



ccpA 基因对蜡样芽胞杆菌氨肽酶生产的影响

李雪晴, 张嘉仕, 崔堂兵*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

摘要:【目的】构建蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) *ccpA* 缺失菌株, 并初步探索 *ccpA* 基因对其碳代谢及氨肽酶生产的影响。【方法】利用温敏型质粒 pKSV7 构建蜡样芽胞杆菌 CZ *ccpA* 基因缺失突变株 CZΔ*ccpA*, 通过回补菌株对敲除株表型进行验证; 不同碳源发酵对比菌株碳代谢的变化, 进行氨肽酶发酵优化。【结果】成功构建 *ccpA* 缺失菌株 CZΔ*ccpA* 与回补菌株 CZ1, 三株菌在 LB 培养基中生长无差异; 在柠檬酸钠以及甘露低聚糖为碳源时, 菌株的代谢产生明显变化; 以 D-木糖为单一碳源时, 氨肽酶的产量提高 48.25%。【结论】CZ *ccpA* 基因对柠檬酸钠、甘露低聚糖、D-木糖为单一碳源时的代谢可能具有调控作用, *ccpA* 基因缺失可以提高蜡样芽胞杆菌 CZ 的氨肽酶产量。

关键词: 蜡样芽胞杆菌, 基因敲除, 分解代谢物控制蛋白 A, 氨肽酶

由 *ccpA* 基因编码的分解代谢物控制蛋白 A (catabolite control protein A, CcpA) 是 *B. subtilis* 等低 GC 含量的革兰氏阳性菌中碳代谢的中心调节物, 属于 LacI/GalR 转录调控因子家族, 参与约 250 个基因的调控表达, 且该调节既可以是正向调控也可以是逆向调控^[1-2]。

CcpA 可以介导细胞的碳分解代谢物阻遏 (carbon catabolite repression, CCR)^[3] 效应: 当葡萄糖等速效碳源存在时, 胞内高浓度的 ATP 与无机磷酸比例 (ATP/Pi)、果糖-1,6-二磷酸 (FBP) 及葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 会激活 HPrK/P (HPr kinase/phosphoesterase) 激酶活性, 将 HPr

(histidine-phosphoryl protein) 的丝氨酸残基磷酸化为 P-(Ser)-HPr, CcpA 在共阻遏物 P-(Ser)-HPr 的协助下与目的基因的分解代谢反应元件 (catabolite responsive element, Cre) 位点结合, 阻碍非速效碳源的利用^[4]; 最近还发现了新位点 Cre_{var}^[5], 也有些被调控基因未发现结合位点, 如 *alsSD* 操纵子 (编码 α-乙酰乳酸合成酶基因 *AlsS* 和 α-乙酰乳酸脱羧酶基因 *AlsD*)^[6], 显示了 CcpA 调控的多样性及精细性。CcpA 具有多效性功能, 不仅参与 CCR 效应, 还参与中心碳、氮代谢的调控以及生物被膜的形成等。

氨肽酶是一类从多肽链或蛋白质 N 端选择性

*通信作者。E-mail: fetbcui@scut.edu.cn

收稿日期: 2017-07-15; 修回日期: 2017-12-24; 网络出版日期: 2018-01-15

切除氨基酸残基,产生游离氨基酸的外切蛋白酶,可用于食品^[7]、医疗^[8]、生物技术^[9]等行业,前景广阔。但由于国内氨肽酶研究起步较晚,几乎没有商业化氨肽酶产生,对氨肽酶的理化性质及应用研究仍处于初始阶段,氨肽酶的调控机制研究也鲜有报道。蜡样芽胞杆菌 CZ 是实验室自筛野生株,可以产生高活性的胞外氨肽酶,这在目前研究中还比较少见。我们在蜡样芽胞杆菌 CZ 进行发酵优化^[10]时发现在发酵培养基中添加一定浓度谷氨酸,氨肽酶产量可以提高 66.67%,而加入相同浓度的谷氨酰胺,它会在代谢过程中逐渐被转化为谷氨酸,产量则提高 140%,由于 CcpA 对谷氨酸合成的促进作用,以及它在碳氮代谢中起到的重要作用,我们尝试对该菌株进行 *ccpA* 基因的敲除与回补,试图研究 *ccpA* 与氨肽酶调控之间的联系,并进一步提高氨肽酶产量。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒: 蜡样芽胞杆菌 CZ (*Bacillus cereus* CZ) (实验室自筛野生菌)、大肠杆菌 *Trans1-T1* 菌株(北京全式金生物技术有限公司)、JM110 (实验室保存); 质粒 pKSV7 (实验室保存)、*pEASY-Blunt* (北京全式金生物技术有限公司)。

1.1.2 培养基: TSB、TSA 培养基(杭州微生物试剂有限公司); LB 培养基(广东环凯微生物科技有限公司)。Cm LB: 含氯霉素 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培养基; Amp LB: 含有氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培养基; 发酵培养基: D-木糖 40 g/L, MgSO_4 1 g/L, 酵母浸粉 10 g/L, 尿素 15 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, 并在第 12 小时添加 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶、DNA Marker、Prime STAR HS DNA 聚合酶、T4 连接酶等 [TaKaRa(日本)], Hepes (Sigma 公司); 基因组提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 质粒抽提试剂盒(广州艾基生物技术有限公司), 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]; 溶菌酶、氯霉素(Cm)等其他生物试剂(广州华奇盛生物科技有限公司)。

1.1.4 仪器设备: PCR 仪 Thermo Fisher scientific 公司, 电转仪 Bio-Rad 公司, 离心机 Eppendorf 公司。

1.2 引物设计与测序

根据 CZ 菌株 16S rDNA 的测序结果,与 NCBI 数据库比对,以 GenBank 公布的蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 菌株基因序列为模板设计引物,完成了 CZ *ccpA* 及其上下游序列的测序。根据质粒 pKSV7 及 *ccpA* 基因序列设计了引物 A-F、A-R, B-F、B-R, 其他引物根据 CZ *ccpA* 及其上下游序列的测序结果设计。

本研究所有引物合成及测序工作均由广州艾基生物技术有限公司完成。引物具体序列见表 1。

1.2.1 基因组 DNA 的提取: 收集 1.5–2.0 mL 过夜培养的蜡样芽胞杆菌 CZ, 使用 20 mg/mL 溶菌酶破壁消化 30 min 后,按照细菌 DNA 小提试剂盒指导抽提, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

1.2.2 *ccpA* 基因及其上下游片段的获取: 以 CZ 基因组 DNA 为模板,以 *ccpA*-F 以及 *ccpA*-R 为模板扩增 *ccpA* 基因片段,反应条件: $98\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min; $98\text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $54\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 共 30 循环; 最后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。连接至 *pEASY-Blunt* 克隆载体,并转化 *Trans1-T1* 感受态,筛选单克隆,送至公司测序。

表 1. 本研究所使用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>ccpA</i> -F	CACGATGAACGTAACAATCTATGA
<i>ccpA</i> -R	ACTCAGGTTACTTCGTTGAATCTCT
<i>ccpA</i> -UF	CGGGTCTATCAGCAACGATTGAAG
<i>ccpA</i> -UR	GCGAGATACGGTAGCCATTGAAAC
<i>ccpA</i> -DF	GCTCTGTTATCTTACCTCACCGT
<i>ccpA</i> -DR	GTAGGCTAACTTCATCCAAACAAT
UP- <i>Hind</i> III	CTAAGCTTCTACAGGGCGACGTGACCTT
UP-R	GAGCTTTTTTATACCTCATCGCACACTCCT
DOWN-F	GTGCGATGAGGTATAAAAAAGCTCAC
DOWN- <i>EcoR</i> I	CAGAATTCACGAAACGATGGTAGAGGGA
A-F	AGGGTTTTCCCAGTCACGA
A-R	AACTCTTCTCTTTGTTTTGGTCAG
B-F	ACCTCACCGTATCCAATTTAGAGAT
B-R	AACTTCACACAGGAAACAGCTATGA
Δ <i>ccpA</i> -F	ATTTTATGTGAACGAGGTATT
Δ <i>ccpA</i> -R	AACAAGGAATAGCCCCATCT
CZ1-F	TATTTTATGTGAACGAGGTATT
CZ1-R	CGTAATTATCCAAAGAACGATCATC
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
M13F	GTAAAACGACGTCCAGT

按照同样方法, 获得 *ccpA* 上下游序列。利用 NCBI 进行序列分析。

1.3 蜡样芽胞杆菌 CZ *ccpA* 基因敲除突变株的构建

1.3.1 敲除质粒 pKSV7-UD 的构建: 首先以引物 UP-*Hind* III/UP-R 以及 DOWN-F/DOWN-*EcoR* I 分别扩增 *ccpA* 上下游同源臂, 利用重叠 PCR^[11] 进行同源臂拼接, 拼接后的同源臂经 *EcoR* I 与 *Hind* III 双酶切后连接至 pKSV7, 转 JM110 去甲基化, 测序后抽提高浓度质粒保存于 -20 °C 备用。

1.3.2 pKSV7-UD 质粒的电转化与突变菌株的筛选: 在 Turgeon N^[12], Peng D^[13] 等方法基础上进行条件摸索。将敲除载体 pKSV7-UD 以电转化方式转入 CZ 感受态细胞中, 转化子在 42 °C Cm LB

培养基培养 12 h, 并转接 19 次, 每 12 h 转接 1 次(下同), 使其发生第 1 次单交换, 质粒重组到基因组; 30 °C LB 培养基转接 3-4 次, 最后 42 °C LB 培养基转接 30 次, 使其发生第 2 次单交换并丢失质粒。此过程可能发生同源重组, 同源臂替换了原本的基因序列, 获得 *ccpA* 缺失菌株, 也可能恢复为野生型(图 1-A); 稀释 10⁵-10⁷ 涂 LB 平板, 并以此为母板挑单菌落分别点在 Cm 平板与 LB 平板相同位置, 在 Cm 平板不生长, LB 平板上生长的单菌落即为疑似缺失突变株, 扩大培养后接种到 Cm LB 平板以及 Cm LB 液体培养基中, 排除假阳性。

确定无 Cm 抗性的克隆子, 提基因组后用引物对 Δ *ccpA*-F、 Δ *ccpA*-R 进行鉴定, 若得到 2876 bp 条带则为恢复野生株, 若得到 1877 bp 条带则为缺失突变株 CZ Δ *ccpA*, 测序确认。

1.4 蜡样芽胞杆菌 *ccpA* 基因敲除回补株的构建

以 CZ 基因组为模板, 使用 UP-*Hind* III、DOWN-*EcoR* I 引物对扩增 *ccpA* 及其上下游序列共 2551 bp, 双酶切后连接 pKSV7 并转化至 JM110 细胞, 获得敲除回补载体 pKSV7-*ccpA*, 用 CZ Δ *ccpA* 缺失突变株突变制备感受态并进行转化筛选, 方法同上。使用 UP-*Hind* III, DOWN-*EcoR* I 以及 CZ1-F、CZ1-R 双引物回补验证, 并送测序确认。

1.5 细菌的发酵特性及产酶优化

1.5.1 细菌生长曲线的测定: 将野生型菌株 CZ、缺失突变株 CZ Δ *ccpA*、回补株 CZ1 平板划线培养, 分别挑取单菌落接种于 LB 培养基, 37 °C 振荡培养 12-14 h 后, 转接至新鲜 LB 液体培养基, 使初始 OD₆₀₀ 为 0.35 左右。每隔 1 h 测定 1 次 OD₆₀₀, 平台期后每隔 12 h 测定 1 次, 记录细菌生长情况。

每个实验组 3 个平行。

1.5.2 氮源浓度对生长及产酶的影响: 探索 *ccpA* 基因缺失是否影响菌株氮代谢及产酶量。以尿素为氮源, 浓度分别为 2、8、10、15、20 g/L 进行发酵, 测定 OD_{600} 及酶活, 确定最佳氮源浓度。

1.5.3 *ccpA* 缺失对碳源代谢影响以及最佳发酵碳源的确定: 以 1.5% 尿素为氮源, 使用 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖等 9 种碳源以 4% 浓度进行发酵, 连续测定发酵过程生物量变化、pH 变化以及氨肽酶酶活。

1.5.4 D-木糖浓度对氨肽酶产量的影响: 以 1.5% 尿素为氮源, 使用 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8% 浓度 D-木糖为单一碳源, 其他成分不变进行发酵。重复 3 次, 测定氨肽酶酶活。

1.5.5 定时取样试验: 使用 4% D-木糖为碳源, 1.5% 尿素为氮源, 其他成分不变, 进行发酵, 每隔 12 h 取样测定酶活。

1.5.6 氨肽酶酶活测定方法^[14]: 取适量发酵液, 5000 r/min、4 °C 离心 10 min, 弃沉淀, 保存上清液测定酶活。取上清 50 μ L, 加入 600 μ L pH 9.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 58 °C 预热 5 min, 加入 50 μ L 26 mmol/L LNA (L-Leucine-p-nitroanilide) 溶液, 对照组加等量蒸馏水, 58 °C 水浴反应 10 min 后立即冰浴 5 min 结束反应。

酶活定义: 在最适条件下, 将每分钟生成 1 μ g p-NA (p-nitroaniline) 所消耗的酶量定义为 1 个酶活单位。

2 结果和分析

2.1 *CZ Δ ccpA* 及 *CZ1* 菌株筛选

基因敲除原理见图 1-A, 将质粒 pKSV7-UD

转入 CZ 感受态后, 经过 2 次单交换, 挑取单克隆 3168 株, 获得 25 个疑似阳性克隆, 使用 Δ *ccpA*-F、 Δ *ccpA*-R 引物对扩增验证并送测序后鉴定有 17 株为敲除菌株(图 1-B), 同源重组率约为 0.54%。

ccpA 回补原理与敲除原理相同, 将回补载体 pKSV7-*ccpA* 转入 *CZ Δ ccpA* 感受态细胞并诱导重组后, 使用引物对 UP-*Hind* III、DOWN-*Eco*R I 进行 PCR 扩增, 回补株获得 2551 bp 条带, *CZ Δ ccpA* 扩增出 1552 bp 条带, 而单交换菌株及转化株会同时扩增出这两条带(图 1-C); 挑选只有 2551 bp 条带的菌株, 再使用 CZ1-F、CZ1-R 验证, 若扩增出 2985 bp 条带则是正确回补了 *ccpA* 基因的菌株 CZ1(图 1-D), 测序做最后验证。回补平板上选取 800 株进行筛选, 获得 3 株回补株, 重组率约为 0.38%。

2.2 *CZ*、*CZ Δ ccpA*、*CZ1* 生长曲线测定

按照 1.5.1 所述方法测定 3 株菌的生长曲线。从适应期到进入平台期, 菌株的生长代谢较快, 1 h 测定 1 次, 如图 2-A。该菌株的适应期为 0–1 h, 1–12 h 为指数生长期, 之后进入平台期(图 2-B)。在该图中, 第 1 次取样时菌株处在指数生长期, 而第 2 次取样时已经进入衰亡期, 所以该图中没有体现出平台期。将图 2-A 与 2-B 结合来看, 3 株菌在 LB 培养基中整个生长时期都没有明显差异, *ccpA* 基因缺失对菌株生长活力基本无影响。

2.3 氮源对菌株发酵的影响

2.3.1 氮源浓度对菌株生物量的影响: 对 *ccpA* 基因进行敲除后, 前期以蛋白胨为氮源进行发酵, 3 株菌在生长及发酵过程中无明显差异, 结合实验室前期工作经验^[10], 该实验更换了成分简单明晰的尿素为氮源, 并在摸索尿素添加浓度的过程中

发现(图 3): 固定碳源浓度为 4%, 当氮源浓度为 0.2%–0.8%时, 3 株菌均在发酵 36 h 时达到最大生物量, 但回补株 CZ1 的最大生物量始终低于同氮源浓度培养下的野生型 CZ, 由于回补株与野生型在基因与培养方式上完全相同, 所以推测这与两次电击对回补株造成的损伤有关。0.2%尿素培养时, 野生型 CZ 与缺失突变株 $CZ\Delta ccpA$ 差异不明显; 0.5%尿素时, 野生型 CZ 的生长受到一定抑

制, 最大生物量只能达到 15.36, 而敲除株生长被促进, 最大生物量达到 19.22; 0.8%尿素培养时, 野生型与回补株生长被进一步抑制, 而缺失突变株生物量与 0.5%尿素培养时没有明显区别。说明 CcpA 参与了氮代谢的调控, $ccpA$ 缺失一定程度上解除了高浓度氮源对菌株生长代谢的抑制, 这对于促进菌体生长、获得较大生物量有一定积极作用。

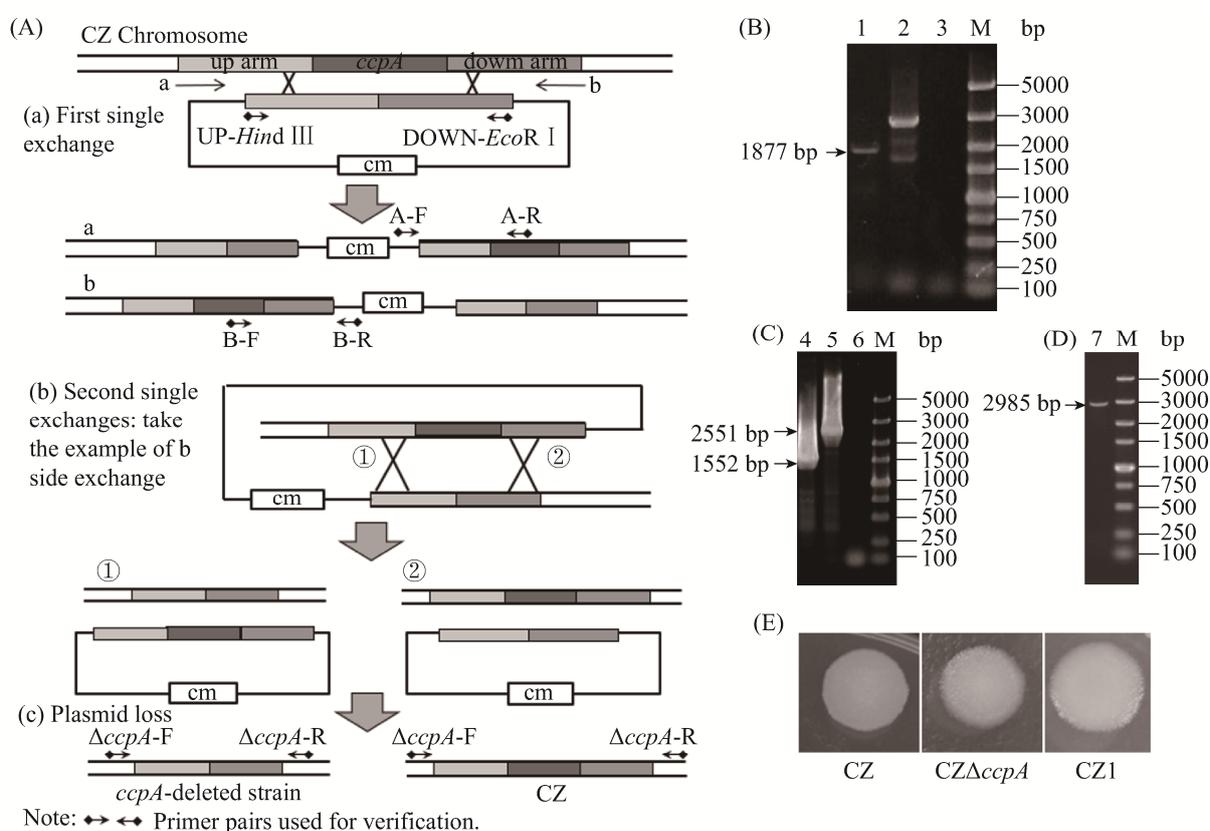


图 1. 敲除及回补菌株验证

Figure 1. Verification of *ccpA* mutation and complementation. All *ccpA* gene was deleted. A: gene knockout principle of *ccpA*. B: PCR amplification result using primers *ccpA*-F/R of *ccpA* knockout strain. lane 1, *ccpA* knockout strain; lane 2, negative control using CZ genome; lane 3, blank control, without DNA. C: PCR confirmation using primers UP-*Hind* III, DOWN-*Eco*R I of complementation strain. Lane 4, $CZ\Delta ccpA$; lane 5, complementation strain CZ1; lane 6, blank control, without DNA. D: PCR confirmation using primers CZ1-F/R of complementation strain. Lane 7: CZ1; M, DL5000 marker. E: Morphology of strains CZ, $CZ\Delta ccpA$ and CZ1.

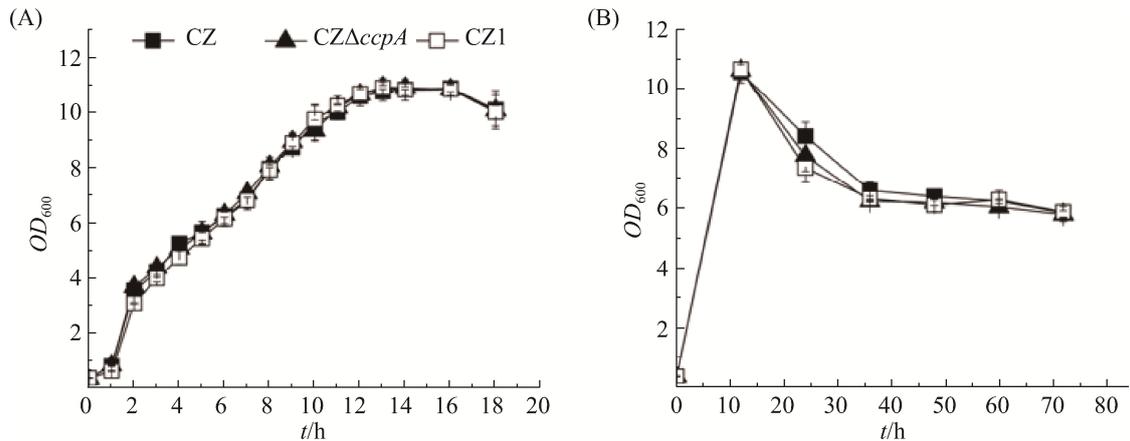


图 2. 三株菌的生长曲线图

Figure 2. Growth curve of three strains. Data are shown as means±SD. A: the growth curve of 18 hours, measured every hour; B: the growth curve of 72 hours, measured every 12 hours.

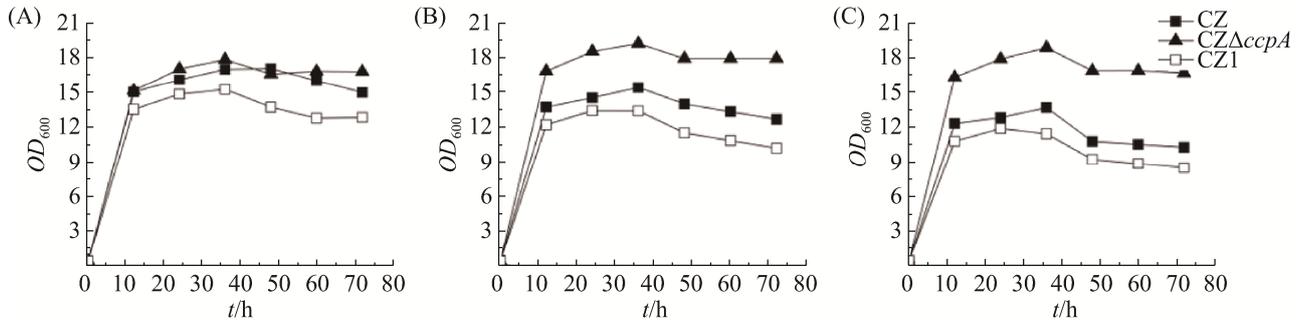


图 3. 不同浓度氮源对菌体生物量的影响

Figure 3. Effects on biomass of different concentrations of nitrogen sources. A: 0.2% concentration of urea; B: 0.5% concentration of urea; C: 0.8% concentration of urea.

2.3.2 氮源浓度对菌株产酶的影响: 测定了不同浓度尿素发酵时氨肽酶活, 确定发酵的最佳尿素浓度为 1.5%, 超过该浓度, 产酶下降。使用较高浓度尿素发酵时, 更能体现 *ccpA* 缺失对氨肽酶发酵的优势, 即 0.5%–2.0% 尿素浓度下, 浓度越高, 缺失突变株 *CZΔccpA* 与野生型、回补株在同一氮源浓度下的酶活差异越大(图 4)。

2.4 碳源对菌株发酵的影响

2.4.1 不同碳源发酵时的生物量、pH 以及酶活测定^[15]: 使用 9 种碳源以 4% 浓度进行发酵, 在 96 h 内连续测定发酵过程中生物量、pH 变化(图 5)并进行酶活测定(图 6)。

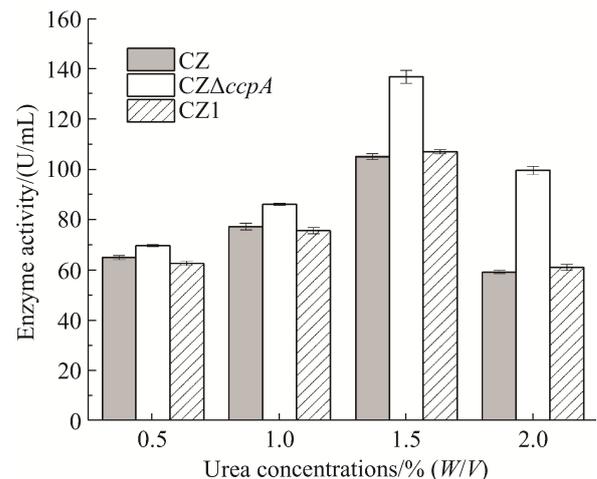


图 4. 不同浓度尿素的发酵结果

Figure 4. Fermentation result with different concentrations of urea. Data are shown as means±SD.

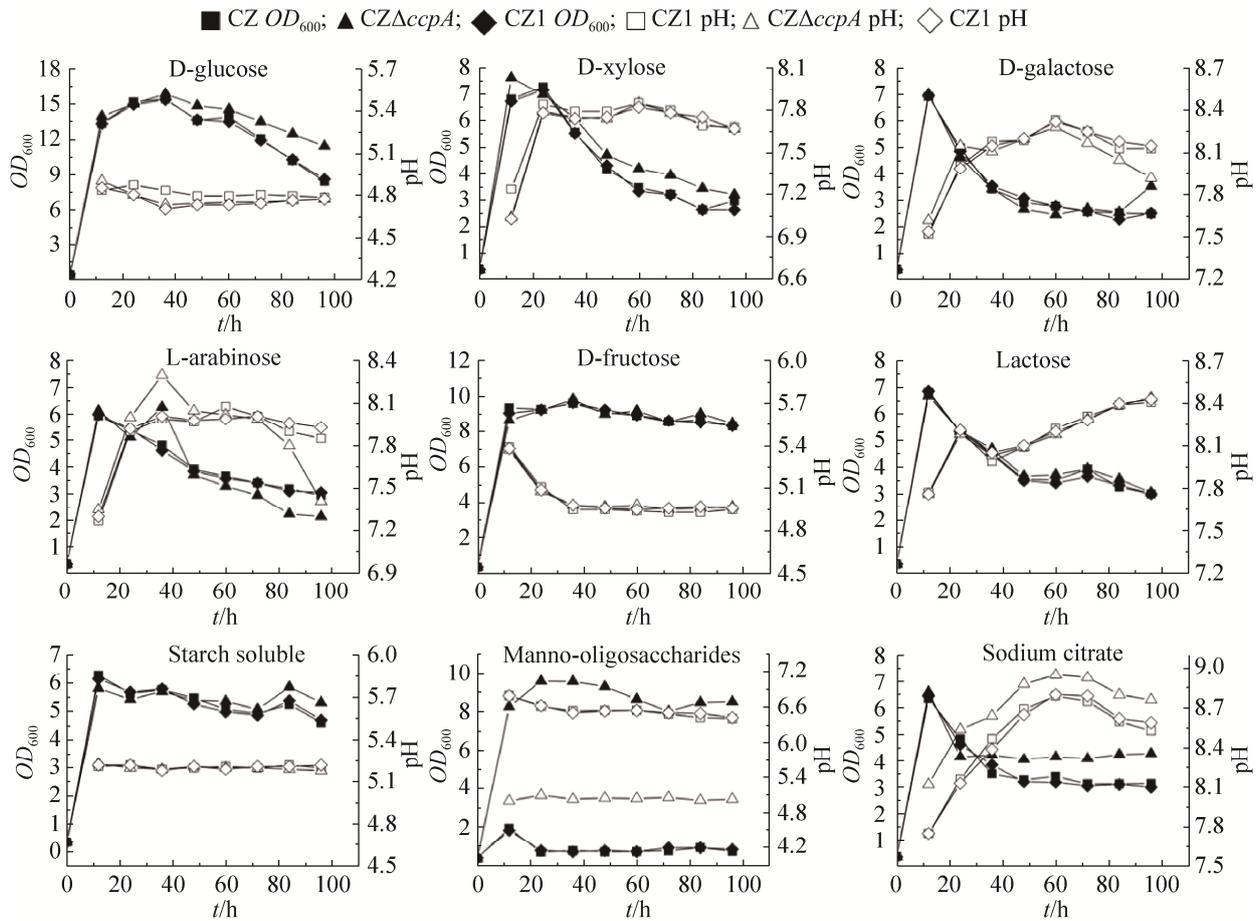


图 5. 不同碳源发酵的生物量及 pH 变化

Figure 5. Biomass and pH changes in different carbon sources during fermentation.

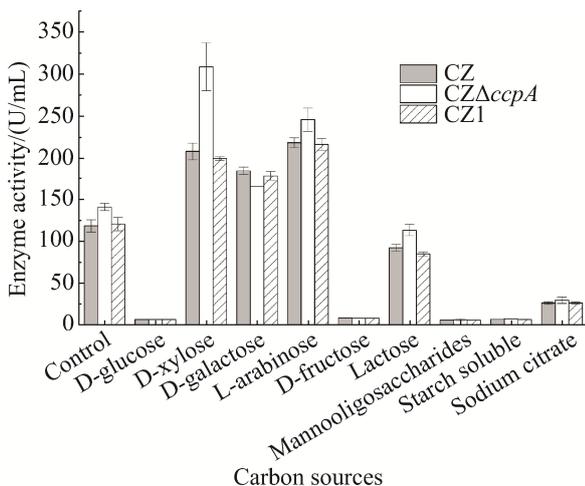


图 6. 不同碳源发酵产酶情况

Figure 6. Enzyme production fermented with different carbon sources. Data are shown as means±SD.

细菌利用不同碳源，会激活不同的代谢途径和生理活动，同时产生不同的代谢产物，因而比较同一菌株在不同碳源下的发酵情况会有较大 pH、生物量、酶活等的差异，为了研究 *ccpA* 缺失带来的影响，我们重点分析同一碳源下野生型、缺失突变株与回补株之间的差异。

ccpA 缺失后，菌株利用柠檬酸钠、甘露低聚糖的代谢过程出现了明显变化。当以甘露低聚糖为碳源进行发酵时，野生型 CZ 及回补株 CZ1 在 OD_{600} 达到 2.0 左右迅速死亡，而缺失突变株 *CZΔccpA* 则正常生长，可能是野生型 CZ 及回补株 CZ1 在利用甘露低聚糖的过程产生了某些对菌

株生长不利的毒力因子造成的, 已经有文献报道 CcpA 蛋白可以直接激活毒性基因的表达^[16]。以柠檬酸钠为碳源进行发酵, 缺失突变株 $CZ\Delta ccpA$ 的 pH 始终比野生型 CZ、回补株 CZ1 高 0.3 左右, 且 36 h 后 $CZ\Delta ccpA$ 生物量显著高于 CZ、CZ1。由于柠檬酸钠代谢主要依靠 TCA 循环, 推断 $ccpA$ 缺失影响了菌株的 TCA 循环过程, Kim 等^[17]和 Asai 等^[18]的研究表明 $ccpA$ 缺失会提高 TCA 循环的表达量。此外, EMP 与 TCA 通量的改变会影响碳溢流量, 引起乳酸等代谢废物改变, 从而造成 pH 变化^[15], 这也解释了为什么柠檬酸钠发酵时 pH 改变; 此外, 以 D-木糖以及 L-阿拉伯糖为碳源发酵时, 缺失突变株的 pH 及生物量在衰亡期与野生型及回补株也产生了差异, 这与 dVM Van^[19]、Schmiedel 等^[20]的研究结果一致: 木糖、阿拉伯糖操纵子受到 CcpA 的调控作用, 抑或该菌株的磷酸戊糖途径受到 CcpA 调控。由该图还可看出 $ccpA$ 缺失对于延缓菌株衰亡速度、延长菌株发酵时间具有一定积极作用。

以不添加碳源作为对照, 实验组为 4% 碳源浓度, 发酵 84 h (图 6) 发现: 使用 D-木糖、L-阿拉伯糖及 D-半乳糖为碳源进行发酵可以促进氨肽酶生产, 柠檬酸钠为碳源则抑制产酶; D-果糖、D-葡萄糖、乳糖、甘露低聚糖、可溶性淀粉发酵则几乎不产酶, 该产酶发酵条件表明, 氨肽酶 CZ 所产的氨肽酶是诱导酶。诱导酶的合成受到环境中诱导物与基因的双重控制, 所以即使某些碳源发酵时生物量很高(图 5), 但不存在诱导物(直接碳源或代谢物), 也不产生氨肽酶。在促进产酶的碳源中, 以 D-木糖及 L-阿拉伯糖为碳源时, $ccpA$ 基因缺失促进产酶, 其中 D-木糖的促进作用更为显著, 比野生型酶活提高 48.25%, 可达 308.80 ± 28.44 U/mL;

但当以 D-半乳糖发酵时, $ccpA$ 缺失则不利于氨肽酶的产生; 另外结合图 5 结果发现, 发酵液 pH 在 7.5–7.8 时更有利于氨肽酶的产生, pH 过低或过高都会对氨肽酶生产产生不利影响。

2.4.2 D-木糖浓度对氨肽酶产量的影响: 使用 1%–8% D-木糖发酵培养基发酵 72 h, 三株菌均以 4% D-木糖发酵时产酶最高, 5% D-木糖发酵产酶量急剧下降, 当碳源浓度达到 8%, 菌株不能生长; 对比同碳源浓度时三株菌产酶发现, 当 D-木糖浓度在 1%–6% 之间时, 缺失突变株产酶均高于野生型与回补菌株, 当 D-木糖浓度达到 7% 时, $ccpA$ 缺失与同碳源浓度的野生株相比已经不具有产酶优势(图 7)。综上, 利用缺失突变株 $CZ\Delta ccpA$ 以 4% D-木糖为碳源最适宜氨肽酶发酵。

2.4.3 不同发酵时间对氨肽酶产量的影响: 使用 4% D-木糖、1.5% 尿素进行发酵, 野生型 CZ 酶活在发酵 48 h 达到最大后缓慢下降; 而 $CZ\Delta ccpA$ 菌株酶活在 48 h 后仍然缓慢增长, 直至 84 h 时达到最大酶活 304.32 ± 5.27 U/mL (图 8)。

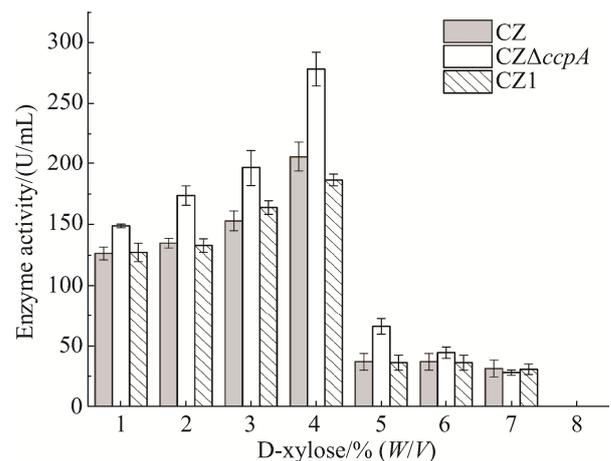


图 7. 不同浓度 D-木糖发酵酶活测定

Figure 7. The enzyme activity of CZ, $CZ\Delta ccpA$ and CZ1 with different concentrations of D-xylose. Data are shown as means \pm SD.

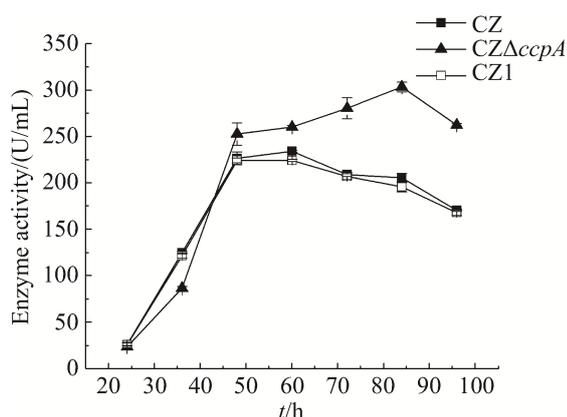


图 8. 不同发酵时间酶活测定

Figure 8. The enzyme activity of CZ, CZ Δ ccpA and CZ1 in different time. Data are shown as means \pm SD.

3 讨论

很多食品的加工以往通过理化方法去除苦味或者使用添加剂掩盖苦味, 而氨肽酶水解去除苦味不仅高效, 作用条件温和, 且可以改善风味, 提高营养价值^[21]。在国外已经可以利用乳酸菌等生产氨肽酶, 而氨肽酶的国产化应用几乎为零, 多使用 NOVO 公司的风味酶 Flavorzyme 进行研究, 它是氨肽酶与蛋白酶的复合物, 广泛用于蛋白水解实验中, 价格昂贵。魏亚娟^[22]对一株野生菌进行发酵优化, 使氨肽酶酶活达到 3685.6 U/mL, 这是国内氨肽酶酶活最高的研究报道。而国内其他关于氨肽酶的研究, 酶活多为 1–300 U/mL, 还远达不到工业生产的标准, 所以研究氨肽酶产生的调控机制、设法提高氨肽酶产量、降低其生产成本是非常有必要的。

利用基因重组敲除蜡样芽胞杆菌 CZ *ccpA* 基因, 得到 *ccpA* 缺陷的蜡样芽胞杆菌 CZ Δ ccpA, 为进一步研究 *ccpA* 与氨肽酶调控机制之间的关系奠定了基础。蜡样芽胞杆菌 CcpA 对菌株 EMP 与 TCA 途径有调控作用^[19], 有研究表明 CcpA 激活

EMP 途径, 降低 TCA 通量^[17–19]; 调控氮代谢, 提高菌株对高浓度氮源的耐受力。另外优化了 CZ Δ ccpA 的发酵条件: 以 4% D-木糖为单一碳源, 使用 1.5% 尿素为氮源, 发酵 84 h, 缺失突变株酶活可达 337.24 U/mL。由于 CZ 菌株氨肽酶基因中没有明显的 Cre^[23]或 Cre_{var}^[5]位点, 我们推测 CcpA 通过影响碳氮代谢影响氨肽酶产生(图 9)。在谷胱甘肽通路中, 谷氨酸是氨肽酶催化的间接底物, 直接底物是 L-半胱氨酰甘氨酸, 它只能由谷胱甘肽代谢生成, 高浓度谷氨酸可能促进谷胱甘肽正向生产。另一方面, 谷氨酸是 γ -谷氨酰转肽酶催化的产物, 谷氨酸浓度过高可能抑制 γ -谷氨酰转肽酶的活性, 使氨肽酶底物 L-半胱氨酰甘氨酸的量不足, 所以谷氨酸浓度或者谷氨酸与 L-半胱氨酰甘氨酸之间的浓度比对氨肽酶可能存在某种反馈调节, 在谷氨酸或者他们之间的比值维持合理水平时, 氨肽酶的产量会更高。谷氨酸的生物合成是连接碳代谢及氮代谢的纽带, 参与谷氨酸生物合成的谷氨酸合成酶由 *gltAB* 操纵子编码, *ccpA* 缺失会造成 *gltAB* 操纵子表达量不足, 使得谷氨酸含量降低^[1], 在 *ccpA* 缺失菌发酵培养基中以非 PTS 糖类为碳源会诱导 *gltAB* 操纵子表达, 而 PTS 糖类碳源则不会^[2], 我们推测 *ccpA* 缺失后, 加入非 PTS 碳源(D-木糖、L-阿拉伯糖)使得谷氨酸与 L-半胱氨酰甘氨酸的量维持了一个合理的水平, 从而促进了氨肽酶的产生, 这也解释了图 6 中使用 D-木糖、L-阿拉伯糖与乳糖发酵时缺失突变株酶活高于野生型, D-半乳糖发酵则为野生型酶活较高的原因。由于 *ccpA* 与氨肽酶调控机制之间的研究尚无报道, 以上推论还需要进一步展开研究。该研究为野生型菌株改造、提高氨肽酶产量提供了一种新思路。

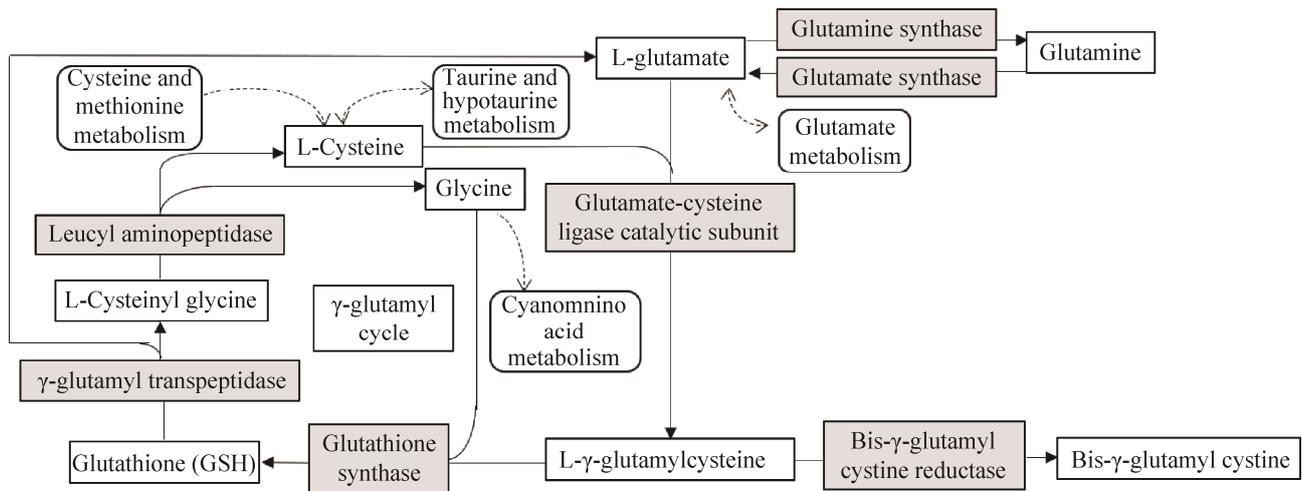


图 9. 谷胱甘肽代谢通路图(部分)

Figure 9. Glutathione metabolic pathway map (partial). The map based on the glutathione metabolic process in the KEGG database.

参考文献

- [1] Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W, Saier Jr MH. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1366–1381.
- [2] Wacker I, Ludwig H, Reif I, Blencke HM, Detsch C, Stülke J. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 10): 3001–3009.
- [3] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 613–624.
- [4] Shivers RP, Dineen SS, Sonenshein AL. Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(3): 811–822.
- [5] Yang Y, Zhang L, Huang H, Yang C, Yang S, Gu Y, Jiang W. A flexible binding site architecture provides new insights into CcpA global regulation in Gram-positive bacteria. *mBio*, 2017, 8(1): e02004–16.
- [6] Turinsky AJ, Moir-Blais TR, Grundy FJ, Henkin TM. *Bacillus subtilis ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(19): 5611–5614.
- [7] Fu J. Research progress of exopeptidases in foods. *Food Science*, 2013, 34(7): 349–354. (in Chinese)
付静. 食品外肽酶的研究进展. *食品科学*, 2013, 34(7): 349–354.
- [8] Gao YD. Types of leucine aminopeptidase and clinical application. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2010, 31(12): 1408–1410. (in Chinese)
高应东. 亮氨酸氨肽酶的种类及临床应用. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(12): 1408–1410.
- [9] Waditee-Sirisattha R, Hattori A, Shibato J, Rakwal R, Sirisattha S, Takabe T, Tsujimoto M. Role of the Arabidopsis leucine aminopeptidase 2. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(10): 1581–1583.
- [10] 张金虎. 蜡状芽孢杆菌 *CZ* 发酵生产氨肽酶的过程调控. 华南理工大学硕士学位论文, 2013.
- [11] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 924–932.
- [12] Turgeon N, Laflamme C, Ho J, Duchaine C. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67(3): 543–548.
- [13] Peng D, Luo Y, Guo S, Zeng H, Ju S, Yu Z, Sun M. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(6): 1849–1858.
- [14] Lin LL, Hsu WH, Wu CP, Chi MC, Chou WM, Hu HY. A thermostable leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. *Extremophiles*, 2004, 8(1): 79–87.
- [15] Ying M, Ban R. Knockout of the *ccpA* gene in *Bacillus subtilis* and influence on riboflavin production. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 23–27. (in Chinese)
应明, 班睿. 枯草芽孢杆菌 *ccpA* 基因敲除及其对核黄素产量的影响. *微生物学报*, 2006, 46(1): 23–27.
- [16] Poncet S, Milohanic E, Mazé A, Nait Abdallah J, Aké F,

- Larribe M, Deghmane AE, Taha MK, Dozot M, De Bolle X, Letesson JJ, Deutscher J. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contributions to Microbiology*, 2009, 16: 88–102.
- [17] Kim HJ, Roux A, Sonenshein AL. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(1): 179–190.
- [18] Asai K, Baik SH, Kasahara Y, Moriya S, Ogasawara N. Regulation of the transport system for C₄-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 2): 263–271.
- [19] van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de vos WM, Abee T. Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 62.
- [20] Schmiedel D, Hillen W. Contributions of XylR, CcpA and *cre* to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. *Molecular and General Genetics MGG*, 1996, 250(3): 259–266.
- [21] Barry CM, O’Cuinn G, Harrington D, O’Callaghan DM, Fitzgerald RJ. Debitting of a tryptic digest of bovine β -casein using porcine kidney general aminopeptidase and X-prolydipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Journal of Food Science*, 2000, 65(7): 1145–1150.
- [22] Wei YJ. Optimizations of the fermentative condition and application of aminopeptidase by *Bacillus subtilis* Zj016. Master Dissertation of Jiangnan University, 2008. (in Chinese) 魏亚娟. 细菌氨肽酶的产酶条件优化及应用研究. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [23] Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH Jr. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HPrK. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(22): 7826–7839.

Effect of *ccpA* gene on the production of aminopeptidase in *Bacillus cereus*

Xueqing Li, Jiashi Zhang, Tangbing Cui*

School of Biological Science and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] We constructed *Bacillus cereus* CZ *ccpA* deletion strains to explore its effect on carbon metabolism and aminopeptidase production. [Methods] Through homologous recombination mediated by the temperature-sensitive plasmid pKSV7, we acquired the mutant strain CZ Δ *ccpA* successfully. We also constructed *ccpA* gene revertant strain CZ1 for phenotypic validation of knockout strains. We compared the metabolic differences of three strains cultured with different carbon source and optimized aminopeptidase fermentation conditions. [Results] The *ccpA* deletion strain CZ Δ *ccpA* and the revertant strain CZ1 were successfully constructed. There was no difference in the growth of the three strains in LB medium. When fermented with sodium citrate or mannan oligosaccharides as a single carbon source, the CZ Δ *ccpA* showed significant metabolic differences from the CZ and CZ1. Besides, the activity of aminopeptidase increased by 48.25 percent when D-xylose was used as the sole carbon source. [Conclusion] *Bacillus cereus* CZ *ccpA* gene affects the production of aminopeptidase by regulating the carbon metabolism process and we can raise aminopeptidase production by *ccpA* gene knockout.

Keywords: *Bacillus cereus*, gene deletion mutants, catabolite control protein A, aminopeptidase

(本文责编: 张晓丽)

*Corresponding author. E-mail: fetbcui@scut.edu.cn

Received: 15 July 2017; Revised: 24 December 2017; Published online: 15 January 2018