

攻读学位期间发表的学术论文目录	64
致 谢	65

第 1 章 绪论

1.1 碱性蛋白酶的概述

1.1.1 碱性蛋白酶的简介

碱性蛋白酶是一类最适作用 pH 为 9-11 的蛋白水解酶,可在碱性条件下高效催化蛋白质肽键的断裂反应^[1]。其催化性质如下:在 pH 6-10 范围内保持稳定,低于 6 或高于 11 时会迅速失活。从催化特性来看,这类蛋白酶不仅能够高效水解肽键,还能够对酰胺键和酯键具有裂解作用,同时可催化转肽和转酯反应。金属离子 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对其有激活作用,而金属螯合剂 EDTA、重金属离子以及巯基试剂对其活性无明显影响^[2, 3]。因其具有优秀的酶学性质及零污染的环保属性,成为工业生产中备受青睐的酶制剂产品,包括但不限于在清洁剂、皮革加工、食品加工(如酪乳生产)以及生物医药领域^[4-6]。

1.1.2 碱性蛋白酶的来源

碱性蛋白酶来源广泛,植物根茎、动物肝脏及众多微生物如细菌和真菌中都可以获取^[7]。

(1) 微生物来源

细菌:芽孢杆菌是碱性蛋白酶的主要细菌来源^[8]。例如枯草芽孢杆菌^[9] (*Bacillus subtilis*),它能够大量分泌碱性蛋白酶,这种酶具有良好的稳定性和较高的活性。嗜碱芽孢杆菌^[10] (*Bacillus alcalophilus*)也是重要的产生菌,其生长环境特殊,所产碱性蛋白酶能适应高碱环境。

真菌:曲霉属 (*Aspergillus*) 中的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 是碱性蛋白酶的真菌来源代表^[11]。米曲霉产生的碱性蛋白酶在食品工业中有较多应用,如酱油酿造过程中发挥蛋白质水解作用^[12]。此外,链霉菌 (*Streptomyces*) 等放线菌也能产生碱性蛋白酶,在特定的发酵条件下可以获得较高产量^[13]。

(2) 植物来源

在植物的种子和块茎等部位存在碱性蛋白酶。例如，番木瓜果实中的木瓜蛋白酶（Papain）虽然在中性或微酸性环境能发挥作用，但在碱性条件下同样具有活性，并且木瓜蛋白酶在肉类嫩化等方面有很广泛的应用^[14]。此外，菠萝果实中的菠萝蛋白酶（Bromelain）在碱性环境下也能对蛋白质进行水解，在食品加工和医药领域有一定用途^[15]。

(3) 动物来源

动物的胰脏是碱性蛋白酶的重要来源之一^[16]。胰蛋白酶（Trypsin）是一种典型的动物碱性蛋白酶，在动物的消化过程中发挥关键作用，它能够将蛋白质分解为小分子肽和氨基酸，便于肠道吸收。

1.1.3 碱性蛋白酶在工业上的应用

(1) 洗涤剂工业^[17, 18]

碱性蛋白酶是洗涤剂中的关键成分之一。它能够高效地分解各类蛋白质污渍，像日常生活中常见的血渍、奶渍、汗渍以及蛋渍等^[19]。其作用机制是通过将大分子蛋白质污渍降解为可溶性更强的小分子肽和氨基酸，使得污渍更容易在洗涤过程中被去除，从而显著增强了洗涤剂的去污能力^[20]。

加酶洗涤剂由于添加了碱性蛋白酶，还多了环保节能的优势。借助酶的高效催化作用，可降低配方中表面活性剂及助洗剂的用量，从而减轻洗涤剂对环境的污染，并且在一定程度上能够节省生产成本^[21]。

(2) 皮革工业

在皮革加工的脱毛环节，碱性蛋白酶发挥着重要作用^[22]。它能够特异性地针对皮革中的毛囊蛋白和表皮蛋白（即非胶原蛋白）进行分解，使毛发与皮革顺利分离，实现脱毛的目的。与传统的化学脱毛方法相比，利用碱性蛋白酶脱毛更加环保，因为减少了化学脱毛剂的使用，同时脱毛效率更高，而且对皮革本身质量的不良影响更小^[23]。

对于皮革的软化，碱性蛋白酶也功不可没^[24]。它可以水解皮革中的部分蛋白质纤维，使皮革原本紧密的纤维结构变得松散，从而达到软化皮革的效果。经过酶处理后的皮革，手感更加柔软，柔韧性也得到了提升，皮革的整体品质得到改善，更有利于后续的鞣制、染色等加工工序^[25]。

(3) 食品工业

在肉类加工方面,碱性蛋白酶能够作用于肉类中的胶原蛋白和弹性蛋白等结缔组织,这些结缔组织的存在使得肉类口感较韧,而碱性蛋白酶将其水解后,肉类的纤维结构变得疏松,肉的韧性降低,嫩度提高,大大改善了肉类的口感和品质^[26, 27]。除此以外,它也可以水解植物中的蛋白,生产出多肽、氨基酸等具有特定功能的成分。例如在大豆蛋白加工中^[28],利用碱性蛋白酶水解大豆蛋白,得到的大豆多肽可用于保健品、调味料等多种产品的生产,为食品工业提供了丰富的原料。

碱性蛋白酶还在食品保鲜领域有所应用,它可以通过水解蛋白质,破坏微生物生长繁殖所依赖的营养源,显著抑制腐败微生物的增殖,在维持食品原有品质的同时大幅提升其货架期,保障食品的安全性和稳定性^[29]。

(4) 饲料工业

作为饲料添加剂^[30],碱性蛋白酶能够在动物的胃肠道内发挥作用。将饲料中的蛋白质水解为小分子肽和氨基酸后更利于动物的吸收。通过增强蛋白质的消化吸收效率,从而提高了饲料的利用率,促进动物的生长发育,帮助养殖户降低养殖成本^[31-33]。

饲料原料中往往含有一些抗营养因子^[30],如植酸、单宁、棉酚、蛋白酶抑制因子等,这些物质会影响动物对饲料营养的吸收,甚至导致动物免疫力下降和代谢疾病^[33]。碱性蛋白酶可以降解这些抗营养因子,提高饲料的营养价值和适口性,确保动物健康生长^[34]。

(5) 丝绸工业

在丝绸生产过程中,蚕丝脱胶是一个重要环节^[35]。碱性蛋白酶能够特异性地分解蚕丝表面的丝胶蛋白,而对丝素蛋白基本没有损伤。丝胶蛋白去除后,蚕丝的品质得到显著提升,具有更好的光泽、柔软度和手感,为后续丝绸的加工和制作提供了优质的原料^[36]。

(6) 制药工业

在药物中间体的生产中,碱性蛋白酶可参与特定的酶促反应。例如,在一些涉及蛋白质或多肽的水解、合成等反应中,它可以发挥催化作用,为药物的生产提供关键的中间体化合物,推动药物合成的进程。某些碱性蛋白酶本身就具有药

用价值^[37]，比如胰蛋白酶、弹性蛋白酶等，它们可以用于外科化脓性创口的净化，通过分解创口处的坏死组织和蛋白质，促进伤口愈合；还可以用于治疗胸腔间浆膜粘连等疾病，发挥其生物治疗作用。

1.2 碱性蛋白酶的酶学性质改造

碱性蛋白酶在工业生产中的具有不可替代的作用，但是依赖传统方法从自然筛选从自然界中筛选理想酶的策略效率低下，不仅耗时耗力，且成功率较低。一方面，野生菌株产酶量普遍偏低，需经过多轮诱变和发酵优化；另一方面，自然进化形成的酶分子难以适配极端工业条件（如高温、高碱或有机溶剂环境），导致酶在实际应用中易失活。

随着基因工程技术的成熟，研究者可以从活性中心到整体结构，全方位优化蛋白酶的酶学性质，同时优化表达系统，实现碱性蛋白酶的高效生产。而蛋白质工程技术的发展，尤其是和计算机模拟技术相结合后，可以实现对碱性蛋白酶的定向改造，根据生产需求，精准设计具有理想酶学性质的优势酶，既省时又高效，大幅提升了酶的改造效率。

1.2.1 酶活性改造

就碱性蛋白酶广泛的市场应用来说，进一步提升其活性可以很大程度上提升工业生产效率并降低应用成本。通常情况下，针对微生物来源的碱性蛋白酶活性提升首先以非理性改造为主，常见的是筛选野生高产菌株、诱变及优化发酵条件等。冯菲^[38]从磷矿中分离出一株贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*），其胞外蛋白酶活力达到 562.3 U/mL，最适 pH 值为 10，作为一株碱性蛋白酶高产菌株，其所产的蛋白酶在 pH 7~10 范围内表现出了极好的稳定性。HY Wang^[39]等采用复合诱变策略，通过紫外线、NTG 化学诱变剂（N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍）和钴 60- γ 射线相结合的方式，对短小芽孢杆菌 *B. pumilus* BA06 进行遗传改良，最终获得的突变菌株其产酶活力是野生型的 5 倍。王晓云^[40]通过对枯草芽孢杆菌 BC2 进行多轮紫外诱变，最终筛选获得突变菌株 B38，经检测其蛋白酶活性提升至 86.82 U/mL，相比原始菌株（27.68 U/mL）提高了 3.14 倍。然而基因工程的发展带来了新的可能性，研究者可以通过优化甚至更换表达系统实现酶活性的精准提升，比如异源表达，信号肽优化，敲除竞争性蛋白酶基因，代谢工程调控等。李怡欣^[41]采用宿主-信号肽组合筛选策略，成功将地衣芽孢杆菌碱性蛋白

酶 SubC 在枯草芽孢杆菌系统中表达，经发酵条件优化后，重组菌株 MA08-AmyE-subCopt 的胞外酶活达到 3.33×10^3 AU/mL，较原始信号肽的对照菌株酶活提升 73.4%。Cuixia Zhou^[42]等通过敲除孢子形成关键调控基因（*spo0A*、*sigF* 和 *sigE*），构建了一系列无孢子突变体。其中， $\Delta sigF$ 和 $\Delta sigE$ 突变体在蛋白酶生产中展现出更优异的性能，显著提高了 *aprE* 基因的表达水平。其蛋白酶产量最高达到 $29,494 \pm 1053$ U/mL，比野生型菌株提升了约 19.7%。

值得一提的是，将多种策略有机组合，能够获得催化活性提升更为显著的突变体。Jiahua Bi 等^[43]借助计算机软件，将非天然氨基酸（ncAA）引入嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus thermoleovorans*）中的多模块普鲁兰酶的柔性区域构建硫醚桥键，实验得到 6 个阳性变体，其中突变体 T73 (O2beY)-171C 的半衰期延长、熔解温度提高，T73(O2beY)-171C/T126F/A72R 热稳定性与活性均显著提升。

1.2.2 酶稳定性改造

对于大多数工业用碱性蛋白酶，热稳定性不足是一个普遍存在的关键问题。在皮革脱毛、饲料加工以及丝绸脱胶等工业应用中，碱性蛋白酶常常面临着严苛的温度条件^[44-46]。例如，在皮革脱毛过程中，为了加速反应进程，工艺温度往往会维持在 55 - 65℃，持续数小时；而在一些饲料加工的工业流程里，制粒后温度可能高达 70℃以上，这对碱性蛋白酶的热稳定性提出了极大的挑战。然而，目前市面上广泛使用的大多数碱性蛋白酶属于中温酶，在 55℃下的半衰期（ $t_{1/2}$ ，指酶在某温度下残余酶活达到初始一半的时间）仅有短短几分钟，远远无法满足工业生产长时间、高温环境下的需求。因此，提升碱性蛋白酶的热稳定性同样是重点研究方向之一。

到目前为止，科研人员已经采用了多种方法来提高碱性蛋白酶的热稳定性。主要有基因工程，化学修饰及添加成分调节等。Li Meijie^[47]在大肠杆菌中构建了 lac'-IspSib'-lac 三元系统用于高通量筛选，通过两轮突变对异戊二烯合酶 IspSib 进行定向进化，获得 3 个热稳定性更高的突变体，其中突变体 IspSib^{N397V/A476T} 的蛋白熔解温度（ T_m ）较野生提升了 1.14 倍，且在突变体的作用下异戊二烯产量提高 1.94 倍。Oyama^[48]等通过引入二硫键并在 *Pichia pastoris* 中表达，突变体 mut25 包含 2 个二硫键，表现出更好的热稳定性和低聚集性。金属离子可作为辅因子稳定酶的结构或参与催化，Karray^[49]等从橄榄油厂溶胶中分离出一株嗜热脂

肪芽孢杆菌，其所产的一种新碱性嗜热蛋白酶最适温度为 55°C，当与 Ca^{2+} 和甘露醇共同孵育时，半衰期为 187 min。此外，借助 B 因子（B-factor）分析或者分子动力学（Molecular dynamics, MD）模拟，能够精准确定碱性蛋白酶的高柔性区域（Highly flexible region, HFR），从而大幅减少突变体筛选的工作量。例如，Miao Huabiao^[50] 等通过 B-factor 和多重序列比对，对嗜碱芽孢杆菌中的丝氨酸蛋白酶 PB98 进行突变，最终得到的组合突变体热稳定性较原来相比提升了 4 倍。

1.2.3 催化效率改造

在工业生产的众多环节中，碱性蛋白酶的催化效率也成为制约生产效益与质量的关键因素。较低的催化效率不仅会延长生产周期，还会大幅增加生产成本。例如，在洗涤剂工业中，面对日益增长的高效清洁需求，传统碱性蛋白酶催化效率有限，难以快速分解各类顽固污渍，导致洗涤时间长、效果不佳。此外，在食品加工、医药制造等领域，碱性蛋白酶的催化效率同样影响着产品的产量与品质。因此，提升碱性蛋白酶的催化效率，是满足各行业高效生产需求、增强产品竞争力的迫切要求。

目前针对蛋白酶催化效率的改造，已经出现了多种策略，主要包括活性位点理性设计、辅助因子工程及计算生物学驱动的定向优化等。例如，王馨叶^[51] 通过同源序列比对分析，推测出与催化功能相关的未知位点 D787 和 M621。随后，通过对这两个位点进行饱和突变构建突变文库，从中筛选出催化效率显著提升的突变体 D787C，其比活力达到 550 U/mg，较野生型提高了 50%，且 $K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 值为野生型的 1.8 倍。Jun Zhang^[52] 等针对亚胺还原酶（IREDs）进行改造，解析了 IR-G36 的蛋白质结构后，利用辅因子氢键网络重构策略，显著提高了催化效率和立体选择性，后续通过突变等操作获得的最优突变体 M4，相对于野生型，催化效率提高了 3349 倍。Zhang^[53] 等借助计算机模拟与体外实验结合，对灰色链霉菌蛋白酶 SGT 的 N 端进行了理性设计改造，通过引入多种人工肽段，使 SGT 变体能够通过自激活模式实现分泌表达，且重组 SGT 的效价是原来的 329%。这些研究通过将蛋白质工程与定向进化相结合，为碱性蛋白酶在工业生产中的高效应用奠定了坚实基础。

1.3 枯草芽孢杆菌表达系统

目前在工业生产中,这些酶的生产主要依赖于微生物发酵技术,利用高效的微生物发酵系统来优化产量和活性^[54],特别是芽孢杆菌属生产的碱性蛋白酶具有产量较高、质量稳定和多样性丰富等优点,成为酶制造企业重点研究和开发的对象。而枯草芽孢杆菌表达系统是一种常用的原核表达系统^[55],枯草芽孢杆菌表达系统以枯草芽孢杆菌为宿主菌,利用其自身的基因表达调控机制和蛋白质合成加工系统,实现外源基因的表达。由于其具有清晰的遗传背景,且增殖速率快、生产成本经济高效,能够分泌大量的胞外蛋白,是生产工业酶、抗生素等生物制品的重要工具。

1.3.1 枯草芽孢杆菌表达策略

(1) 强启动子的选择

启动子是控制基因转录起始的关键元件,选择强启动子可以提高外源基因的转录水平。如枯草芽孢杆菌的芽孢杆菌噬菌体 SPO1 的启动子 PspoIIIIG^[56]、枯草芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因启动子 Pamy^[57]等,这些强启动子能够驱动外源基因高效转录。

(2) 外源基因的表达

异源表达可将目标基因从原物种引入异源宿主,绕过物种间生殖隔离,实现跨物种功能元件的重组与功能验证,例如在大肠杆菌中表达人类胰岛素基因^[58]。枯草芽孢杆菌成熟的遗传操作系统(如 CRISPR-Cas9 和稳定整合技术)便于基因改造与菌株保存^[59];高效的蛋白分泌能力可直接将目标产物释放到培养基,大幅简化纯化流程;此外,无内毒素风险可满足食品医药级生产要求^[59]。

(3) 代谢工程的改造

枯草芽孢杆菌利用同源重组技术,将关键代谢基因多拷贝整合至芽孢杆菌基因组稳定位点,或构建高拷贝质粒载体,增加代谢通路中限速酶基因的模板数量,强化相关酶的转录与翻译效率,从而提升目标产物合成速率^[60]。比如通过调控启动子强度,灵活调节代谢途径中基因表达水平,优化代谢网络^[61]。

(4) 基因剂量的调整

提高外源蛋白表达水平的有效措施是增加外源基因的拷贝数^[62]。可通过同源重组技术将多拷贝目的基因整合至枯草芽孢杆菌基因组特定位点,或者构建携带

目的基因的高拷贝质粒表达载体，使细胞内编码目的蛋白的模板数量增加，从而增强重组蛋白的转录和翻译效率提高蛋白产量^[63]。

1.3.2 枯草芽孢杆菌表达优势

(1) 分泌能力强

枯草芽孢杆菌具有高效的分泌系统，能够将大量的重组蛋白直接分泌到细胞外培养基中^[64]，这样有利于目的蛋白的分离和纯化，减少了细胞破碎等后续处理步骤，降低了生产成本。

(2) 遗传操作简便

枯草芽孢杆菌的遗传背景清晰，有成熟的遗传转化方法和基因编辑技术，如电转化、原生质体转化等，方便对其进行基因改造和表达调控，可以很容易地将外源基因导入枯草芽孢杆菌中，并对其进行各种遗传修饰，以满足不同的表达需求。

(3) 安全性高

枯草芽孢杆菌是一种非致病性的革兰氏阳性菌，已被美国食品药品监督管理局（FDA）列为 GRAS（Generally Recognized as Safe）级别，表示其在生产过程中对环境和人体健康无害。因此，它广泛应用于食品、药品等生物制品的生产，具有高度的安全性^[65]。

(4) 发酵工艺成熟

枯草芽孢杆菌的发酵技术已经非常成熟，能够在大规模发酵罐中实现高密度培养，生长速度快，产量高。可以通过优化发酵条件，如温度、pH、溶氧等，实现目标蛋白的高效表达，适合工业化大规模生产。

1.4 本课题的研究意义与内容

1.4.1 立题依据和研究意义

蛋白酶在食品、洗涤剂、皮革等众多工业领域发挥着关键作用。地衣芽孢杆菌作为一种重要的蛋白酶产生菌，其分泌的蛋白酶具有独特的酶学性质，但野生型地衣芽孢杆菌所产蛋白酶活性往往难以满足日益增长的工业需求。诱变技术能够随机诱导地衣芽孢杆菌的基因发生突变，为筛选出高活性蛋白酶突变体提供可能，已在多种微生物酶活性提升中展现出良好效果。

而将诱变获得的高活性蛋白酶基因在枯草芽孢杆菌中进行异源表达具有多方面优势。枯草芽孢杆菌遗传背景清晰、生长迅速、分泌能力强，且被公认为安全的微生物，有着成熟的发酵工艺，是理想的蛋白表达宿主。通过异源表达，有望借助枯草芽孢杆菌的特性实现高活性蛋白酶的大规模生产。

除活性外，蛋白酶的热稳定性是影响其工业应用的关键因素。在高温的工业生产环境中，如饲料制粒、洗涤剂高温洗涤过程，热稳定性差的蛋白酶容易失活，导致产品质量下降或生产效率降低。提升蛋白酶热稳定性则能拓展其在高温条件下的应用范围，增强产品竞争力。

计算机技术在蛋白质工程领域的应用愈发深入。借助分子动力学模拟、量子力学计算等工具，能够在原子层面解析蛋白酶的结构与功能关系，预测不同氨基酸位点突变对蛋白酶热稳定性的影响。这为定点突变提供精准指导，相较于传统盲目突变筛选，大大提高了获得高稳定性蛋白酶突变体的效率，节省时间和成本。

对枯草芽孢杆菌表达系统进行改造，旨在进一步提高蛋白酶的表达量。通过优化启动子、信号肽、密码子等表达元件，调整基因剂量，可深入挖掘枯草芽孢杆菌的表达潜力，能够显著提升蛋白酶的合成效率，提升产物得率的同时降低工业大规模生产的成本。

本研究将诱变育种、异源表达、计算机辅助设计、定点突变以及表达系统改造等多技术融合，旨在从提升酶活性、热稳定性以及表达量多维度优化蛋白酶性能。这不仅有助于深入理解蛋白酶的结构与功能关系，为蛋白质工程改造提供理论依据，还能为工业生产提供性能优良、产量可观的蛋白酶，推动相关产业的技术升级和可持续发展，具有重要的理论意义与实际应用价值。

1.4.2 主要研究内容

(1) 以实验室保藏的地衣芽孢杆菌为出发菌株，采用 LiCl-ARTP 复合诱变体系处理，结合脱脂牛奶平板初筛与福林酚法酶活测定复筛，获得碱性蛋白酶高产突变株 B66-1。将该菌株主要产酶基因 *AprEbl* 基因在枯草芽孢杆菌中异源表达，构建重组菌 BS-A 作为后续研究的出发菌株。

(2) 利用生物信息学对碱性蛋白酶 *AprEbl* 基因进行初步研究分析，以 BS-A 为出发菌株探究重组酶的酶学性质。再借助计算机辅助设计突变位点，定向构建

热稳定性提升的 AprEbl 突变体。此外，还利用分子动力学模拟（MD）对该突变体的蛋白质结构进行了分析，探讨其稳定性提高的分子机制。

(3) 在枯草芽孢杆菌体系中，针对碱性蛋白酶分泌表达进程里的若干关键调控因子实施过表达与基因敲除操作，通过 SDS-PAGE 电泳和蛋白质定量分析，评估这些操作对碱性蛋白酶表达量的影响。筛选出对碱性蛋白酶表达具有正向调控作用的基因。随后，利用同源重组技术将筛选出的正向调控基因整合至枯草芽孢杆菌的染色体特定位点，构建稳定的工程菌株，从而进一步提升碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的表达量，为其工业化生产提供更具优势的菌株资源。

第 2 章 复合诱变选育蛋白酶高产菌株

传统的地衣芽孢杆菌野生菌株所产碱性蛋白酶的活性往往难以满足日益增长的工业需求。因此，通过诱变育种技术来提高菌株的产酶能力，是获得高效产酶菌株的重要途径之一。常见的诱变方法包括物理诱变、化学诱变以及近年来新兴的复合诱变技术。

LiCl（氯化锂）作为一种化学诱变剂，能够作用于微生物的 DNA，影响其复制和转录过程，从而诱导基因突变。它具有操作简单、成本较低等优点，在微生物诱变育种中得到了一定的应用^[66]。然而，单独使用 LiCl 诱变时，突变的随机性较大，正向突变率相对有限，且可能导致一些不良突变的出现^[67]。

常压室温等离子体（ARTP）诱变技术是一种新型的物理诱变方法。它利用等离子体产生的高能粒子与微生物细胞相互作用，使细胞表面的化学键断裂，引发细胞内遗传物质的损伤和重组，进而产生丰富的基因突变^[68]。ARTP 诱变具有突变率高、突变谱广、操作简便、安全环保等诸多优势，为微生物菌种改良提供了有力的技术支持^[69-71]。但单一的 ARTP 诱变也存在一定的局限性，例如诱变后的菌株可能存在遗传稳定性不足等问题^[72]。

基于以上背景，将 LiCl 化学诱变与 ARTP 物理诱变相结合，形成 LiCl-ARTP 复合诱变技术，有望充分发挥两种诱变方式的优势，克服单一诱变的不足。通过这种复合诱变技术，可以更高效地筛选出碱性蛋白酶高产的地衣芽孢杆菌菌株，提高碱性蛋白酶的产量和质量，降低生产成本，为碱性蛋白酶在工业领域的大规模应用提供更优质的菌株资源。

2.1 实验材料

2.1.1 实验菌株

本实验所用菌种为地衣芽孢杆菌 B66 菌株，由实验室保存。

2.1.2 实验仪器

本实验所用的主要仪器设备见表 2-1。

表 2-1 主要仪器
Table 2-1 The list of main instruments

仪器名称	仪器型号	仪器生产厂家
电子天平	TLE104E	梅特勒-托利多仪器
数显磁力搅拌器	SCI-PB	上海科雅生物科技
pH 计	BPH-600/610CK	贝尔分析仪器
立式灭菌锅	YM75	上海三申医疗器械
双人单面净化工作台	SW—CJ—2FD	苏州净化设备
立式振荡培养摇床	THZ-98AB	上海一恒科学仪器
离心机	Microfuge 20	贝克曼库尔特仪器
ARTP 诱变仪	ARTP-IIS	源清天木生物科技
紫外分光光度计	UV-5500PC	上海元析仪器
振荡培养箱	THZ-98AB	上海知楚仪器有限公司
水浴锅	HH.S21-8	常州诺基

2.1.3 实验试剂

本实验所用的主要实验试剂见表 2-2。

表 2-2 主要实验试剂
Table 2-2 Main experimental reagents

药品名称	规格	生产厂家
胰蛋白胨	生化试剂	上海生工生物
酵母提取物	生化试剂	上海生工生物
脱脂牛奶	生化试剂	上海生工生物
NaCl、甘油	分析纯	国药集团化学试剂
琼脂粉、牛肉膏	生化试剂	国药集团化学试剂
三氯乙酸	分析纯	国药集团化学试剂
硼砂、NaOH	分析纯	国药集团化学试剂
KH ₂ PO ₃ 、Na ₂ HPO ₃	分析纯	麦克林
酪蛋白	分析纯	麦克林

药品名称	规格	生产厂家
碳酸钠	分析纯	麦克林
福林酚	分析纯	上海生工生物

2.1.4 培养基及溶液

LB 培养基：5 g 酵母粉，10 g 胰蛋白胨，10 g 氯化钠，去离子水定容至 1 L，pH 调至 7.0，121℃灭菌 20 min。固体 LB 培养基则在此基础上加入 20 g 琼脂。

肉膏蛋白胨培养基：3 g 牛肉浸膏，10 g 胰蛋白胨，5 g 氯化钠，去离子水定容至 1 L，每瓶分装 100 mL 并加入 2 g 琼脂粉，于 121℃灭菌 20 min。

脱脂牛奶溶液（用于配置初筛平板）：15 g 脱脂奶粉溶去离子水定容至 1 L，115℃灭菌 20 min。（在使用前，与加热融化的肉膏蛋白胨培养基以 1:4 的比例混合，混合时需注意培养基温度不宜过高，以免牛奶变性产生沉淀。）

ALK 发酵产酶培养基：10 g 糊精，20 g 可溶性淀粉，10 g 酵母提取物，5 g NaCl，去离子水定容至 1 L，pH 调至 7.0，115℃灭菌 20 min。

硼砂-NaOH 缓冲液：19.08 g 硼砂溶于 1 L 去离子水中；4 g NaOH 溶于 1 L 去离子水中，两种溶液等量混合。

20 g/L 酪蛋白：20 g 干酪素，用适量 0.5 mol/L NaOH 溶液润湿后加入硼砂-NaOH 缓冲液，加热时用玻璃棒搅拌帮助其溶解，用缓冲液定容至 1 L，保存在 4℃冰箱。

0.4 mol/L 三氯乙酸溶液：65.2 g 三氯乙酸，用去离子水定容至 1 L，保存在 4℃冰箱。

0.4 mol/L 碳酸钠溶液：42.4 g 碳酸钠，用去离子水定容至 1 L，保存在 4℃冰箱。

2.2 实验方法

2.2.1 菌种的活化及生长曲线的测定

首先取-20℃保藏的地衣芽孢杆菌 B66 标准储备菌种一管，4℃融化后，在 LB 固体培养基上分区划线，37℃静置培养 12 h。在无菌的 EP 管中加入 2 mL 生理盐水，从培养基挑取单菌落至 EP 管中，振荡混匀，得到菌悬液，可用于生长曲线的测定及后续的诱变。

将菌悬液以 2% 的接种量接入 100 mL 液体培养基中, 37°C, 220 rpm/min 培养 24 h, 以未接种的无菌培养基为对照组, 每隔两个小时取样, 测定 600 nm 处的吸光度, 记录数据并绘制生长曲线。

2.2.2 酶活标准曲线的制作

准确称取 0.10 ± 0.0002 g 干燥的 L-酪氨酸, 用 60 mL 1 mol/L 盐酸溶解, 然后定容至 100 mL, 配制成 1 mg/mL 的酪氨酸溶液。取 10 mL 该溶液, 用 0.1 mol/L 盐酸定容至 100 mL, 得到 100 μ g/mL 的 L-酪氨酸标准储备液。

制备浓度为 0、10、20、30、40、50 μ g/mL 的 L-酪氨酸标准溶液, 稀释后需立即进行测定。向每 1 mL 溶液中加入 5 mL 碳酸钠溶液和 1 mL 福林试剂使用溶液, 充分混匀后, 在 $40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 水浴中显色 20 分钟。取出后, 使用分光光度计在 680 nm 波长下, 用 10 mm 比色皿, 以不含酪氨酸的 0 管为空白, 测定各溶液的吸光度。每组实验设置三个平行样, 以吸光度 A 为纵坐标, 酪氨酸浓度 c 为横坐标, 绘制标准曲线。通过回归方程, 计算吸光度为 1 时对应的酪氨酸量 (μ g), 即为吸光常数 K 值。

2.2.3 酶活力的测定

活性测定: 参照国标 GB/T 23527-2009 《蛋白酶制剂》。将粗酶液稀释后各取 1 mL 加入 A、B 两个试管中, 其中 A 管为对照组, B 管为实验组。将所有样品 40°C 加热 2 min, 向 A 管中加入 3 mL 配置好的三氯乙酸溶液, 向 B 管中加入 1 mL 酪蛋白溶液。A、B 管继续 40°C 加热 10 min。然后分别向 A 管中加入 1 mL 酪蛋白溶液, 向 B 管中加入 3 mL 三氯乙酸, 所有试管在室温条件下静置 10 min。分别过滤 A、B 管中的溶液, 取上清液。再从上清液中取 1 mL, 加入 5 mL 碳酸钠溶液和 1 mL 福林酚试剂, 混匀后 40°C 加热 20 min。最后在 680 nm 波长处测定吸光值, 按下式计算样品的酶活性:

$$\text{酶活性/ (U/mL)} = \frac{5 \times K \times OD_{680 \text{ nm}}}{10} \times N$$

式中: K 为吸光常数, 即当吸光度为 1 时酪氨酸的量 (μ g); N 为稀释倍数。

2.2.4 LiCl 预处理

原始菌株经活化后，分别取菌液 2 mL 置于试管中，再分别添加 1%，2%，3%，4%，5%，6%的氯化锂溶液 2 mL，37°C处理 30 min。离心去除 LiCl，用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，重悬至原体积。涂布在 LB 培养基上，放入 37°C恒温培养箱中培养 24 h。对照组和试验组分别进行菌落计数，算出菌株存活率，结合正突变率可以确定最佳处理时间^[73]。

2.2.5 ARTP 诱变选育

取 2.3.5 预处理完毕的菌液于 4°C、5000 rpm/min 离心 4 min，用 1 mL 无菌生理盐水制成菌悬液。取 10 μ l 制备好的菌悬液均匀涂在无菌小铁片上，置于 ARTP 工作仪器中进行诱变处理^[74]：距离 2 mm、通气量 10 SLM、功率 100 W，分别处理 0、20、40、60、80、100、120 s。放置铁片时确认 EP 管紧贴固定座垂直放置，以使小铁片可以正常落在 EP 管内，管内添加 990 μ L LB 培养基用于后续复苏菌种。将 EP 管充分振荡混匀洗脱，于 37°C恒温振荡培养箱中 220 rpm/min 黑暗培养 2 h。取培养过后的菌液使用无菌生理盐水稀释四个梯度（ 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} ），取 100 μ L 稀释液涂布置于 LB 培养基上，37°C培养 24 h，然后以 0 s 诱变时间为对照组，计算菌株存活率及正突变率。

2.2.6 初筛与复筛

挑取诱变后单菌落点种于筛选平板，37°C培养 24-48 h。测量菌落周围透明圈直径（H）与菌落直径（C），计算 H/C 比值，选取比值显著高于野生型的菌株。

将初筛菌株制成菌悬液，再接种至碱性蛋白酶产酶培养基，37°C、220 rpm 培养 48 h。所得发酵液 13000 rpm/min 离心 30 min，上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤，即为粗酶液，后按照 2.2.3 酶活测定方法测定粗酶液酶活。

2.2.7 稳定性验证

热稳定性：将野生型和诱变后菌株的发酵后粗酶液在 50°C的条件下孵育，分别在 0、10、20、30、45 min 时取样，测定粗酶液的剩余活性，假定初始活为 100%，剩余活性记录为初始活性的百分比。

同时有研究表明,经过诱变筛选获得的菌株在多次传代后可能出现遗传稳定性下降的问题^[75]。将前期得到的高产菌株连续传代 5 次,在碱性蛋白酶产酶培养基中发酵后测定每代酶活,检测其产酶稳定性,从而筛选稳定性优良菌株。

2.3 实验结果

2.3.1 生长曲线的测定

由生长曲线(图 2-1)可知,菌株的迟缓期较短,菌体在 5-15 h 进入对数生长期,此期间菌株生长代谢旺盛,适应力强,处于染色体时期的菌体更容易经诱变后产生突变,获得较高突变率。在 15-25 h 菌体处于稳定期。因此选择培养 12 h 后的菌液进行后续的诱变处理。

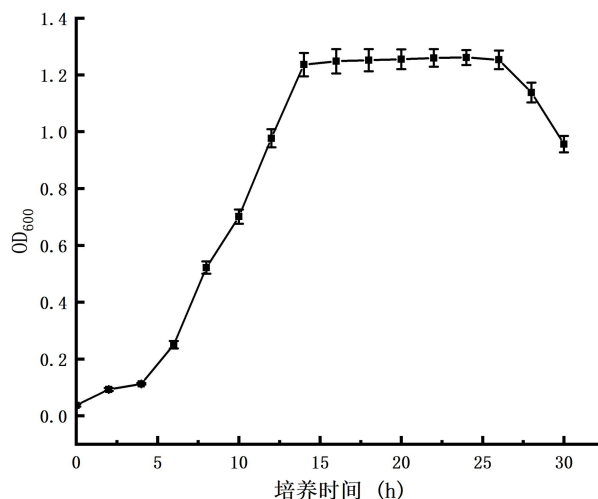


图 2-1 地衣芽孢杆菌 B66 的生长曲线

Figure 2-1 Growth curve of *Bacillus licheniformis*

2.3.2 菌株存活率及正突变率的测定

统计经不同浓度 LiCl 预处理后,涂布在 LB 平板上的菌落数目,菌落数目在 30-300 之间视为有效计数。同理,统计经 ARTP 不同时间处理后涂布平板上的菌落数目。

根据结果(图 2-2)可知,菌株的存活率随 LiCl 浓度的提升或诱变时间的增加而降低。当 LiCl 浓度为 4%,ARTP 诱变时间为 80 s 时,菌株的存活率在 20-30% 之间,且正突变率最高。因此将 4% 的 LiCl 及 ARTP 80 s 作为诱变处理条件。

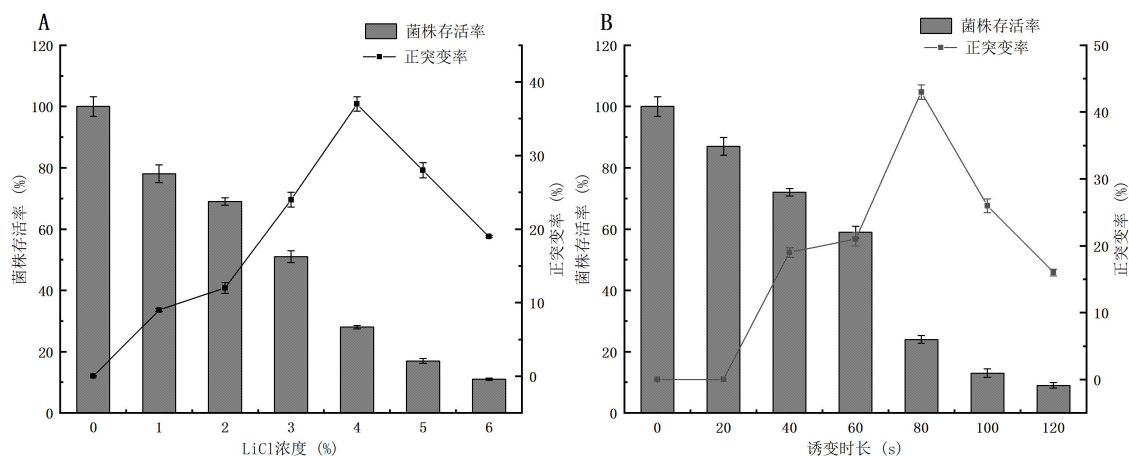


图 2-2 菌株存活率及正突变率

Figure 2-2 Strain survival rate and positive mutation rate

A:LiCl 预处理后 B: ARTP 处理后

2.3.3 复合诱变的初筛结果

将诱变后的菌悬液进行适当稀释，随后涂布于脱脂牛奶平板上进行初步筛选。通过多次诱变实验，根据突变菌株与原始菌株在平板上形成的透明圈大小(图 2-3)，最终筛选出 10 株透明圈较大的地衣芽孢杆菌(见表 2-3)。其中，B66-1，B66-6，B66-8 三株菌的 H/C 值高于其他突变株，后续选择这三株菌进一步发酵验证。

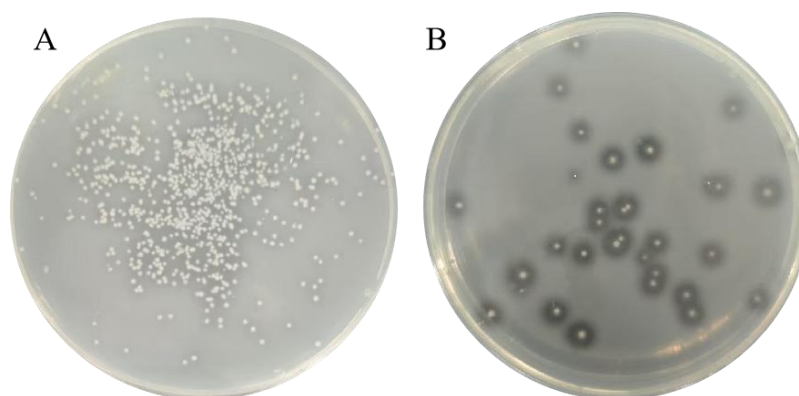


图 2-3 初筛透明圈对比图 (A-原始菌株, B-诱变菌株)

Figure 2-3 Initial sieve transparent circle size (A- original strain, B- mutagenic strain)

表 2-3 突变菌产酶初筛结果

Table 2-3 Preliminary Screening Results of Enzyme Production by Mutant Bacteria

菌株编号	水解圈直径 (H) /mm	菌落直径 (C) /mm	H/C
B66	11.45	3.29	3.48
B66-1	16.87	3.89	4.34
B66-2	14.78	3.98	3.71
B66-3	13.12	3.65	3.59
B66-4	16.38	4.12	3.98
B66-5	15.01	4.21	3.57
B66-6	15.67	3.64	4.30
B66-7	13.89	3.56	3.90
B66-8	16.27	4.02	4.05
B66-9	15.67	3.91	4.01
B66-10	13.05	3.45	3.78

2.3.4 复合诱变的复筛结果

发酵后测定碱性蛋白酶活力进行复筛。首先制作 L-酪氨酸标准曲线（图 2-4），不同浓度的 L-酪氨酸溶液与 OD₆₈₀ nm 呈良好线性关系，可以通过酪氨酸的生成量计算碱性蛋白酶活力，拟合后得到标准线性方程： $y=0.01x+0.007$ ($R^2=0.991$)，K 值为 99.3。根据 2.4.3 的结果所示，测定 H/C 值最高的三株突变菌，分别为 B66-1，B66-6，B66-8，其酶活如表 2-3 所示，其中 B66-1 的酶活最高，与原始菌株 B66 的 451.36 ± 2.27 U/mL 相比，碱性蛋白酶产量提高了约 77.51%。

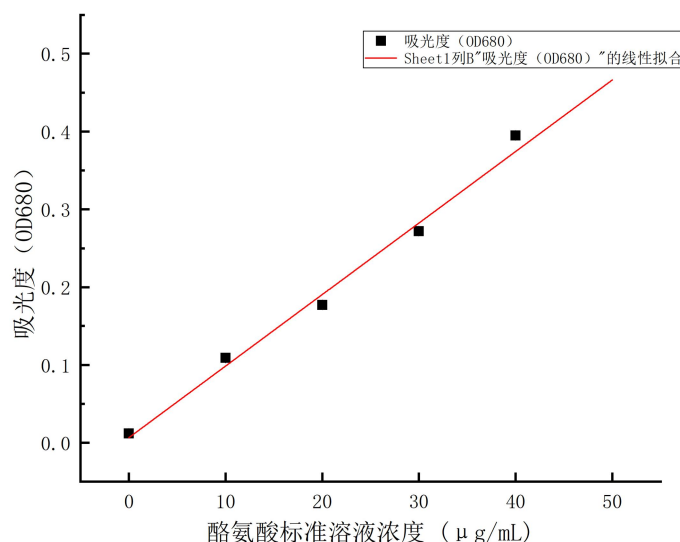


图 2-4 L-酪氨酸标准曲线

Figure 2-4 Standard Curve of L-Tyrosine

表 2-3 原始菌株和诱变菌株的碱性蛋白酶酶活

Table 2-3 ALK enzyme activities of the original and mutant strains

菌株	酶活 (U/mL)	提升倍数
B66	451.36±2.27	1
B66-1	801.21±1.37	1.78
B66-6	718.29 ±2.09	1.59
B66-8	692.42 ±1.98	1.53

2.3.5 热稳定性及遗传稳定性验证

按照 2.3.5 提到的方法测定野生型 B66 和突变后优势菌株在 50℃ 的温度稳定性。如图 2-5 所示, 诱变后菌株的热稳定性有所提升, 其 50℃ 的半衰期(23.90 min) 相较于原始菌株 B66 (21.20 min) 仅提升 2.7 min, 无显著性差异, 可见诱变手段对蛋白酶热稳定性提升的效果非常有限。

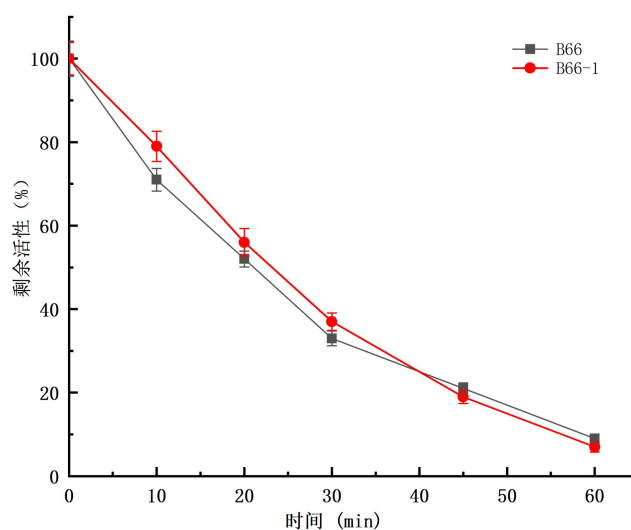


图 2-5 野生型和诱变后菌株在 50℃ 的温度稳定性

Figure 2-5 Temperature stability of wild-type and mutagenic strains at 50°C

将筛选得到的 B66-1 高产菌株连续培养 5 代, 接种于发酵培养基中发酵培养后, 测定碱性蛋白酶酶活力。如图 2-6 所示, 传代 5 代的 B66-1 菌株, 碱性蛋白酶酶活力大小基本在 798.93-801.21 U/mL 之间, 说明 B66-1 菌株的遗传稳定性较好, 可作为生产菌株, 以保证生产过程中的连续性和稳定性。

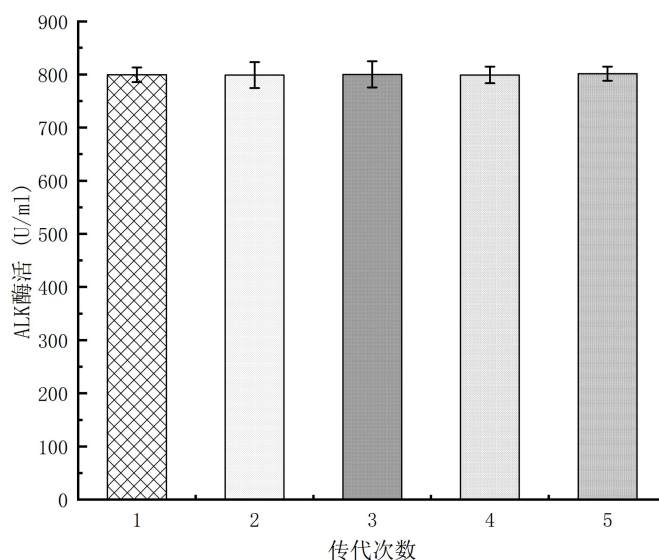


图 2-6 突变株 B66-1 的遗传稳定性
Figure 2-6 Genetic stability of mutant B66-1

2.4 本章小结

本研究以野生地衣芽孢杆菌 B66 为出发菌株，采用 LiCl 辅助 ARTP 多轮迭代诱变技术，成功构建了具有显著产酶优势的突变菌株库。通过平板初筛与发酵复筛验证，最终获得数株碱性蛋白酶高产菌株，其中突变株 B66-1 表现最为突出，其产酶量达到 801.21 ± 1.37 U/mL，较原始菌株 B66 (451.36 ± 2.27 U/mL) 提升了 77.51%，但所产碱性蛋白酶的热稳定性没有得到明显提升。此外，连续五代传代实验中，B66-1 酶活波动始终稳定在 $\pm 3.5\%$ 范围内，证实高产性状的遗传稳定性，排除了表型短暂强化的可能性。

第 3 章 基于理性设计提高蛋白酶 AprEbl 的热稳定性

目前市场上大多数蛋白酶属于中温型，其最适活性温度通常在 20°C 到 45°C 之间，这使得它们无法满足一些高温工业应用需求，如高温清洗、高温纺织加工、食品高温蒸煮、嗜热性微生物发酵等^[76]。因此，筛选和改造具有良好热稳定性及高酶活的蛋白酶一直是近年来工业用酶研究的热点。

随着技术的发展，优化蛋白酶酶学性质的方式有了很大变化，主要有基因工程，化学修饰及添加成分调节等^[77, 78]。尽管上述方式一定程度上推动了蛋白酶热稳定性的提升，但仍存在着改造位点选择困难、添加成分作用性复杂等局限性^[79]。通过近年大量研究人员对已知碱性蛋白酶序列及其对应的热稳定性数据的深入挖掘和分析，我们已经能够利用生信技术精准识别出与热稳定性紧密相关的关键氨基酸位点^[80]，再通过计算机技术，我们能够实现对蛋白酶序列突变更为精准的模拟和预测^[81]。另外，目前市售的产碱性蛋白酶大部分由地衣芽孢杆菌生产所得，其中 AprE 所编码的蛋白酶又是其中占比最高的^[82]。基于以上背景，本章节利用生物信息学和计算机技术辅助设计突变位点，构建 AprEbl 热稳定提升的突变体并将其在遗传背景更为清晰的枯草芽孢杆菌 168 中表达。此外，还利用分子动力学模拟（MD）对该突变体的蛋白质结构进行了分析，探讨其稳定性提高的分子机制。

3.1 实验材料

3.1.1 菌株与质粒

地衣芽孢杆菌 B66-1，枯草芽孢杆菌 168 蛋白酶 E 缺陷型，大肠杆菌 DH5 α 均由本实验室保藏，重组质粒 pHY-P43-*aprEbl* 由本实验构建。实验中所需的引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

3.1.2 试剂与仪器

本实验所使用的主要试剂见表 3-1。

表 3-1 主要实验试剂

Table 3-1 Main experimental reagents

药品名称	规格	生产厂家
Site-directed Mutagenesis Kit	分子生物	上海生工
SDS-PAGE Preparation kit	分子生物	
His-Tag Protein Purification Kit (Ni-NTA)	分子生物	
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	分子生物	碧云天
T4 连接酶	分子生物	TaKaRa 生物
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	分子生物	
<i>Bam</i> HI 限制性内切酶	分子生物	
<i>EcoR</i> I 限制性内切酶	分子生物	赛默飞
氨苄氯霉素	美国药典标准	上海生工
醋酸钠	生化试剂	国药试剂
冰醋酸	色谱级	阿拉丁
Na ₂ HPO ₄	生化试剂	国药试剂
NaH ₂ PO ₄	生化试剂	
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	生化试剂	
NaOH	生化试剂	

本实验所使用的主要仪器见表 3-2。

表 3-2 主要仪器

Table3-2 The list of main instruments

仪器名称	仪器型号	仪器生产厂家
基因扩增仪	Mastercycler X50S	德国 Eppendorf
金属浴	SE 22331 Hamburg	
ÄKTA 蛋白纯化仪	BPH-600/610CK	思拓凡生物科技
冷冻离心机	H1750R	湖南湘仪
超纯水机	Master	和泰
酶标仪	Multiskan FC	赛默飞
pH 计	EL20	梅特勒托利多仪器

3.1.3 培养基及溶液

LB 培养基、产酶发酵培养基及酶活测定所需溶剂配比均参照 2.1.4 章节。

剩余溶液配方如下：

50 mM 的醋酸钠-醋酸缓冲液：以 pH 4.8 为例，2.15 g 醋酸钠、1.37 mL 冰醋酸，去离子水定容至 1 L。

磷酸盐 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液: 以 pH 7.0 为例, 2.71 g 无水 Na_2HPO_4 、3.71 g 无水 NaH_2PO_4 , 去离子水定容至 1 L。

硼砂- NaOH 缓冲液: 以 pH 11.0 为例, 9.53 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 1.93 g 的 NaOH , 去离子水定容至 1 L。

注: 因实验需求, 三种缓冲液需要不同的 pH 值, 则通过增减其成分剂量调节至不同 pH。

3.2 实验方法

3.2.1 AprEbl 的同源建模及 MD 分析

AprEbl 蛋白序列已上传至 NCBI 数据库 (登录号: PQ901576), 经序列比对后, 在 PDB 数据库中选取与目的蛋白序列相似性最高的结构为模板, 使用 SWISS-MODEL 在线软件同源模拟 AprEbl 的 3D 结构。用 Discovery Studio 软件处理 AprEbl 的三维结构信息以确定各氨基酸的 B-factor 值, 高 B-factor 通常意味着该原子的运动范围较大, 反映了结构的不稳定性, 利用 B-factor 对蛋白质稳定性进行改造是结构生物学和蛋白质工程中的一个重要研究方向^[83]。根据 B-factor 的结果, 对高温因子区域进行丙氨酸扫描及饱和突变, 对蛋白进行去水、Prepare Protein 等处理后, 赋予其 CHARMm 力场, 将需要突变的位点设置为一个 Group, 设置一定的 pH 和温度条件并运行程序, 根据程序输出的 Report, 通过突变能的高低可判断某些位点的突变会对蛋白的稳定性有提升作用, 从而为实验中的氨基酸定点突变提供指导。

3.2.2 重组质粒及突变体的构建

重组质粒的构建方法参考文献^[84] (图 3-1)。首先根据 B66 菌株 AprEbl 蛋白酶基因密码子偏好性, 在其 5'端和 3'端分别加上 *EcoR I* 和 *Bam HI* 限制性酶切位点, 以 B66 全基因组为模板对目的基因进行扩增。将扩增出来的 AprEbl 片段与质粒 pHY-P43 分别进行酶切、纯化, 再利用 T4 酶在 4°C 条件下过夜反应连接, 将过夜连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 加入 900 μL LB 液体培养基活化, 220 rpm/min 条件下培养 2 h, 浓缩涂布到含有 Amp^r抗性的 LB 固体平板上, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12~14 h, 次日挑取转化子, 初步筛选鉴定, 后测序验证。

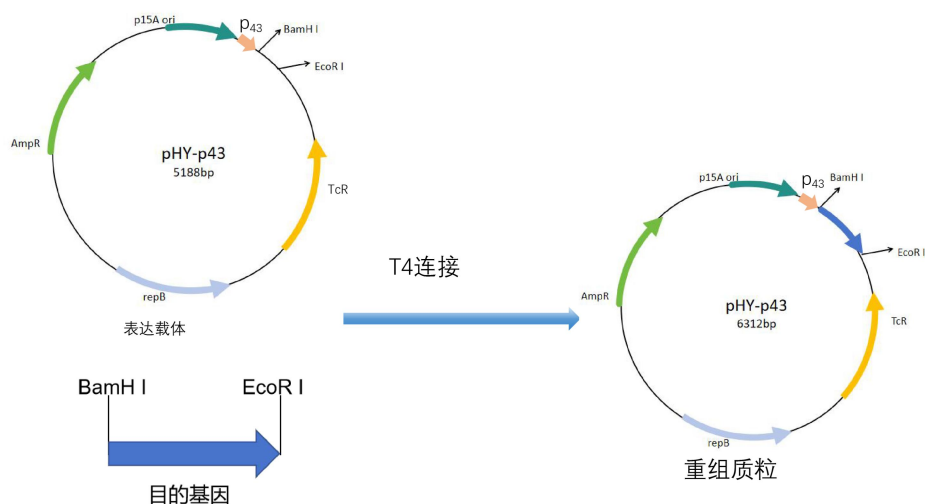


图 3-1 重组质粒构建过程图

Figure 3-1 Schematic diagram of the construction process of the recombinant plasmid

构建突变体的引物由金斯瑞公司合成并在表 3-3 中列出。以前期构建的表达质粒 pHY-P43-*aprEbl* 用作构建突变体的模板。通过使用正向引物 X-U、反向引物 X-B 和定点突变试剂盒进行 Quikchange PCR (表 3-4)。本章所构建的重组质粒及突变菌株见表 3-5。

表 3-3 定点突变所用引物

Table 3-4 Primers used by site-directed mutagenesis

引物	序列 (5'-3')
<i>aprEbl</i> -U	GCCATTGAAGGGACCTCTTTCCCTGC
<i>aprEbl</i> -B	GAATTCCATCATCATCATCATGGAACCTGCTTCTTTTACT AGATCTCGAACAAGCATTCTGA
G186I-B	GGCGCTACGCCAGAACAAATGATTGAGTTATTAAGAGCGGC
G186I-U	GCCGCTCTTAATAACTCAATCATTGTTCTGGGCGTAGCGCC
N183W-B	AGAACACCGATTGACCAATTAAGAGCGGCAATCGTACCGGCTAC
N183W-U	GTAGCCGGTACGATTGCCGCTCTTAATTGGTCAATCGGTGTTCT
S265H-B	CTTGTGCTTCCGTGTGAACCTTCGTTTCCGGCTGCGG
S265H-U	CCGCAGCCGGAACGAAGGTTACACGGAAGCACAAG
S267F-B	CCGACTGTGCTTGTGTTTCCGGATGAACCTTC
S267F-U	GAAGGTTTCATCCGGAACACAAGCACAGTCGG
Y320W-B	GTTATAAGCGCCCCAAGTGCCTCCAGGAAGTGTGCT
Y320W-U	AGCACACTTCCTGGAGGCACTTGGGGCGCTTATAAC
N183W/G186I-B	CGCTACGCCAGAACTAGGATTGACCAATTAAGAGCGGCAATC

N183W/G186I-U	GTAGCCGGTACGATTGCCGCTCTTAATTGGTCAATCCTAGTTCT
S265H/S267F-B	GTAGCCGACTGTGCTTGTGAATCCGTGTGAACCTTCGTTTCCGGC
S265H/S267F-U	AGCCGGAAACGAAGGTTACACGGATTACACAAGCACAGTCGGCT

Quikchange PCR 程序如下表：

表 3-4 定点突变 PCR 程序

Table 3-5 PCR Program for Site-Directed Mutagenesis

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	30 s	
退火	60°C	1min	18
延伸	68°C	12 min	
终延伸	68°C	5 min	1
保存	4°C	∞	

表 3-5 本章所构建菌株

Table 3-5 Strains constructed in this chapter

名称	特征	来源
<i>Bs.168</i> $\Delta aprE$	<i>aprE</i> 缺陷型	本章
BSA	<i>aprEbl</i> 异源表达；pHY-p43- <i>aprEbl</i>	本章
BS01	BSA 定点突变菌株；N183W	本章
BS02	BSA 定点突变菌株；G186I	本章
BS03	BSA 定点突变菌株；S265H	本章
BS04	BSA 定点突变菌株；S267F	本章
BS05	BSA 定点突变菌株；Y320W	本章
BS06	BSA 定点突变菌株；N183W/G186I	本章
BS07	BSA 定点突变菌株；S265H/S267F	本章
pHY-P43		实验室保藏
pHY-P43- <i>aprEbl</i>	pHY-p43, <i>aprEbl</i>	本章

PCR 产物经 *Dpn I* 酶处理后转入 DH5 α 感受态细胞，将感受态细胞涂布至含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp⁺ 的 LB 平板上培育，后将阳性克隆送至公司测序验证。使用 spizizen 转化法^[85]，将验证成功的质粒转入 BS168 蛋白酶 E 缺陷型中，涂布培养筛选，并在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp⁺ 的牛奶筛选培养基上对转化子进行筛选、验证。

3. 2. 3 野生型及突变体酶的表达与纯化

将构建成功的突变体转入 BS168 蛋白酶 E 缺陷型宿主细胞，挑取单菌落至 50 mL LB 液体培养基（含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp⁺）中，37°C，220 rpm/min 过夜培养，当菌液的 OD₆₀₀ 达到 1.2~1.4 之间，按 2% 的接种量接种至 100 mL 发酵培养基中振荡培养 48 h。发酵液在 4°C、13000 rpm/min 条件下离心 30 min，由于该酶为

组成型胞外蛋白酶，因此离心所得上清液即为粗酶液。利用 Ni-NTA 亲和层析柱对粗酶液进行纯化，具体操作步骤参考标签蛋白纯化试剂盒说明书，将过 0.45 μm 微孔滤膜后的粗酶液上柱，使用含有低浓度咪唑除杂缓冲液进行洗杂，再通过洗脱缓冲液进行洗脱并收集。所得蛋白样经过冷冻干燥浓缩后通过 12% SDS-PAGE 分析蛋白样品的纯度和分子质量。

3.2.4 AprEbl 及突变体活性及比活力的测定

活性测定方法参照方法 2.3.3。

蛋白含量的测定方法参考 BSA 法，采用牛血清白蛋白（BSA）作为标准蛋白，配制一系列不同浓度的 BSA 标准溶液（如 0、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/mL ）。向每份标准溶液中加入 1 mL 二辛可酸试剂，65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟促进显色反应。反应完成后，待溶液冷却后使用分光光度计在 562 nm 波长下测定各标准溶液的吸光度。以 BSA 标准溶液的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，并通过线性回归法拟合数据。样品的蛋白含量测定方法与标准品相同，根据样品的吸光度值，利用标准曲线计算样品中的蛋白浓度。可结合酶活性计算酶的比活力，公式如下：

$$\text{比活力 (U/mg)} = \frac{\text{总酶活 (U)}}{\text{总蛋白质量 (mg)}}$$

3.2.5 pH 和温度对 AprEbl 及其突变体的影响

最适 pH: 分别配置 50 mM 的醋酸钠-醋酸（pH 5.0~6.0）、磷酸盐 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0~8.0)、硼砂- NaOH (pH 8.0~11.0) 缓冲液 100 mL，将不同的 AprEbl 在室温下分别置于不同的 pH（pH 5、6、7、8、9、10、11）中保藏 2 min 后按方法 1.5 测定其活性以确定各酶的最适 pH。

最适温度: 在 50 mM 磷酸盐缓冲液（pH 7.5）中，在不同温度（40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ ）下保藏 2 min 后测定其酶活性可确定不同酶的最适 pH。最高酶活性定义为 100%。

pH 稳定性: 通过监测在最适温度下，在不同 pH 的条件下中孵育不同时间后的剩余活性。

温度稳定性: 在最适 pH 的条件下，在不同温度条件下孵育不同时间，测定 AprEbl 的初始活性及剩余活性，假定初始活为 100%，剩余活性记录为初始活性

的百分比。后使用 Origin 软件非线性拟合出半衰期曲线，以此计算酶的半衰期，分析酶的热稳定性。

3.3 实验结果

3.3.1 AprEbl 的序列分析及建模

在 NCBI 数据库中检索芽孢杆菌属的碱性蛋白酶 apr 序列，与 AprEbl 进行序列比对分析（图 3-2），发现其与芽孢杆菌属的碱性蛋白酶序列相似性最高达 89.7%。它们通常都属于 S8 肽酶家族，具备高度保守的催化三联体结构，由组氨酸（His）、天冬氨酸（Asp）和丝氨酸（Ser）构成，且在底物结合区域拥有相似的 β -折叠片层与 α -螺旋组合排列方式。

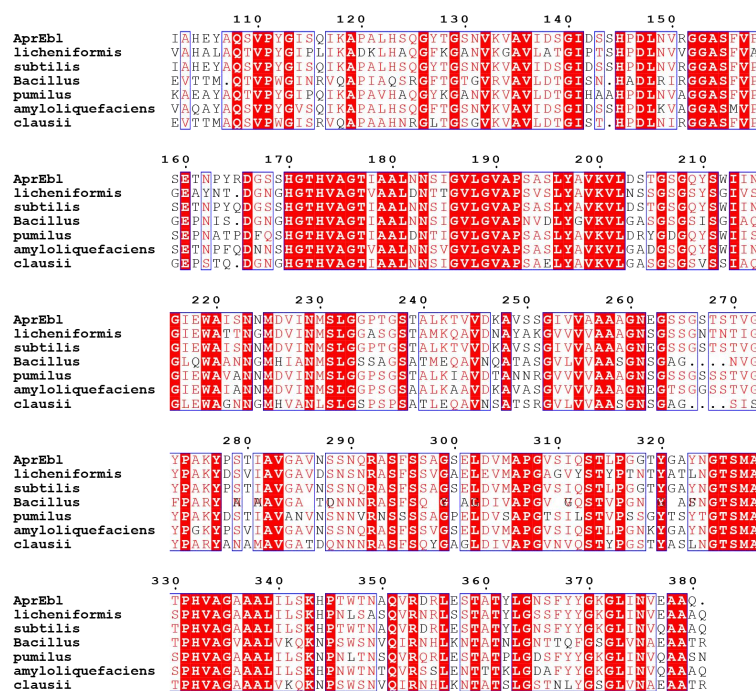


图 3-2 *aprEbl* 的序列相似性分析

Figure 3-2 Sequence similarity analysis of *aprEbl*

鉴于此高度相似性，遂选用 PDB 数据库中已有的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）168 菌株的碱性蛋白酶（apr）晶体结构（PDB: 3whi, X-ray diffraction 2.4Å resolution）作为模板，构建 AprEbl 的三维模型（图 3-3），将得到的模型提交至 SAVES v6.1 在线工具进行评分，最优结果用于后续的分子动力学分析。

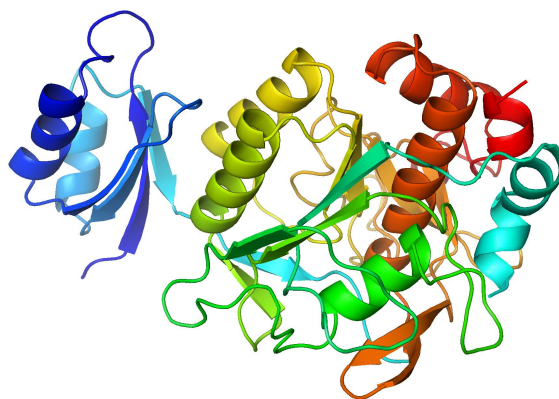


图 3-3 预测所得 AprEbl 的三维结构

Figure 3-3 3D structure of predicted AprEbl

3.3.2 AprEbl 突变体的预测与筛选

将 3.3.1 所得模型提交至 Discovery Studio 2019 软件进行 MD 分析, 根据 B-factor 值能够清晰地识别出每个原子位置的不确定性, 从而确定每个氨基酸的 B-factor 值(图 3-4), 通过温度因子, 我们可以推断出该蛋白的¹⁸³NSIG¹⁸⁶、²⁶⁵SGS²⁶⁷和³¹⁸GTY³²⁰区域构象不稳定。

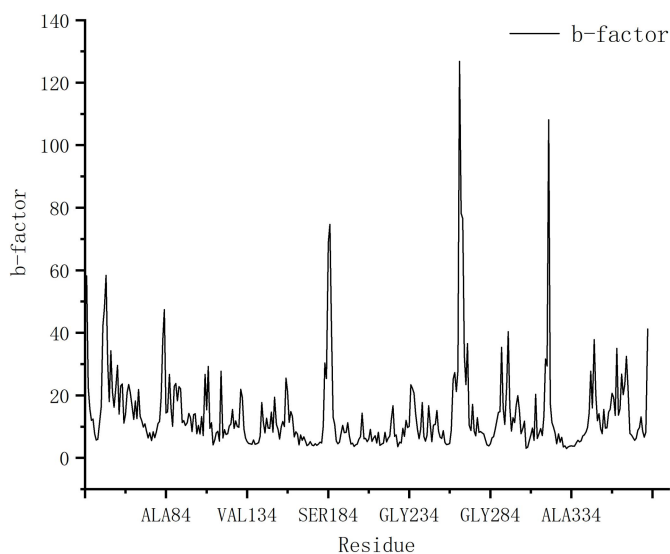


图 3-4 AprEbl 的 B-factor 分析

Figure 3-4 B-factor analysis of AprEbl

再对这三个不稳定区域的十个氨基酸残基位点进行虚拟饱和突变, 根据突变结果(图 3-5), 通过突变能大小, 筛选出 5 个单点突变体 N183W、G186I、S265H、S267F、Y320W, 若突变能在-0.5 以下, 那么 Effect 为 stabilizing, 即这种突变为正向突变, 能提升蛋白的稳定性, 突变能越低, 提升效果越显著。

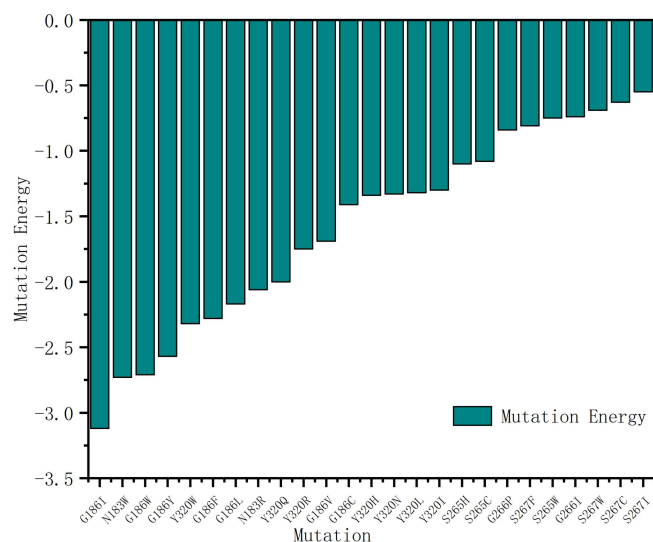


图 3-5 柔性区域 183-186, 265-267, 318-320 的饱和突变结果

Figure 3-5 Saturation mutation results of the flexible region 183-186,265-267,318-320

3.3.3 AprEbl 突变体的构建与表达

按照 3.2.2 中的方法构建质粒及突变体, 最终得到重组质粒 pHY-P43-*aprEbl* 及各突变体的 PCR 产物, 再转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 将阳性克隆送至公司测序验证, 成功获得突变酶重组表达工程菌株。构建成功的突变体在枯草芽孢杆菌 BS168 蛋白酶 E 缺陷型中进行表达, 由于该酶为组成型水解蛋白酶, 因此无需添加诱导剂。按 3.2.3 中的方法进行发酵, 将发酵液离心后收集上清, SDS-PAGE 分析结果如图 (图 3-6), 再通过 Ni-NTA 亲和层析后得到纯度较高的目的蛋白, 纯化后的 SDS-PAGE 凝胶电泳如图 (图 3-7), 突变体粗酶液和纯化后的酶液在 39k Da 处均有明显条带, 表明突变体酶成功表达, 且纯化后的条带清晰, 表明获得了纯的突变体。

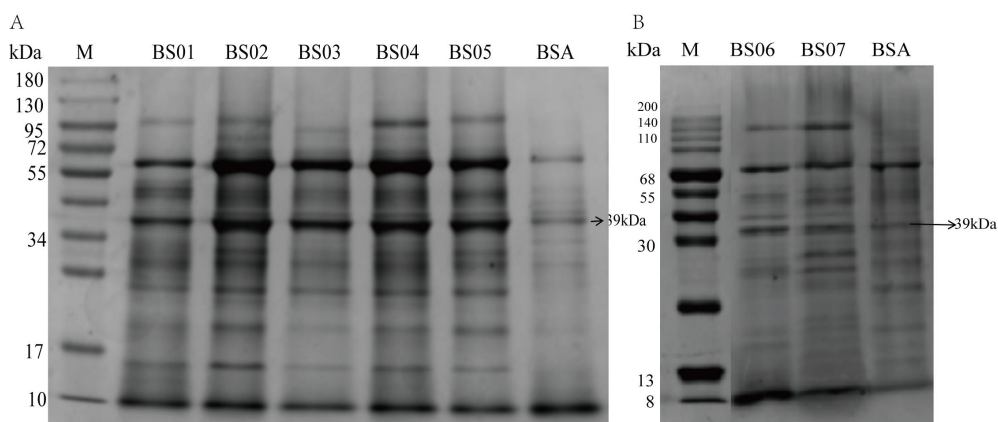


图 3-6 野生型和突变体的粗酶液 SDS-PAGE 测定

Figure 3-6: SDS-PAGE analysis of wild-type and mutant strains

A: 单点突变粗酶液 B: 复合突变粗酶液

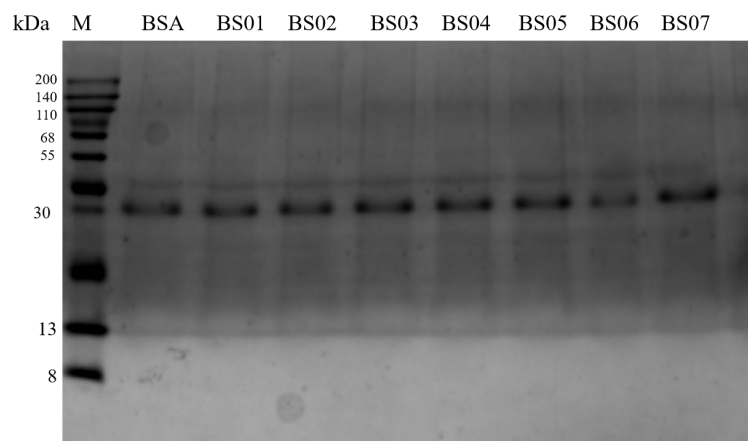


图 3-7 纯化后的 SDS-PAGE 分析

Figure 3-7 SDS-PAGE analysis after purification

(M:marker,BSA:wildtype,BS01:G186I,BS02:N183W,BS03:S265H,BS04:S267F,BS05:Y320W,BS06:N183W/G186I,BS07:S265H/S267F)

3.3.4 AprEbl 及其突变体的活力与比活力

首先测定蛋白含量的标准曲线(图 3-8),拟合后为 $y=1.62x+0.17(R^2=0.996)$, 线性关系良好,可以用于后续目的蛋白的含量测定。

突变体以及野生型在 40°C 热处理 3 min 后的酶活及比活力结果所示(图 3-9),与野生型 BSA 相比,突变体 N183W、G186I、S265H、S267F、Y320W、S265H/S267F 在 40°C 下的酶活分别下降了 22.2%、43.2%、14.7%、43.7%、58.7%、18.7%。相较其他突变体,野生型的比活力比突变体分别高了 1.244 倍、1.469 倍、1.057 倍、1.303 倍、1.425 倍。但突变体 S265H/S267F 的比活力和野生型相比基本持平,野生型 BSA 的比活力能够达到 90.36 U/mg,突变体的比活力则达到了 89.94 U/mg。

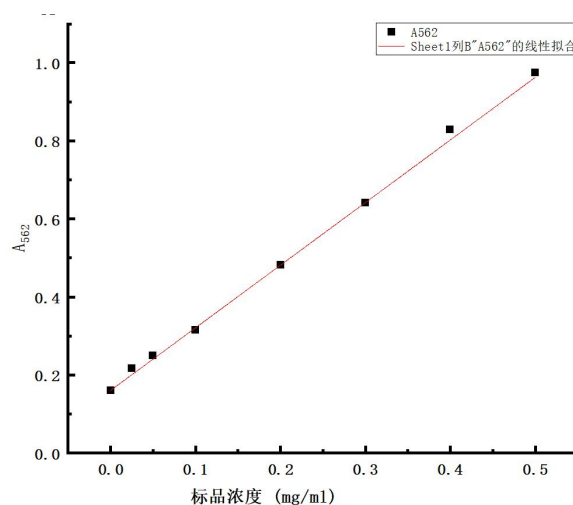


图 3-8 牛血清白蛋白浓度标准曲线

Figure 3-8 Standard curve of bovine serum albumin concentration

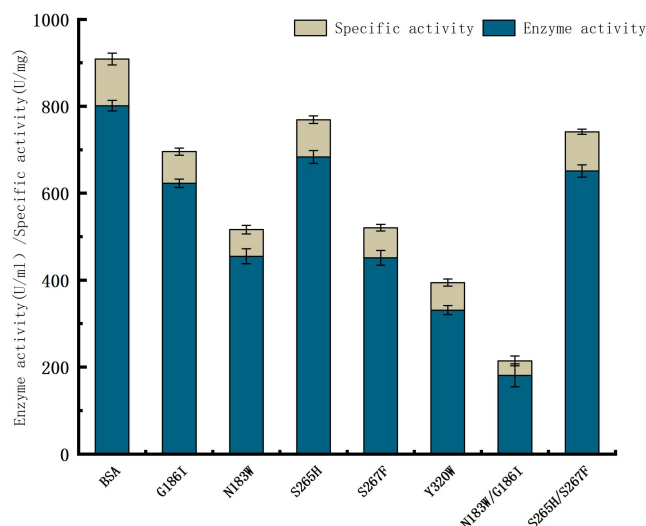


图 3-9 蛋白活力及比活力的测定
Figure 3-9 Enzyme activity determination

3.3.5 单点突变体的酶学性质研究

按照 3.2.5 的方法研究突变位点对酶催化性能的影响,测定野生型 BSA 及其单突变体的最适 pH 及最适温度。结果如图所示,野生型与单突变体的最适 pH 一致(图 3-10A),均在 pH 10.0 时具有最高酶活。但所有突变体的最适温度较野生型比,都有一定程度的提升(图 3-10B),其中,突变体 S265H 的最适温度较野生型提升最大,从 50°C 上升至 60°C,其余突变体的最适温度均为 55°C。在高温情况下,突变体的相对酶活高于野生型。5 个单突变体的热稳定性相较于野生型均有所提升,其中 S265H 的热稳定性效果最好(图 3-11),N183W 次之,由于 265 与 267 位点相近,且都有一定提升效果,因此,设计双突变体 S265H/S267F,同理,设计双突变体 N183W/G186I,进一步探索其酶学性质。

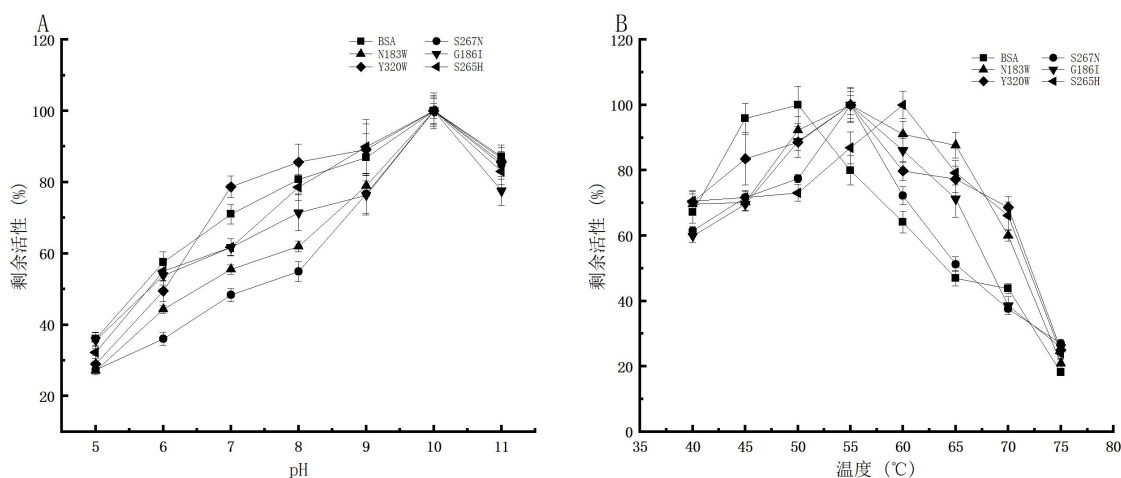


图 3-10 野生型及单突变体的酶学性质

Figure 3-6 Enzymatic properties of wild type and single mutant

A: 单点突变体的最适 pH B: 单点突变体的最适温度

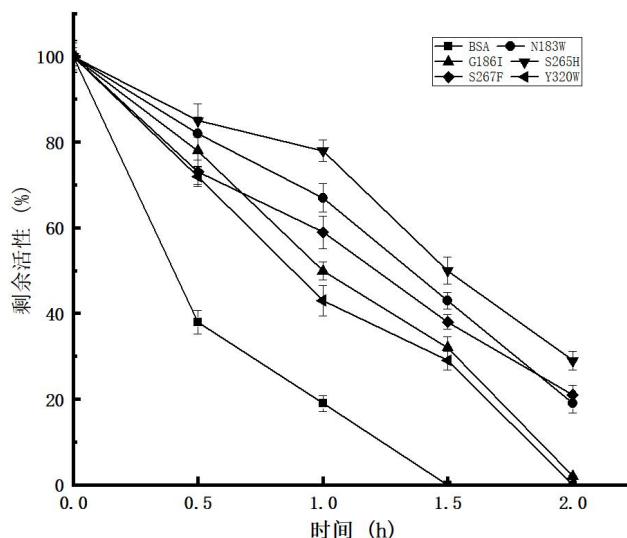


图 3-11 BS05 单点突变体在 55°C 的温度稳定性

Figure 3-11 Temperature stability of BS05 single point mutant at 55°C

3.3.6 复合突变体的酶学性质研究

将构建的复合突变体 S265H/S267F, N183W/G186I 在枯草芽孢杆菌 BS168 蛋白酶 E 缺陷型中进行了表达, 通过活性测定发现突变体 N183W/G186I 表达后酶活力及比活力大幅下降 (图 3-9), 无实际意义, 而复合突变体 S265H/S267F 的酶活与比活力相较原始菌株无明显变化, 故对其进行下一步的酶学性质研究。其最适 pH 为 10 (图 3-12A), 与野生型一致, 最适温度为 65°C, 相较于突变体 S265H 提升 5°C, 相较野生型提升了 10°C (图 3-12B)。在不同 pH 条件下孵育该突变体, 结果如图 (图 3-12C) 所示, 在碱性环境 (pH=8, 9, 10, 11) 下, 6 小时后, 突变体 S265H/S267F 仍能保持 50% 以上的酶活, 在 pH 为 10 的条件下, 6 h 后剩余活性高达 80%。在 45°C 以下 2.5h 后, 其剩余酶活仍旧在 80% 以上, 而在 75°C 的情况下也能够维持酶活性长达 1.5 h。

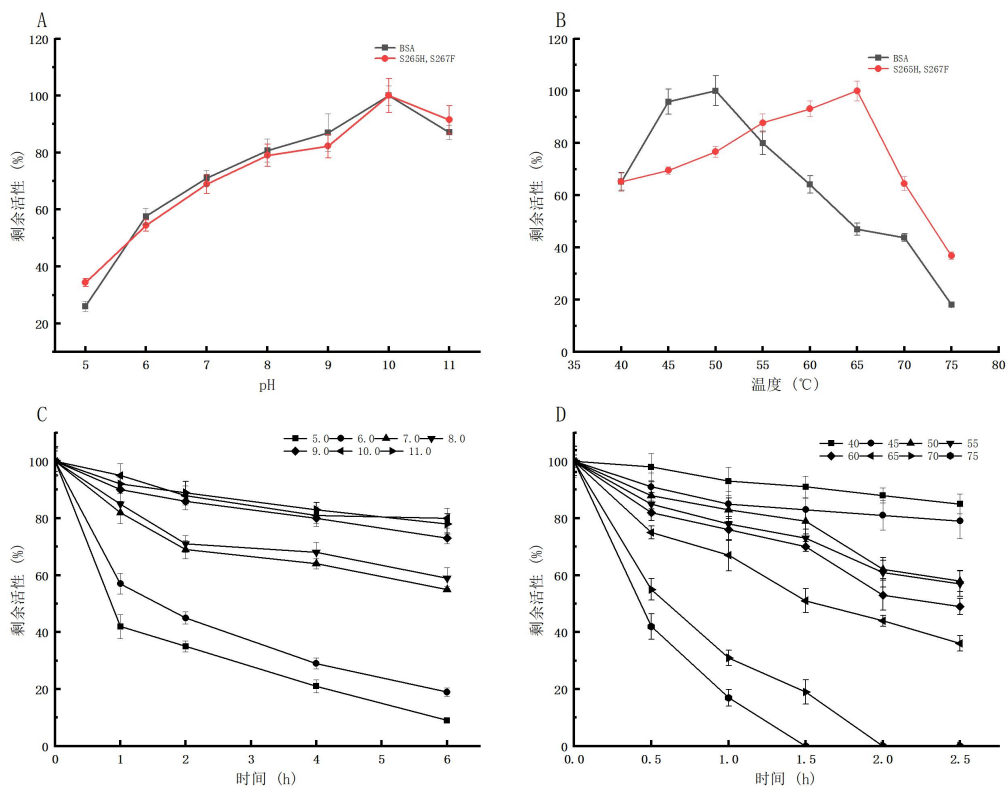


图 3-12 野生型及双突变体的酶学性质

Figure 3-12 Enzymatic properties of wild-type and the double mutant

A: 复合突变体 S265H/S267F 的最适 pH B: 复合突变体 S265H/S267F 的最适温度
C: pH 稳定性 D: 温度稳定性 (以初始活性为 100%)

3.3.7 突变体的热稳定性及半衰期

按照方法 3.2.5 测定各突变体在 55℃和 70℃的半衰期, 结果如表 3-5 所示, 各突变体的半衰期均有所提升, 各单点突变体中, S265H 稳定性最好, 其在最适温度 55℃的条件下的半衰期为 90.39 min, 是野生型的 4 倍以上, 在 75℃的半衰期比野生型提升了 277%。复合突变体 S265H/S267F 的稳定性提升效果更为显著, 55℃的半衰期较野生型提升了 635%, 较 S265H 提升了 64.63%, 在 75℃的条件下, 复合突变体的半衰期提升了 401%, 较 S265H 提升了 81.14%, 可见其耐热性远优于野生型和其他突变体, 具有更高的热稳定性, 为其在各种高温环境下的开发应用奠定了基础。

表 3-5 AprEbl 野生型和突变体在 55℃和 75℃下的半衰期

Table 3-5 Half-lives of wild and mutant AprEbl at 55℃and 75℃

酶	55℃		75℃	
	半衰期/min	增加倍数	半衰期/min	增加倍数
野生型	20.23	-	5.44	-
N183W	78.10	1.96	13.26	1.44
G186I	59.87	2.86	13.79	1.53
S265H	90.39	3.47	15.06	1.77

酶	55°C		75°C	
	半衰期/min	增加倍数	半衰期/min	增加倍数
S267F	69.18	2.42	12.96	1.38
Y320W	51.83	1.56	10.76	0.98
S265H/S267F	148.81	6.35	27.28	4.01

3.3.8 突变体酶分子结构变化分析

为了进一步探究双突变体热稳定性提高的分子机制,本研究对 S265H/S267F 的表面静电势进行初步分析。静电势的分析显示,在野生型蛋白酶 AprEbl 中,氨基酸残基 S265 和 S267 均位于蛋白质表面上的不带电荷的区域内(图 3-13A)。然而将 Ser 突变为 His 和 Phe 后,组氨酸和苯丙氨酸的较大侧链增大了溶剂可及表面积(图 3-13B),改变了静电势的分布,形成了双电层,屏蔽了蛋白质表面的疏水区域。这一变化使该区域的电位正移,显著提升了突变体的整体稳定性。因此,由 S265H/S267F 突变诱导的蛋白质表面上的静电势的变化有利于维持高度稳定的构象以提高热稳定性。

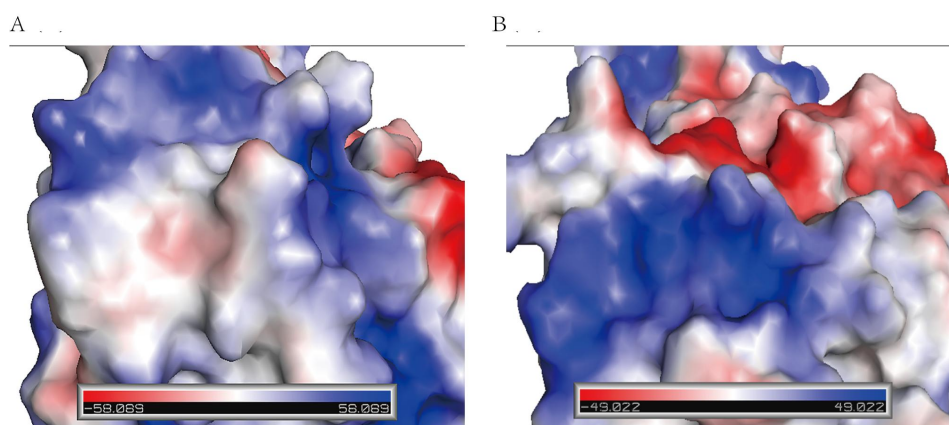


图 3-13 BSA 和 BS07 的表面电势图

Figure 3-13 Surface potential diagrams of BSA and BS07

A: 野生型和突变体的表面静电势图 (a) 野生型; (B) 突变体 S265H/S267F。静电势的正、负和中性值分别用蓝色、红色和白色阴影表示。

其次, Ser 本身为亲水氨基酸,可能与周围水分子形成竞争性氢键,从而削弱内部氢键的形成,影响蛋白质的整体稳定性。突变为 His 和 Phe 后,侧链结构发生变化,可能增加蛋白质内部的疏水相互作用(见图 3-14),从而有助于折叠并稳定结构,减少了不稳定的无规卷曲区域。

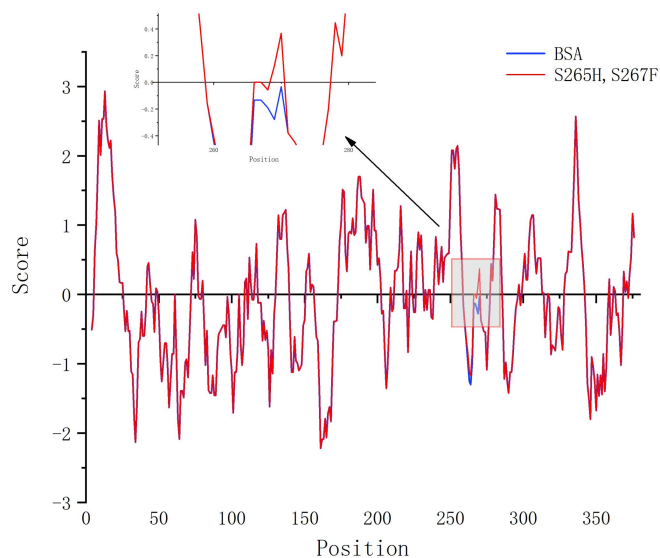


图 3-14 突变前后疏水性对比图

Figure 3-14 Comparison of hydrophobicity before and after mutation

再次，本研究采用 MD 模拟对野生型及复合突变酶的氨基酸残基的均方根波动（RootMean Square Fluctuation, RMSF）值进行研究（见图 3-15），其前后的变化，能反映出蛋白质的柔性区域的变化。结果显示，突变体的 RMSF 值整体显著低于野生型，特别在三个柔性区域 $^{183}\text{NSIG}^{186}$ 、 $^{265}\text{SGS}^{267}$ 和 $^{318}\text{GTY}^{320}$ 差异尤为明显，突变体降低了酶整体及局部区域的柔性，从而提升了酶的热稳定性。

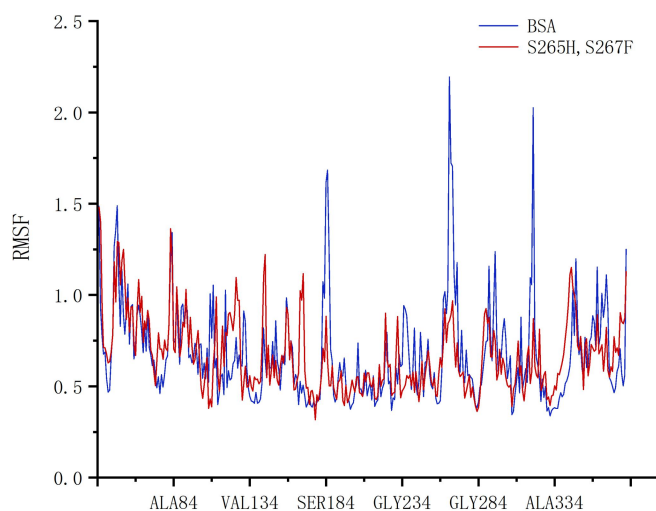


图 3-15 RMSF 对比图

Figure 3-15 Comparison of RMSF before and after mutation

最后，结构分析进一步揭示了突变对蛋白质局部微观结构的影响（见图 3-16 D）。当把位于蛋白质表面且亲水的 S265 和 S267 突变为疏水氨基酸 H265 和 F267 后，H265 的氨基（-NH）与 F267 的羧基（-COOH）形成了新的氢键相互作用，此外，His 的侧链含有一个能够形成氢键的咪唑环，在一定程度上能够增

强了该区域结构的稳定性。因此，突变后蛋白质局部相互作用增强以及新的表面静电荷的形成，可能是复合突变体 S265H/S267F 相比野生型酶具有更好的热稳定性的主要原因。

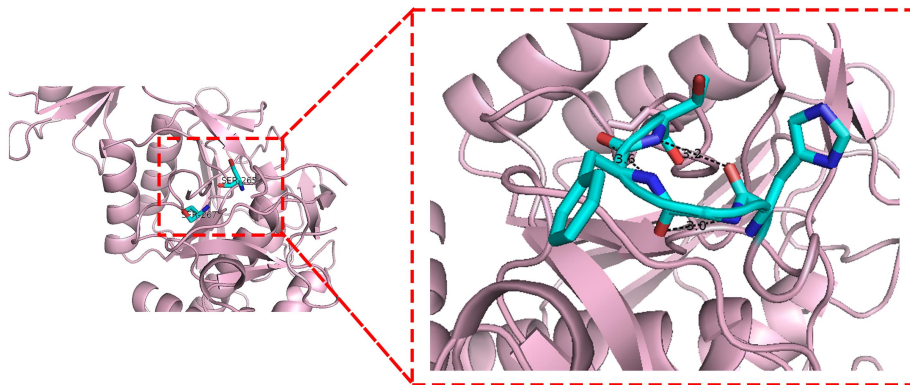


图 3-16 野生型和双突变体 S265H/S267F 的结构分析

Figure 3-15 Structural analysis of the wild-type and double mutant S265H/S267F

野生型突变为 S265H/S267F 后形成的相互作用分析，黑色线表示氨基酸之间的氢键相互作用

3.4 本章小结

本研究通过计算机辅助理性设计（MD 模拟、B-factor 分析及虚拟饱和突变）对地衣芽孢杆菌来源的 AprEbl 蛋白酶进行热稳定性改造，成功构建出 N183W、G186I、S265H、S267F、Y320W 五个单点突变体及复合突变体 S265H/S267F。所有突变体热稳定性均显著提升，其中双突变体 S265H/S267F 表现最优：在 55°C 和 75°C 下半衰期分别达到 148.81 min（较野生型提升了 7.35 倍）和 27.28 min（提升了 5.01 倍），且比活力与野生型基本一致。该成果为高温环境下碱性蛋白酶的应用拓展提供了新策略——高热稳定性可支持新生产工艺开发，结合其高催化活性，有望降低工业生产成本并提升生产效率。

第 4 章 整合表达提升碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的表达

随着工业生产规模的不断扩大和对产品质量要求的日益提高,对碱性蛋白酶产量和活性的需求也在持续增长。而枯草芽孢杆菌作为一种常见且应用广泛的革兰氏阳性菌,具有生长迅速、易于培养、遗传背景清晰以及分泌蛋白能力强等优点,成为生产碱性蛋白酶的理想宿主菌株^[86, 87]。在枯草芽孢杆菌中,碱性蛋白酶的合成受到一系列复杂的代谢调控网络的精确控制,其中一些重要的代谢调控因子起着关键作用。

目前,虽然已经对枯草芽孢杆菌的代谢调控机制有了一定程度的了解,但仍存在许多未知之处。例如,不同代谢调控因子之间的相互作用关系以及它们如何协同调控碱性蛋白酶的表达,这些问题尚未完全明确。因此,对枯草芽孢杆菌中重要代谢调控因子进行研究具有重要意义。通过基因工程手段对这些调控因子进行敲除和过表达,能够深入探究它们对碱性蛋白酶表达量的影响。敲除特定的负调控因子,有可能解除对碱性蛋白酶合成的抑制作用,从而提高其表达水平;而过表达正调控因子,则可以增强对碱性蛋白酶表达的促进作用。

进一步对筛选出的正向调控基因进行整合表达,有望打破原有的代谢调控限制,构建出一株碱性蛋白酶的高产工程菌株。这不仅能够深入揭示枯草芽孢杆菌中碱性蛋白酶表达的分子调控机制,丰富微生物代谢调控的理论知识,还能为碱性蛋白酶的工业化生产提供更高效率的菌株。

4.1 实验材料

4.1.1 菌株和质粒

枯草芽孢杆菌 BS07、质粒 p7C6、质粒 pHY-p43 均为本实验室保藏。

4.1.2 主要试剂及仪器

本实验所使用的主要试剂见表 4-1。

表 4-1 主要实验试剂
Table 4-1 Main experimental reagents

试剂	规格	生产厂家
琼脂糖	分析纯	上海生工生物
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	分子生物	TaKaRa 生物
PCR 产物纯化试剂盒	分子生物	上海生工生物
胶回收试剂盒	分子生物	上海生工生物
质粒提取试剂盒	分子生物	天根生物
细菌基因组提取试剂盒	分子生物	天根生物
50×TAE 缓冲溶液	分子生物	天根生物
Goldview 核酸染料		北京兰杰柯科技有限公司
6×Loading Buffer	分子生物	赛默飞
甘油	分析纯	上海生工生物
氯霉素	分析纯	上海生工生物
卡那霉素	分析纯	上海生工生物
氯化钙	分析纯	上海生工生物
氯化镁	分析纯	上海生工生物

本实验所使用的主要试剂见表 4-2。

表 4-2 主要仪器
Table 4-2 The list of main instruments

仪器名称	型号	生产厂家
水平电泳槽	DYCP-30D	北京六一仪器厂
振荡培养箱	ZQZY-70BS	知楚仪器
干燥恒温器	K30	盛蓝仪器制造有限公司
台式冷冻高速离心机	Micro	赛默飞
自动凝胶成像系统	Gel Doc EZ	美国伯乐
紫外可见分光光度计	TU-1810	北京普析通用仪器

仪器名称	型号	生产厂家
不锈钢蒸馏水机	HS-Z1-20	未来仪器制造有限公司
电子天平	TLE104E	梅特勒托利多仪器 (上海)
型桌上式洁净工作台	VD - 850	苏州净化仪器有限公司
三恒电泳仪	JY1000C	北京君意东方电泳设备
pH 计	EL20	梅特勒托利多仪器
微波炉	D4W-S20	Galanz
PCR 仪	T100	伯乐生命医学产品 (上海)
数显光照培养箱	250D	杰瑞尔电器有限公司
高速冷冻离心机	TG16-G	湘仪离心机仪器有限公司
制冰机	IMS-20	雪科
酶标仪	Multiskan FC	赛默飞
微量高速离心机	TG16-W	湘仪离心机仪器有限公司
核酸定量仪	Qubit4.0	赛默飞

4.1.3 培养基及溶液

本章所用活化及发酵培养基配方同 2.1.4。其余溶液配方如下：

SP I-A: 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 21.4 g K_2HPO_4 , 12 g KH_2PO_4 , 2 g 柠檬酸三钠二水化合物, 去离子水定容至 1 L, 121℃灭菌 20 min;

SP I-B: 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 去离子水定容至 1 L, 121℃灭菌 20 min;

100×EGTA: 3.8 g EGTA, 去离子水定容到至 1 L, NaOH 水溶液调 pH 8.0, 121℃灭菌 20 min;

50 %葡萄糖溶液: 10 g 葡萄糖溶于 10 mL 去离子水, 0.22 μm 过滤除菌;

100×CAYE: 20 g 酪蛋白水解物, 100 g 酵母提取物, 去离子水定容至 1 L, 121℃灭菌 20 min;

50 mmol/L CaCl_2 : 5.55 g CaCl_2 , 去离子水定容至 1 L, 121℃灭菌 20 min;

250 mmol/L MgCl_2 : 23.75 g MgCl_2 , 去离子水定容至 1 L, NaOH 水溶液调 pH 8.0, 121℃灭菌 20 min;

SP I培养基: 0.98 mL SP I-A+ 0.98 mL SP I-B+ 20 μL 50 %葡萄糖+ 20 μL 100×CAYE;

SP II培养基: 1.96 mL SP I+ 20 μ L 50 mmol/L CaCl_2 + 20 μ L 250 mmol/L MgCl_2

4.2 实验方法

4.2.1 枯草芽孢杆菌的活化、生长曲线以及感受态的制备

活化方法参照 2.3.4 地衣芽孢杆菌的活化方法。

生长曲线的测定方法参照 2.2.1, 测量时适当稀释进而保持细胞光密度的数值在 0.5~0.1 之间。

枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备参照 Spizizen 法^[88], 从固体培养基中挑选单菌落, 接种到 2 mL SP I 培养基中, 在 37°C、220 rpm/min 条件下培养 12-16 h。随后, 取 40 μ L 菌液转接到新鲜的 SP I 培养基中, 在相同条件下培养 5 至 6 小时。接着, 取 200 μ L 菌液转接到 2 mL SP II 培养基中, 培养 1.5-2 h 后, 加入 20 μ L EGTA 溶液, 继续培养 10 min, 最终获得枯草芽孢杆菌的感受态细胞。

4.2.2 枯草芽孢杆菌全基因组与质粒的抽提

为获取用于后续 PCR 程序的模板, 需提取目的菌株及质粒的全基因组, 将目的枯草芽孢杆菌和含有目的质粒的菌株平板划线后挑取单菌落, 接种到 LB 液体培养基中活化培养至对数期, 随后, 分别使用细菌全基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒提取全基因组和目标质粒, 具体操作方法见说明书, 最后核酸定量仪检测产物浓度。

4.2.3 重组菌株(敲除和过表达)的构建

本章中所有菌株均采用同源重组技术进行构建, 具体流程为: 扩增出目的单片段, 运用重叠延伸 PCR(overlap PCR)技术获得融合片段, 后借助转化将重组片段整合到目的菌株的全基因组上。将重组片段与感受态细胞按比例混合后, 37°C, 220 rpm/min 培养 2-3 h 后涂布于抗性平板, 后挑取单菌落进行菌液 PCR 验证, 从而获得阳性克隆。引物采用 SnapGene 设计引物, 委托金斯瑞生物技术有限公司合成(表 4-3)。

根据相关文献, 发现 *abrB*、*codY*、*degU*、*sinR*、*spo0A* 和 *phrG* 这 6 个转录因子对产酶基因 *aprE* 的表达量均有一定的调控作用(图 4-1), 为比较其对 *aprE* 基因表达量的调控作用, 分别在枯草芽孢杆菌中过表达和敲除 *abrB*、*codY*、*degU*、*sinR*、*spo0A* 和 *phrG* 基因, 得到重组菌株 BS07-1, BS07-2, BS07-3, BS07-4、

BS07-5、BS07-6（过表达菌株）以及重组菌株 BS07-A, BS07-B, BS07-C, BS07-D、BS07-E、BS07-F（敲除菌株）（见表 4-6）。

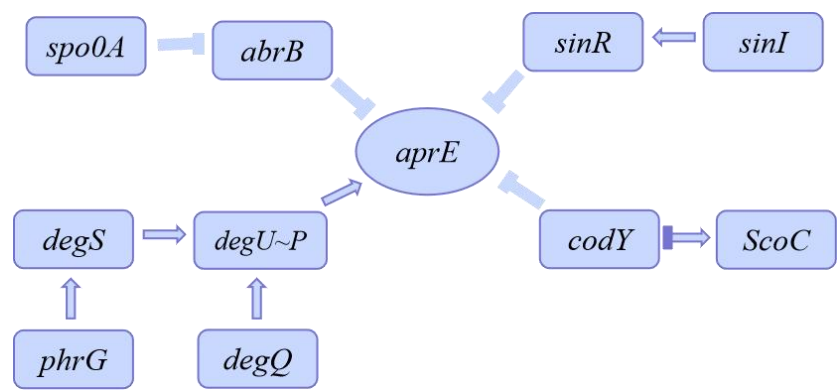


图 4-1 *aprE* 基因表达的正负调控网络简图（箭头表示促进，-|表示抑制）

Figure 4-1 Simplified Diagram of the Positive and Negative Regulatory Network of *aprEbl* Gene Expression

本章构建工程菌株所用引物如表 4-3。

表 4-3 本章所用引物

Table 4-3 Primers Used in This Chapter

引物	序列 (5'-3')
p43 <i>aprEbl</i> -L	ACCGTATAGAAAGCAAGCG
P43 <i>aprEbl</i> -L-B	ATTGTTATCCGCTCTCCTCCTCTTTATTCAGAATAA TTTAAATAGAAGGA
P43 <i>aprEbl</i> -L-U	ATTCTGAATAAAGAGGAGGAGAGCGGATAACAAT TTCACAC
P43 <i>aprEbl</i> -R-B	CCTCATCATTACTCACTCGTGTACATTCTCTCTTA CC
p43 <i>aprEbl</i> -R-U	AGAGAGGAATGTACACGAGTGAGTAATGATGAGG AAAAAGAG
p43 <i>aprEbl</i> -R	TTCGTTGGGTAAGTGCTGT
<i>abrB</i> -B	TCTGTCGTGCGGATAAAGT
<i>abrB</i> -L-B	GTGAAATTGTTATCCGCTCTCATTTCTTGTACAA AAAACGTTCTTGTTA
<i>abrB</i> -L-U	ACGTTTTTTGTACAAGAAATGAGAGCGGATAAC AATTCACAC
<i>abrB</i> -R-B	TATCTCTTGGGAGGAGACGAAAACATACCACCT ATCATACC
<i>abrB</i> -R-U	GGTGGTATGTTTTTCGTCTCCTCCCAAGAGATACT TATTTG
<i>abrB</i> -U	CGATTGCTGCGGAAGATAC

	引物	序列 (5'-3')
BS07-A	p43 <i>abrB</i> -B	CAGCAATCCGTATCTGCG
	p43 <i>abrB</i> -U	CTTGCTCACCATGCAATTAACCTCCTTTGCTG
	p43 <i>abrB</i> -L-B	GGAGGTTTTAATTGCATGGTGAGCAAGGGC
	p43 <i>abrB</i> -L-U	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	p43 <i>abrB</i> -R-B	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	p43 <i>abrB</i> -R-U	TCTTTTGCAATCTCTTTATGCAAGTTCAAGCGAA AA
BS07-2	<i>cody</i> -B	TCCTGTTAATACGGTCTTCAGC
	<i>cody</i> -L-B	TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGATAAATAATC CTCCTAAACATTCT
	<i>cody</i> -L-U	ATGAGGAATGTTTAGGAGGATTATTTATCGAGC GGATAACAATTTAC
	<i>cody</i> -R-B	CCTCAAAAAGGGTTCTTTTTGTGAGCGAAAACA TACCAC
	<i>cody</i> -R-U	GTATGATAGGTGGTATGTTTTCGCTCACAAAAA GAACCCT
	<i>cody</i> -U	GCCGAATGGTGAAGATGAG
BS07-B	p43 <i>cody</i> -B	CCTTCATTTCCGTCAAGCT
	p43 <i>cody</i> -U	GAGCCAGGAAGAAGCAAAC
	p43 <i>cody</i> -L-B	GTGAAATTGTTATCCGCTCGATAAATAATCCTC CTAAACATTCCTCAT
	p43 <i>cody</i> -L-U	AGGAATGTTTAGGAGGATTATTTATCGAGCGGA TAACAATTTACACA
	p43 <i>cody</i> -R-B	GTTTTTTGTAATAAAGCCATGTGTACATTCCTCT CTTACCTATAATGGT
	p43 <i>cody</i> -R-U	AGGTAAGAGAGGAATGTACACATGGCTTTATTA CAAAAAACAAGAATT
BS07-3	<i>degU</i> -B	TCCTAACGCACCTTCACC
	<i>degU</i> -L-B	ATCCCCGGGTATAATAGGAGACTTGCCTTTTA CTAGG
	<i>degU</i> -L-U	GGCAAGTCTCCTATTATAACCCGGGGATCCTCT GAGGCGTGGCTTAGGGTGATGTTTGTGAGTTAT
	<i>degU</i> -R-B	TAAAT
	<i>degU</i> -R-U	ACATCACCTAAGCCACGCCTCCT
	<i>degU</i> -U	CAGGTAGAATTGACGATGATCCA

	引物	序列 (5'-3')
BS07-C	p43degU-B	CACTTCACATTCCCGCCTA
	p43degU-L-B	CGCTCAAGCCACGCCTCCT
	p43degU-L-U	GCGTGGCTTGAGCGGATAACAATTTACAC
	p43degU-R-B	ACTTTAGTCACCAGTGCCAAGCTTGCAT
	p43degU-R-U	GCTTGGCACTGGTGACTAAAGTAAACATTGTTA TTATCGACG
	p43degU-U	GCAGGTAGAATTGACGATGAT
BS07-4	sinR-B	GGTACGCTTGATTTATCTGCT
	sinR-L-B	GAAATTGTTATCCGCTCTGTCATCACCTTCCTTG TG
	sinR-L-U	GGAAGGTGATGACAGAGCGGATAACAATTTCA CAC
	sinR-R-B	CTGCTCAGGCAAATGGCTGTATTTAAAAGTTCA AGC
	sinR-R-U	ACAGCCATTTGCCTGAGCAGAGGCA
	sinR-U	CAAATCCGCTATGCAGGAG
BS07-D	p43sinR-B	TTGCCAGCGACGATTCCA
	p43sinR-F-B	CCTTGCTCACCATATTATGGCCTCCATCCTTTTT C
	p43sinR-F-U	ATGGAGGCCATAATATGGTGAGCAAGGGC
	p43sinR-R-B	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	p43sinR-R-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	p43sinR-U	CGTCTGTTTTCTGACTCATGTTCAAGCGAAAAC ATACCAC
BS07-5	spo0A-B	AAGCCTTATGCTCTAACCTCA
	spo0A-L-B	TGCTATACGAACGGTATTCTTCCTCCCCAAATGT AGTTAAC
	spo0A-L-U	ACTACATTTGGGGAGGAAGAATACCGTTCGT
	spo0A-R-B	AACACAAACTTTAATTTTCTCCACGTAAAACAT ACCACCTATCAT
	spo0A-R-U	CGGTATGATAGGTGGTATGTTTTACGTGGAGAA AATTAAAGTTTGTG
	spo0A-U	TATTCTTCAACTAAAGCACCCA
BS07-E	p43spo0A-B	GGTAATACCGCCATTTGCT
	p43spo0A-F-B	TGTTATCCGCTCGTTTCTTCCTCCCCAAATGTAG

引物	序列 (5'-3')
p43 <i>spo0A</i> -F-U	GGGAGGAAGAAACGAGCGGATAACAATTTTCAC ACA
p43 <i>spo0A</i> -R-B	ACAAACTTTTAATTTTCTCCACGTGTACATTCTC TCTTACCTATAATGG
p43 <i>spo0A</i> -R-F	AGAGGAATGTACACGTGGAGAAAATTAAAGTTT GTGTTGC
p43 <i>spo0A</i> -U	AACGAAGCTGATCCCAGAA
<i>phrG</i> -B	TCCAATGCTCGTTCTTCCT
<i>phrG</i> -L-B	TGCTATACGAACGGTATTATATAACCTCCGTTC GTTTAATCAGTT
<i>phrG</i> -L-U	ACGGAGGTTATATAATACCGTTCGTATAGCATA CATTATACGAAGTTATG
<i>phrG</i> -R-B	GGGGGTTTTTTCATACATACCACCTATCATACCGT TCG
<i>phrG</i> -R-U	AACGGTATGATAGGTGGTATGTATGAAAAACCC CCG
<i>phrG</i> -U	GAAGTGCGCCACAAGGTTT
p43 <i>phrG</i> -B	TCCAATGCTCGTTCTTCCT
p43 <i>phrG</i> -F-B	GTGAAATTGTTATCCGCTCATATAACCTCCGTTC GTTTAATCAG
p43 <i>phrG</i> -F-U	CGAACGGAGGTTATATGAGCGGATAACAATTTTC ACAC
p43 <i>phrG</i> -R-B	TCAGAAATCTTTTCATTTTGCATGCCTGCAGGT
p43 <i>phrG</i> -R-U	GCAGGCATGCAAAATGAAAAGATTTCTGATTGG CG
p43 <i>phrG</i> -U	GTTGAAGAATCCTCCCGTTTA

PCR 体系见表 4-4。

表 4-4 PCR 体系 (50 μ L)
Table 4-4 PCR System (50 μ L)

组分	用量
上游引物	2 μ L
下游引物	2 μ L
模板 DNA	1 μ L
DNA Polymerase	25 μ L
ddH ₂ O	补足至 50 μ L

PCR 程序见表 4-5。

表 4-5 PCR 运行程序
Table 4-5 PCR Running Program

阶段	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 s	
退火	55°C	5 s	34
延伸	72°C	1 kb/10 s	
终延伸	72°C	5 min	1
保存	4°C	∞	

本章构建的菌株见表 4-6。

表 4-6 本章所涉及的菌株
Table 4-6 The strains covered in this chapter

名称	特征	来源
<i>Bs.168</i> $\Delta aprE$	<i>aprE</i> 缺陷型	实验室储存
BSA	<i>aprEbl</i> 异源表达; pHY-p43- <i>aprEbl</i>	第二章构建
BS07	BSA 定点突变菌株; S265H/S267F	第二章构建
BS07-0	BS07 衍生菌株; p43- <i>aprEbl</i>	本章
BS07-1	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>abrB</i>	本章
BS07-2	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>codY</i>	本章
BS07-3	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>degU</i>	本章
BS07-4	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>sinR</i>	本章
BS07-5	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>spo0A</i>	本章
BS07-6	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>phrG</i>	本章
BS07-A	BS07 衍生菌株; $\Delta abrB::$ C _r ^m	本章
BS07-B	BS07 衍生菌株; $\Delta codY::$ C _r ^m	本章
BS07-C	BS07 衍生菌株; $\Delta degU::$ C _r ^m	本章
BS07-D	BS07 衍生菌株; $\Delta sinR::$ C _r ^m	本章
BS07-E	BS07 衍生菌株; $\Delta spo0A::$ C _r ^m	本章
BS07-F	BS07 衍生菌株; $\Delta phrG::$ C _r ^m	本章
BS07-03A	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>degU</i> / $\Delta abrB::$ C _r ^m	本章
BS07-03D	BS07 衍生菌株; C _r ^m -p43- <i>degU</i> / $\Delta sinR::$ C _r ^m	本章

名称	特征	来源
BS07-06A	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>abrB</i> :: C_r^m	本章
BS07-06D	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>sinR</i> :: C_r^m	本章
BS07-036A	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>degU</i> / C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>abrB</i> :: C_r^m	本章
BS07-036D	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>degU</i> / C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>sinR</i> :: C_r^m	本章
BS07-03AD	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>degU</i> / Δ <i>abrB</i> :: C_r^m / Δ <i>sinR</i> :: C_r^m	本章
BS07-06AD	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>abrB</i> :: C_r^m / Δ <i>sinR</i> :: C_r^m	本章
BS07-036AD	BS07 衍生菌株; C_r^m -p43- <i>degU</i> / C_r^m -p43- <i>phrG</i> / Δ <i>abrB</i> :: C_r^m / Δ <i>sinR</i> :: C_r^m	本章
p7C6	Pmd18-T 包含 <i>lox71-zeo-lox66</i> 片段	实验室储存

4.2.4 氯霉素抗性的祛除

首先按照 4.2.1 制备感受态细胞的方式将含有抗性的重组菌株制成感受态细胞, 将 *cre* 质粒导入感受态细胞后, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的抗性平板上筛选阳性克隆。随后, 将阳性克隆接种至含卡那霉素和 IPTG 的 LB 培养基中, 在 37°C、220 rpm/min 条件下培养 10-12 h 以去除氯霉素抗性。接着, 将去除氯霉素抗性的重组菌株再次接种至 LB 培养基中, 于 50°C、220 rpm/min 条件下培养 12 h, 使菌株中的 *cre* 质粒通过高温自溶作用得以消除。

4.2.5 荧光强度的测定

挑取重组菌株的单菌落转接到 LB 培养基中, 在 37°C、220 rpm/min 下培养至对数期, 按照 2%接种到含有 50 mL LB 液体培养基的锥形瓶中。每 2 h 取样检测 eGFP 的荧光强度。用多功能酶标仪在激发波长为 490 nm, 发射波长为 530nm, 增益为 60 的条件下, 检测菌液的荧光强度。

4.2.6 摇瓶发酵及酶活测定

发酵参考方法 3.3.3，按照 2 %的接种量接到盛有装液量为 50 mL 摇瓶中，37℃的条件下培养 48 h。

碱性蛋白酶酶活的测定方法参照 2.2.5。

蛋白含量的测定方法参考 3.2.4，采用 BSA 法。

4.3 实验结果

4.3.1 AprEbl 过表达菌株的构建

为了进一步提升碱性蛋白酶 AprEbl 的产量，在 BS07 的基础上，将突变后的 AprEbl 序列插入 BS07 全基因组中原本枯草杆菌蛋白酶 E 所在的位置并过表达，加上 BS07 本身携带 pHY-p43-*aprEbl* 质粒，即实现了对 *aprEbl* 的双重过表达，增加其表达量，得到 BS07-0（图 4-2）。

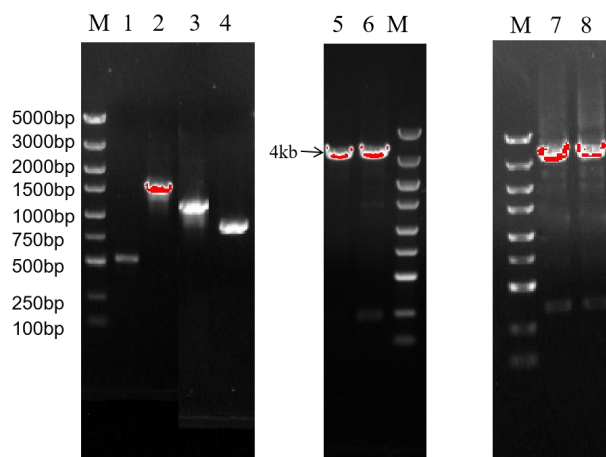


图 4-2 BS07-0 的 PCR 鉴定

Figure 4-2 Identification of recombinant strain BS07-0

泳道 1: *aprEbl* 上游; 泳道 2: P43+C_r^m; 泳道 3: *aprEbl* 基因片段; 泳道 4: eGFP 片段; 泳道 5,6: 融合片段 泳道 7,8: 菌液 pcr 验证

4.3.2 过表达菌株的构建

以过表达 *abrB* 为例，具体操作为：以枯草芽孢杆菌 BS07 基因组为模板，扩增得到目的片段 *abrB* 及其上游片段，再以质粒 p7C6 为模板，扩增得到氯霉素抗性片段 C_r^m 和强启动子 P43，再利用融合 PCR 的方法获得重组片段 C_r^m-P43-*abrB*，通过 spizizen 化学法插入 BS07 基因组，涂布于氯霉素抗性平板，

筛选阳性克隆子并进行菌液 pcr 验证，最终获得重组菌株 BS07-1、BS07-2（图 4-3），同理，即可得到 BS07-3、BS07-4（图 4-4）以及 BS07-5、BS07-6（图 4-5）。

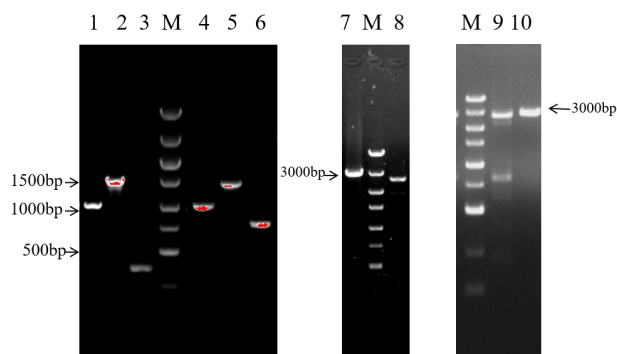


图 4-3 BS07-1、BS07-2 的 PCR 鉴定

Figure 4-4 PCR Identification of BS07-1, BS07-2, BS07-3 and BS07-4

M: 5000bp DNA 对照;泳道 1: *abrB* 上游;泳道 2: P43+ C_r^{m} ;泳道 3: *abrB* 片段;泳道 4: *codY* 上游;泳道 5: P43+ C_r^{m} ;泳道 6: *codY* 片段;泳道 7, 8: 对应的融合片段;泳道 9, 10: 对应的菌液 pcr 鉴定

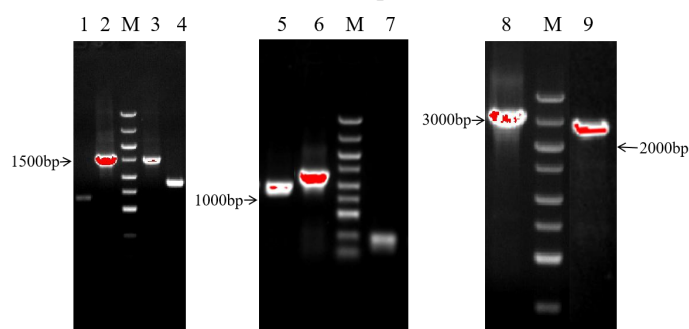


图 4-4 BS07-3、BS07-6 的 PCR 鉴定

Figure 4-4 PCR Identification of BS07-3, BS07-6

M: 5000bp DNA 对照,泳道 1: *degU* 上游;泳道 2,3: P43+ C_r^{m} ;泳道 4: *degU* 片段;泳道 5: *phrG* 上游;泳道 6: P43+ C_r^{m} ;泳道 7: *phrG* 片段,泳道 8,9: BS07-3、BS07-6 的菌液 pcr 鉴定

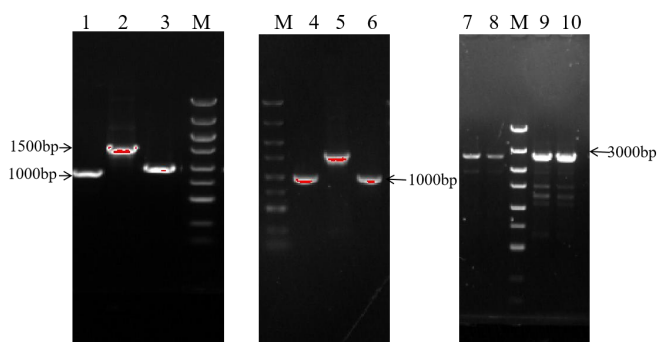


图 4-5 BS07-4、BS07-5 的 PCR 鉴定

Figure 4-5 PCR Identification of BS07-5, BS07-6

M: 5000bp DNA 对照,泳道 1: *sinR* 上游,泳道 2: P43+ C_r^{m} ;泳道 3: *sinR* 片段;泳道 4: *spo0A* 上游,泳道 5: P43+ C_r^{m} ;泳道 6: *spo0A* 片段,泳道 7,8: 对应的融合片段;泳道 9,10: 对应的菌液 pcr 鉴定

4.3.3 敲除菌株的构建

以敲除 *abrB* 为例，具体操作为：以枯草芽孢杆菌 BS07 基因组为模板，扩增得到 *abrB* 上游片段及 *abrB* 下游片段，再以质粒 p7C6 为模板，扩增得到氯霉素抗性片段 C_r^m ，三片段融合后获得重组片段 *abrB*-L- C_r^m -*abrB*-B，通过 spizizen 化学法将其转入 BS07 基因组，涂布于氯霉素抗性平板，筛选阳性克隆后进行菌液 pcr 验证，即获得重组菌株 BS07-A、BS07-B（图 4-6），同理即可得 BS07-C、BS07-D（图 4-7）以及 BS07-E、BS07-F（图 4-8）。

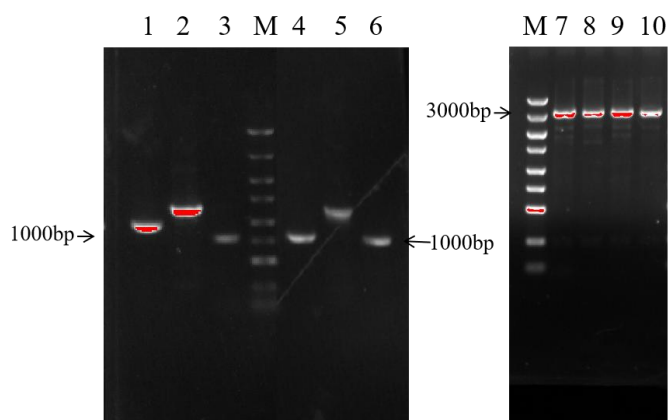


图 4-6 BS07-A、BS07-B 的 PCR 验证

Figure 4-5 PCR Identification of BS07-A、BS07-B

M: 5000bp DNA 对照;泳道 1: *abrB* 上游; 泳道 2: C_r^m 片段; 泳道 3: *abrB* 下游; 泳道 4: *codY* 上游; 泳道 5: C_r^m 片段; 泳道 6: *codY* 下游; 泳道 7, 8: 对应的融合片段; 泳道 9, 10: 对应的菌液 pcr 鉴定

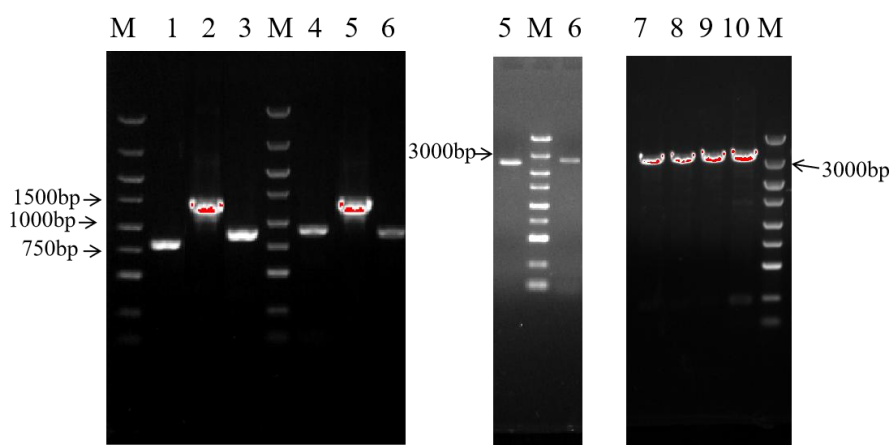


图 4-7 BS07-C、BS07-D 的 PCR 验证

Figure 4-6 PCR Identification of BS07-C、BS07-D

M: 5000bp DNA 对照, 泳道 1: *degU* 上游; 泳道 2: C_r^m 片段; 泳道 3: *degU* 下游, 泳道 4: *sinR* 上游, 泳道 5: C_r^m 片段; 泳道 3: *sinR* 下游; 泳道 7, 8: 对应的融合片段; 泳道 9, 10: 对应的菌液 pcr 鉴定

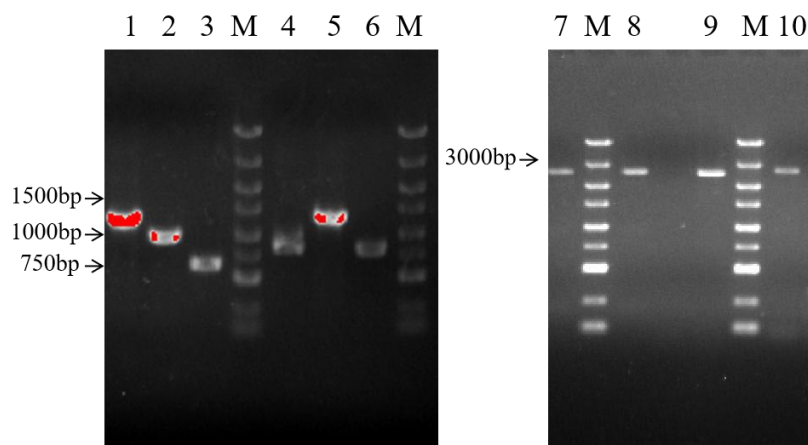


图 4-8 BS07-E、BS07-F 的 PCR 验证

Figure 4-7 PCR Identification of BS07-E、BS07-F

M: 5000bp DNA 对照, 泳道 1: *spo0A* 上游, 泳道 2: C_r^m 片段; 泳道 3: *spo0A* 下游, 泳道 4: *phrG* 上游; 泳道 5: C_r^m 片段; 泳道 7: *phrG* 下游, 泳道 7,8: 对应的融合片段; 泳道 9,10: 对应的菌液 pcr 鉴定

4.3.4 工程菌株的酶活测定及分析

将 4.3.2 和 4.3.3 所构建的菌株活化后发酵, 发酵方法参考 2.2.6, 所得发酵液根据 2.2.3 和 3.2.4 测定酶活性及含量, 活性结果如图所示 (图 4-9), 可以看出对 *aprEbl* 过表达对最终酶活有明显提升, 为 829.33 U/mL, 较原始菌株 BS07 提升了 27.33%。就转录因子来说, 明显看出, 过表达 *degU* 和 *phrG*, 很大程度上增加了 *aprEbl* 的产量, 分别提升了 39.68%和 22.50%, 最终酶活为 909.84 U/mL 和 797.90 U/mL。而敲除 *abrB* 或 *sinR* 也能一定程度上提升 *aprEbl* 的表达量, 最终酶活为 737.32 U/mL 和 733.49 U/mL。可以看出, 相较于敲除负面抑制因子, 增强激活因子的表达更能提升 *AprEbl* 的表达量。除此以外, 其余工程菌株的碱性蛋白酶产量均有不同程度的下降。过表达 *sinR* 能使酶活下降 30%以上, 说明 *sinR* 对 *aprEbl* 的抑制作用极强。另外, 通过蛋白含量及相对基因表达水平 (假定初始菌株 BS07 的表达量为 1) 的结果来看 (表 4-7), 与酶活测定相应。

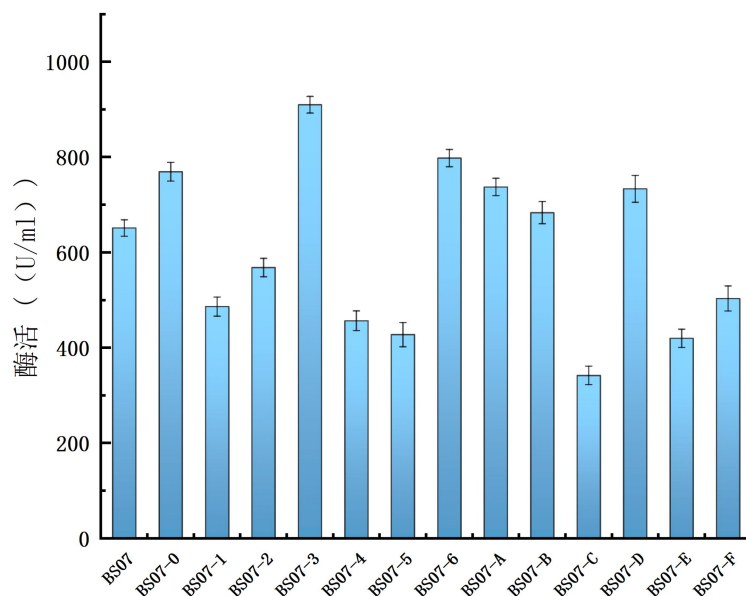


图 4-9 工程菌株的酶活

Figure 4-9 Enzyme Activity of the Engineered Strain

表 4-7 单因子调控工程菌株蛋白含量及基因表达水平

Table 4-7 Single factor regulation of protein content and gene expression level of engineered strains

菌株	蛋白含量/mg	相对基因表达水平
BS07	7.24	-
BS07-0	8.55	1.18
BS07-1	5.41	0.75
BS07-2	6.32	0.87
BS07-3	10.12	1.40
BS07-4	5.08	0.70
BS07-5	4.75	0.66
BS07-6	8.87	1.23
BS07-A	8.20	1.13
BS07-B	7.60	1.05
BS07-C	3.80	0.53
BS07-D	8.16	1.13
BS07-E	4.67	0.64
BS07-F	5.60	0.77

另外发现无论是敲除, 还是过表达 *spo0A* 都会降低蛋白酶的表达量, 推测是由于 *spo0A* 是菌株芽孢形成的关键调控因子, 将其过表达会促使细胞过早进入芽孢形成阶段, 细胞快速生长且稳定期缩短, 菌体优先将资源分配给 *spo0A* 调控的生存相关通路, 导致 *aprEbl* 的转录和翻译效率下降。而敲除 *spo0A* 会导致 *degU*

磷酸化进程受阻，间接影响了 *aprEbl* 的表达量，另外敲除 *spo0A* 也会导致细胞无法正常进入孢子形成阶段，提前凋亡，从而缩短产酶期（图 4-10）。

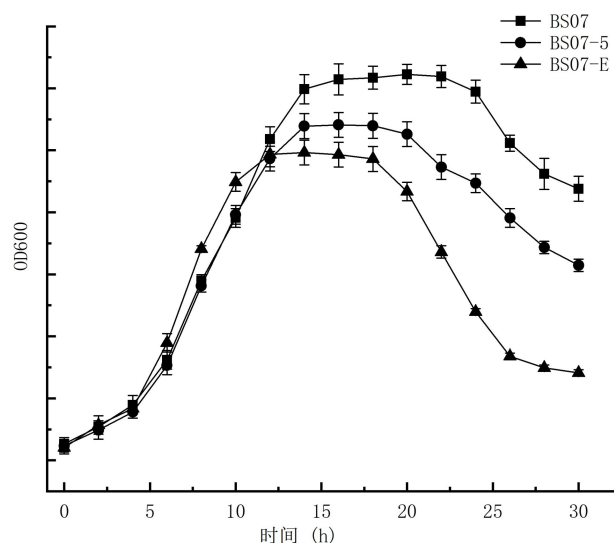


图 4-10 BS07、BS07-5、BS07-E 的生长曲线

Figure 4-10 Growth curves of BS07, BS07-5, and BS07-E

4.3.5 整合表达及酶活测定

根据前期酶活测定结果，明确过表达 *aprEbl* 能够稳定提升蛋白酶的表达量，且过表达 *degU*、*phrG* 和敲除 *abrB*、*sinR* 对酶活性的提升有明显作用，根据方法 4.3.4 祛除 BS07-0，BS07-3，BS07-6，BS07-A，BS07-D 所携带的氯霉素抗性，再根据方法 4.3.3 构建复合工程菌株，在 BS07-0 的基础上继续构建工程菌株，即以 BS07-0 为受体细胞构建 BS07-03A，BS07-03D，BS07-06A，BS07-06D，BS07-036A，BS07-016D，BS07-03AD，BS07-06AD，BS07-036AD（见表 4-6）探究多因子协同效应对碱性蛋白酶产量的变化。

根据方法 2.2.5 测定 4.3.5 各工程菌株的酶活，结果如图所示（图 4-10），复合调控在不同程度上增加了 *aprEbl* 的表达量，其中 BS07-036D 表现最为突出，酶活高达 1561.74 U/mL，较原菌 BS07(651.333U/mL)上升了 239.78%。较 BS07-0 上升了 188.31%。此外，BS07-036A、BS07-036D 的相较原菌酶活提升了 205.4% 和 239.78%，而 BS07-03AD，BS07-06AD 则提升了 173.3%和 164.87%。而蛋白含量的测定及相对基因表达水平（假定 BS07-0 的基因表达水平为 1）的测定结果也反映了这一点（表 4-8），但并非一味地加强正向调控和敲除抑制因子就可以大幅提升蛋白表达量。例如菌株 BS07-036AD，在过表达 *degU* 和 *phrG* 的同时

敲除 *sinR* 和 *abrB* 会扰乱群体感应信号通路，加重菌株的代谢负担，影响细胞的个体发育及群体状态，导致蛋白酶产量降低。

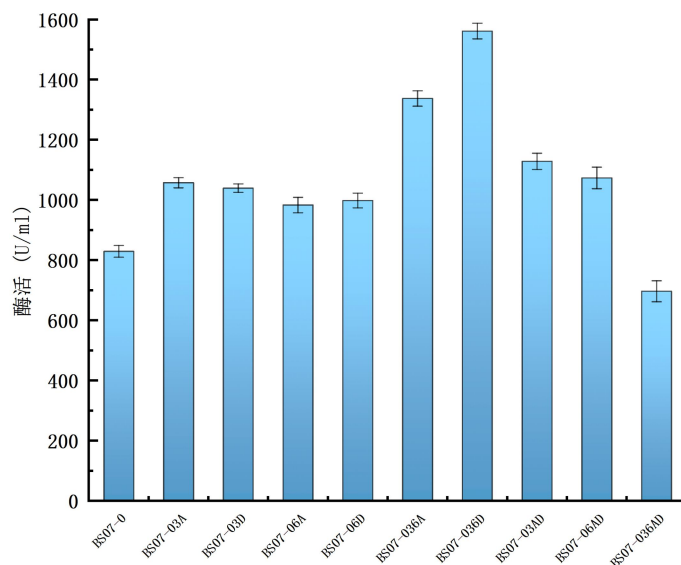


图 4-10 多因子调控的工程菌株的酶活

Figure 4-10 Enzyme activity of engineered strains regulated by multiple factors

表 4-8 多因子调控工程菌株蛋白含量及基因表达水平

Table 4-8 Multi-factor regulation of protein content and gene expression levels of engineered strains

菌株	蛋白含量/mg	相对基因表达水平
BS07-0	9.35	-
BS07-03A	11.76	1.28
BS07-03D	11.56	1.25
BS07-06A	10.93	1.19
BS07-06D	11.10	1.20
BS07-036A	13.87	1.61
BS07-036D	17.24	1.88
BS07-03AD	12.55	1.36
BS07-06AD	11.14	1.29
BS07-036AD	8.47	0.92

4.4 本章小结

本研究通过敲除和过表达枯草芽孢杆菌中关键调控因子 (*abrB*、*codY*、*degU*、*sinR*、*spo0A*、*phrG*)，探究其对碱性蛋白酶 AprEbl 分泌表达的调控作用力度，并整合正向调控策略优化生产菌株。通过敲除与过表达操作，发现过表达 *degU* 和 *phrG* 可显著提升酶活，分别达到 39.68% 和 22.50%，敲除 *abrB* 和 *sinR* 也能在一定程度上促进酶活提升。后续对正向调控进行整合表达，构建的九株菌中，

BS07-036D 表现最为突出，酶活高达 1561.74 U/mL，整合策略验证了多层级调控网络的叠加效应，表明增强激活因子（如 *degU*、*phrG*）与解除抑制因子（如 *abrB*、*sinR*）的协同作用可最大化 *aprEbl* 表达。而 *spo0A* 作为芽孢杆菌生长过程中的核心调控节点，通过协调芽孢形成与稳定期代谢间接调控 *aprEbl*，而 *degU* 通过磷酸化则能够直接激活 *aprEbl* 转录，为进一步提升碱性蛋白酶产量、优化枯草芽孢杆菌代谢工程提供了理论依据与实践指导。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

本研究围绕碱性蛋白酶的高效生产及性能优化,以野生地衣芽孢杆菌及其碱性蛋白酶 AprEbl 为研究对象,通过多层递进式策略,从菌株诱变选育、酶分子热稳定性改造到代谢调控网络优化,系统实现了碱性蛋白酶产量、稳定性及工业适用性的全面提升,形成了一套完整的微生物酶制剂开发技术体系。

首先,以野生地衣芽孢杆菌 B66 为基础,运用 LiCl 辅助 ARTP 多轮迭代诱变技术,成功构建了高质量的突变菌株库。其中,突变株 B66-1 表现尤为突出,其产酶量从原始菌株 B66 的 451.36 ± 2.27 U/mL 提升至 801.21 ± 1.37 U/mL,涨幅高达 77.51%。同时,连续五代传代实验结果显示,其酶活波动始终稳定在 $\pm 3.5\%$ 的极小范围内,有力证实了高产性状具有高度的遗传稳定性。这一成果不仅验证了 LiCl 与 ARTP 复合诱变体系的显著协同增效作用,更为工业化生产提供了极具潜力的优质菌种。

其次,在上述基础上深入到分子层面,将野生菌株的高效产酶基因在更为安全的菌株系统中表达,再借助计算机辅助理性设计手段,提升 AprEbl 蛋白酶的热稳定性。通过分子动力学模拟、B-factor 分析以及虚拟饱和突变等方法,成功定向构建了 N183W、G186I、S265H、S267F、Y320W 五个单点突变体以及复合突变体 N183W/G186I, S265H/S267F。实验结果表明,所有突变体的热稳定性均得到了提升。其中,双突变体 S265H/S267F 表现最为优异,在 55°C 和 75°C 条件下,其半衰期相较于野生型分别提升了 6.35 倍和 4.01 倍,且比活力与野生型基本保持一致。这一成果为高温环境下碱性蛋白酶的应用开辟了全新策略,结合其本身具备的较高的催化活性,有望大幅降低工业生产成本,显著提升生产效率。

最后,针对枯草芽孢杆菌代谢中的重要调控因子(*abrB*、*codY*、*degU*、*sinR*、*spo0A*、*phrG*)展开了系统的研究。通过精准的敲除和过表达实验,探究了这些调控因子对碱性蛋白酶 AprEbl 分泌表达的调控作用的亲疏。研究发现,过表达

degU 和 *phrG* 分别能够使酶活提升 39.68% 和 22.50%，而敲除 *abrB* 和 *sinR* 也能在一定程度上促进酶活的上升。在整合正向调控策略后，构建的九株菌中，BS07-036D 菌株的酶活高达 1561.74 U/mL，充分验证了多层级调控网络的叠加效应。这一结果揭示了解除抑制因子（如 *abrB*、*sinR*）与增强激活因子（如 *degU*、*phrG*）的协同作用能够最大化 *aprEbl* 表达，为提升碱性蛋白酶产量以及优化枯草芽孢杆菌发酵工艺提供了坚实的理论基础与实践指导。

本研究通过菌种诱变、蛋白分子改造和基因调控三个层面的递进研究，建立了完整的碱性蛋白酶改良技术体系。实验结果表明，该技术路线提高了碱性蛋白酶的催化性能和产量，为其工业化生产提供了可靠的技术支持，具有一定的应用价值。

5.2 展望

基于本研究在碱性蛋白酶性能提升及产量优化方面所取得的成果，针对优质耐热酶高产菌株 BS07-036D，可进一步开展中试及大规模发酵生产试验。通过优化发酵工艺参数，实现高产菌株在工业化规模下的稳定高效生产。此外，对于热稳定性显著提升的突变体，可针对性地开发适配高温环境的工业生产新工艺，充分发挥其在高温条件下的催化优势。

另外，本研究仅针对蛋白酶的热稳定性进行了优化，可考虑借助计算机辅助技术，结合更高精度的结构预测模型，拓展对碱性蛋白酶结构与功能关系的认知，为设计更多性能优异的突变体提供技术支撑。同时，将这些先进的分子设计技术与合成生物学手段相结合，构建更加高效的基因表达系统和细胞工厂，实现碱性蛋白酶高效的定制化生产。

参考文献

- [1]郝漫, 邵岚莹, 公为峰, 等. 耐热碱性蛋白酶 AH-101 的异源表达、酶学性质与洗涤应用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2024,44(04):23-32.
- [2]李静, 张剑, 赵永祥. 金属离子对蛋白酶作用的研究进展[J]. 日用化学工业, 2017,47(06):345-351.
- [3]Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002,59(1):15-32.
- [4]叶佳颖. 碱性蛋白酶高产菌株的选育及发酵工艺优化[D]. 山东农业大学, 2024.
- [5]Kumar C G, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint[J]. Biotechnol Adv, 1999,17(7):561-594.
- [6]Rao M B, Tanksale A M, Ghatge M S, etc. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998,62(3):597-635.
- [7]郝漫, 惠威, 邵岚莹, 等. 通过失活 Sec 途径阻遏蛋白和胞外蛋白酶提高地衣芽孢杆菌产碱性蛋白酶的能力[J]. 中国生物工程杂志, 2024,44(Z1):39-47.
- [8]Contesini F J, Melo R R, Sato H H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application[J]. Crit Rev Biotechnol, 2018,38(3):321-334.
- [9]李玉环, 张岩, 时威. 枯草芽孢杆菌 HS18 碱性蛋白酶分离纯化及其性质研究[J]. 食品工业科技, 2012,33(19):187-190.
- [10]肖昌松, 吕健, 田新玉, 等. 嗜碱芽孢杆菌 XE22-4-1 碱性弹性蛋白酶发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 2001(05):611-616.
- [11]吴日帮, 陈晨, 方博文, 等. 米曲霉蛋白酶基因与酶学特性研究进展[J]. 中国酿造, 2024,43(04):8-13.
- [12]刘占. 酱油酿造中蛋白酶系的研究进展[J]. 现代食品, 2017(05):34-36.
- [13]杨胜远, 陆兆新. 微生物低温碱性蛋白酶的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2004(04):93-98.
- [14]代雯, 黄业传, 韩佳钰, 等. 不同 pH 值对木瓜蛋白酶活性的影响及分子机制[J]. 肉类研究, 2024,38(10):9-14.

- [15]陈柳. 茎菠萝蛋白酶与富含苯丙氨酸碱性蛋白(PP)相关性的初步研究[J]. 数字化用户, 2013,19(06):110.
- [16]周惠颖. 碱性蛋白酶 AprE 高产和低产突变株定向筛选及基因组学分析[D]. 天津科技大学, 2021.
- [17]谢承佳, 王雪. 微生物碱性蛋白酶的性质研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2009(34):70-71.
- [18]叶思帆, 赵媛. 微生物源碱性蛋白酶的生产及其应用[J]. 青海科技, 2018,25(02):73-76.
- [19]郝漫, 邵岚莹, 公为峰, 等. 耐热碱性蛋白酶 AH-101 的异源表达、酶学性质与洗涤应用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2024,44(04):23-32.
- [20]王朋辉, 王伟贤, 杨涛, 等. 碱性蛋白酶洗涤性能的影响因素[J]. 日用化学工业, 2021,51(11):1109-1117.
- [21]陈焕钦, 邱学青, 杨卓如. 碱性蛋白酶与表面活性剂的协同去污性能研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1995(05):25-30.
- [22]许伟, 郝丽芬. 酶脱毛应用研究进展及前景展望[J]. 皮革科学与工程, 2009,19(05):28-32.
- [23]甜甜, 李敬, 雷元华, 等. 响应面法优化牛皮酶法脱毛工艺[J]. 肉类工业, 2020(04):30-39.
- [24]杜俊岭, 崔妍, 韩继刚, 等. 脱毛碱性蛋白酶的纯化及其生化特性研究[J]. 河北农业大学学报, 2004(03):36-40.
- [25]刘永清, 李小波, 刘厚霞, 等. 驴皮低温酶解脱毛方法及其对阿胶质量的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2021,42(04):98-102.
- [26]程晓芳, 袁丹丹, 张余慧, 等. 蛋白酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018,39(07):221-224.
- [27]张明一, 孙庆杰, 杨洁. 芽孢杆菌蛋白酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024,45(13):352-359.
- [28]胡晓倩, 桂子康, 邓军伟, 等. 大豆发酵食品毛豆腐中活性肽的制备及功效评价[J]. 中国食品学报, 2023,23(03):217-228.
- [29]许新月, 李昶, 崔文玉, 等. 复合酶解蛋白质工艺在食品工业中的应用及研

- 究进展[J]. 食品工业, 2020,41(12):264-267.
- [30] 于书坤. 饲料蛋白酶的最新研究与应用进展[J]. 饲料工业, 2019,40(10):22-26.
- [31] 苗华彪, 胡懋, 吴倩. 体外法评估饲用蛋白酶酶学性质、稳定性和酶解效果[J]. 饲料研究, 2020,43(12):80-84.
- [32] 祁姣姣, 靳改改, 周秀芬, 等. 蛋白酶及禽用复合蛋白酶体外评估[J]. 饲料研究, 2021,44(07):107-110.
- [33] 马文锋, 陈晓晨, 刘芦鹏, 等. 饲用蛋白酶分类及在养猪生产中的应用[J]. 中国饲料, 2019(23):18-20.
- [34] 周宇朦, 孙洪浩, 吕福军. 碱性蛋白酶酶解豆粕及其品质改善的研究[J]. 现代畜牧兽医, 2022(07):16-19.
- [35] Gupta S, Alrabaiah H, Christophe M, etc. Evaluation of silk-based bioink during pre and post 3D bioprinting: A review[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2021,109(2):279-293.
- [36] Wang T, Li Y, Liu J, etc. Intraarticularly injectable silk hydrogel microspheres with enhanced mechanical and structural stability to attenuate osteoarthritis[J]. Biomaterials, 2022,286:121611.
- [37] 赵小华, 吴桂英, 寇贺红, 等. 利用酶解法测定复合维生素溶液中维生素 A 含量的研究[J]. 饲料工业, 2010,31(06):51-53.
- [38] 冯菲, 权淑静, 刘丽, 等. 高产蛋白酶菌株的分离、鉴定及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2021,40(07):148-152.
- [39] Wang H Y, Liu D M, Liu Y, etc. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing[J]. Lett Appl Microbiol, 2007,44(1):1-6.
- [40] 王晓云, 王慧, 赵燕, 等. 紫外诱变选育高活性蛋白酶枯草芽孢杆菌及其降解饲料能力评价[J]. 中国水产科学, 2016,23(06):1351-1357.
- [41] 李怡欣, 付刚, 马媛媛, 等. 碱性蛋白酶 SubC 在枯草芽孢杆菌中的高效异源表达[J]. 微生物学通报, 2021,48(10):3409-3420.
- [42] Zhou C, Zhou H, Zhang H, etc. Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*[J]. Microb Cell Fact, 2019,18(1):127.

- [43]Bi J, Jing X, Wu L, etc. Computational design of noncanonical amino acid-based thioether staples at N/C-terminal domains of multi-modular pullulanase for thermostabilization in enzyme catalysis[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021,19:577-585.
- [44]耿嘉宝. 牦牛头蹄脱毛工艺及其胶原蛋白的初步研究[D]. 兰州理工大学, 2021.
- [45]梁玉朋, 刘泳, 张文杰, 等. 高温制粒对猪颗粒饲料质量及饲喂效果的影响[J]. *饲料工业*, 2023,44(17):42-46.
- [46]刘义绘. 蚕丝的高温高压脱胶及纯棉织物的丝胶整理[D]. 苏州大学, 2007.
- [47]Li M, Yang R, Guo J, etc. Optimization of IspS(ib) stability through directed evolution to improve isoprene production[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2023,89(10):e121823.
- [48]Oyama K, Nakakido M, Ohkuri T, etc. Enhancing thermal stability in the CH(2) domain to suppress aggregation through the introduction of simultaneous disulfide bonds in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Sci*, 2023,32(12):e4831.
- [49]Karray A, Alonazi M, Horchani H, etc. A Novel Thermostable and Alkaline Protease Produced from *Bacillus stearothermophilus* Isolated from Olive Oil Mill Sols Suitable to Industrial Biotechnology[J]. *Molecules*, 2021,26(4).
- [50]Miao H, Xiang X, Han N, etc. Improving the Thermostability of Serine Protease PB92 from *Bacillus alcalophilus* via Site-Directed Mutagenesis Based on Semi-Rational Design[J]. *Foods*, 2023,12(16).
- [51]王馨叶. 普鲁兰酶催化效率强化的分子改造及其分泌表达调控[D]. 江南大学, 2019.
- [52]Zhang J, Liao D, Chen R, etc. Tuning an Imine Reductase for the Asymmetric Synthesis of Azacycloalkylamines by Concise Structure-Guided Engineering[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022,61(24):e202201908.
- [53]Zhang Y, Ling Z, Du G, etc. Improved Production of Active *Streptomyces griseus* Trypsin with a Novel Auto-Catalyzed Strategy[J]. *Sci Rep*, 2016,6:23158.
- [54]Demain A L, Adrio J L. Contributions of microorganisms to industrial biology[J]. *Mol Biotechnol*, 2008,38(1):41-55.

- [55]熊海涛, 韦宇拓. 枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子的研究进展[J]. 广西科学, 2018,25(03):233-241.
- [56]Stewart C R. Site-Specific Mutagenesis of *Bacillus subtilis* Phage SPO1[J]. Methods Mol Biol, 2019,1898:57-67.
- [57]张婷婷, 马磊. 枯草杆菌启动子 P43 及 Pamy 的转录活性[J]. 江苏农业科学, 2014,42(12):56-58.
- [58]苗华彪, 曹艳, 杨梦瀚, 等. 基于信号肽策略提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 生物技术通报, 2021,37(06):259-271.
- [59]Wang X H, Zhang Y Q, Zhang X R, etc. High-Level Extracellular Production of a Trisaccharide-Producing Alginate Lyase AlyC7 in *Escherichia coli* and Its Agricultural Application[J]. Mar Drugs, 2024,22(5).
- [60]Moszer I, Rocha E P, Danchin A. Codon usage and lateral gene transfer in *Bacillus subtilis*[J]. Curr Opin Microbiol, 1999,2(5):524-528.
- [61]张荣宗, 江丁文, 陈锦香. 枯草芽孢杆菌蛋白酶基因的密码子分析[J]. 农业技术与装备, 2021(06):66-68.
- [62]Westers H, Dorenbos R, van Dijl J M, etc. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*[J]. Mol Biol Evol, 2003,20(12):2076-2090.
- [63]Zhang X Z, Cui Z L, Hong Q, etc. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800[J]. Appl Environ Microbiol, 2005,71(7):4101-4103.
- [64]Souza C C, Guimaraes J M, Pereira S, etc. The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: Emerging devices for the production of recombinant proteins[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021,246(23):2443-2453.
- [65]Wenzel M, Muller A, Siemann-Herzberg M, etc. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation[J]. Appl Environ Microbiol, 2011,77(18):6419-6425.
- [66]冯培勇, 葛宜和, 杨立红, 等. 化学诱变选育高产纤维素酶菌株[J]. 安徽农业

- 科学, 2008,36(33):14378-14379.
- [67]王鹏飞, 谢昌贤, 刘运添, 等. 氯化锂、紫外线对金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)产金霉素特性的诱变作用[J]. 微生物学杂志, 2013,33(01):86-88.
- [68]Zhang Q, Miao R, Feng R, etc. Application of Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) to Microbial Breeding[J]. Curr Issues Mol Biol, 2023,45(8):6466-6484.
- [69]王庚, 张晓梅, 史劲松, 等. L-丝氨酸生产菌株的高通量筛选及其发酵优化[J]. 食品与发酵工业:1-10.
- [70]张善飞, 李欣颖, 田丹丹, 等. 高产莫能菌素菌株 ARTP 诱变选育及发酵培养基优化[J]. 食品与发酵工业:1-13.
- [71]刘晓萌, 苏振贺, 李聪, 等. ARTP 诱变选育镰刀菌酸耐受增强枯草芽孢杆菌及其诱变机理: 中国植物病理学会 2024 年学术年会[C], 中国吉林长春, 2024.
- [72]张鑫, 凤元邦, 冯雪, 等. 紫外-LiCl 联合 ARTP 诱变选育高产花生四烯酸的高山被孢霉突变株[J]. 中国油脂:1-10.
- [73]王玉雪. 高产纳豆激酶枯草芽孢杆菌的诱变选育及组学分析[D]. 江南大学, 2021.
- [74]Liu K, Fang H, Cui F, etc. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020,104(14):6363-6373.
- [75]Zhang X, Zhang X F, Li H P, etc. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014,98(12):5387-5396.
- [76]Turner P, Mamo G, Karlsson E N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining[J]. Microb Cell Fact, 2007,6:9.
- [77]Jiang C, Ye C, Liu Y, etc. Genetic engineering for enhanced production of a novel alkaline protease BSP-1 in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Front Biotech, 2022,10:977215.
- [78]Spinck M, Ecke M, Schiller D, etc. A Directed Evolution System for Lysine Deacetylases[J]. Methods Mol Biol, 2021,2247:319-337.

- [79]Rigoldi F, Donini S, Redaelli A, etc. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications[J]. APL Bioeng, 2018,2(1):11501.
- [80]Huang A, Lu F, Liu F. Exploring the molecular mechanism of cold-adaption of an alkaline protease mutant by molecular dynamics simulations and residue interaction network[J]. Protein Sci, 2023,32(12):e4837.
- [81]吴晓怡, 吴昊, 杨灿, 等. 蛋白质工程提升糖酶热稳定性研究进展[J]. 食品科学, 2024,45(19):263-271.
- [82]Kada S, Ishikawa A, Ohshima Y, etc. Alkaline serine protease AprE plays an essential role in poly-gamma-glutamate production during natto fermentation[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2013,77(4):802-809.
- [83]Sun B, Zou K, Zhao Y, etc. The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052[J]. Front Microbiol, 2023,14:1301065.
- [84]Hu L X, Feng J J, Wu J, etc. Identification of six important amino acid residues of MenA from *Bacillus subtilis natto* for enzyme activity and formation of menaquinone[J]. Enzyme Microb Technol, 2020,138:109583.
- [85]黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 等. 基于 RNA-seq 分析 bdhA 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响[J]. 微生物学报, 2024,64(07):2394-2406.
- [86]Tarannum N, Parveen S, Bhuiyan M, etc. Exploring newly isolated thermotolerant, halotolerant and antimicrobial resistant *Bacillus subtilis* ProNTL1 from tannery waste and its alkaline protease production[J]. Mol Biol Rep, 2024,51(1):1131.
- [87]Miao C C, Han L L, Lu Y B, etc. Construction of a High-Expression System in *Bacillus* through Transcriptomic Profiling and Promoter Engineering[J]. Microorganisms, 2020,8(7).
- [88]Yan X, Yu H J, Hong Q, etc. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2008,74(17):5556-5562.

攻读学位期间发表的学术论文目录

1. 罗雅妮, 胡刘秀, 刘志钰, 高旭丽, 陈 宇, 吴传超, 刘 艳. 基于理性设计的碱性蛋白酶 AprEbl 的热稳定性改造及潜在机制[J]. 食品科学.
2. Gao X, Luo Y, Adinkra E K, et al. Engineering a PhrC-RapC-SinR quorum sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories.
3. Xilin Huang , Xuli Gao¹, Junbao Huang, Yani Luo, Wei Tao, Mingyu Guo, Yongyuan Liu, Jing Wu, Yu Chen, Yan Liu. Study on the effects of bdhA knockout on coproduction of menaquinone-7 and nattokinase by *Bacillus subtilis* based on RNA-Seq analysis. Process Biochemistry
4. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 等. 基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响[J]. 微生物学报.
5. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 等. *aprN* 的 N 端编码序列改造促进纳豆激酶的高效表达 [J]. 食品与发酵工业.

致 谢

春去秋来，时光荏苒，三年的硕士生涯转瞬即逝。初入校园时，我怀揣着憧憬与期待，却也难免被未知与迷茫所笼罩。幸运的是，尽管这一路跌跌撞撞，酸甜交织，但始终有人相伴左右，为我点亮前行的灯。这段旅程让我深刻体会到，成长不仅是个人的努力，更是师友的指引与陪伴。如今，我带着满满的收获与感激，即将踏上新的征程。

我时常感慨自己的幸运，虽天性散漫，却幸得良师相伴。衷心感谢我的导师刘艳教授，在我迷茫时，她为我梳理方向；在我懈怠时，她督促我前行。正是在她的悉心指导下，我得以在相对自由的环境中学习、成长，逐渐找到属于自己的节奏。对于课题每一次的探索和尝试，都锻炼了我的学习和科研能力，使我成为更优秀的自己。其次，我要特别感谢师兄黄俊宝和师姐黄茜琳。每当我因实验问题而陷入苦恼时，他们总能及时伸出援手，并尽他们所能帮助我解决问题。而实验室的师弟师妹们郭明雨、陶伟、刘永圆同样给我带来了帮助，他们的支持与鼓励让我在科研路上倍感温暖。此外，我要衷心感谢我的室友和同门。她们不仅是我的同学，更是我珍贵的朋友。三年来，她们在学业与生活中给予了我无尽的帮助与支持，也为我带来了无数欢乐与温暖。因为有了她们的陪伴，这段时光充满了美好的回忆，成为我人生中难以忘怀的一页。最后，我要诚挚感谢李艳宾老师，朱龙宝老师，薛正莲老师，吴传超老师，陈宇老师，王洲老师以及李闯老师等，我能完成我的课题，其中不乏他们的指导与帮助。

此外，我要特别感谢我的父母。他们始终如一地默默支持我的学业，用无尽的鼓励与关怀为我筑起坚实的后盾。每当我遇到困难时，他们的理解与安慰总能让我重拾信心，继续前行。如今，硕士生涯虽已画上句号，但人生的旅程仍在继续。愿这份幸运与温暖常伴我左右，助我在未来的道路上勇敢追梦。