

普鲁兰酶在需钠弧菌中的分泌表达与发酵优化

张玉华, 段绪果*

南京林业大学轻工与食品学院, 江苏 南京 210037

张玉华, 段绪果. 普鲁兰酶在需钠弧菌中的分泌表达与发酵优化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3421-3435.

ZHANG Yuhua, DUAN Xuguo. Secretory expression and fermentation optimization for extracellular production of pullulanase in *Vibrio natriegens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3421-3435.

摘要: 普鲁兰酶是一种淀粉脱支酶, 因其分子量较大, 胞外分泌表达难度较高。需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)是一种新型的蛋白表达宿主, 拥有高效的蛋白合成效率。本研究使用基因组整合 T7 RNA 聚合酶表达框的 *V. natriegens* VnDX 为宿主, 构建了产全长普鲁兰酶 PulA 及其截短突变体 PulN2 的重组需钠弧菌, 分析了信号肽、发酵温度、诱导剂浓度、甘氨酸浓度及发酵时间等条件对产酶的影响, 并且对比了 2 种普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 与大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中的胞外产酶能力。研究结果显示, 普鲁兰酶 PulA 和 PulN2 在 *V. natriegens* VnDX 中的胞外酶活为 61.6 U/mL 和 64.3 U/mL, 分别为 *E. coli* BL21(DE3)最大酶活力的 110%和 62%。上述结果表明 *V. natriegens* VnDX 可以分泌表达大分子量的全长普鲁兰酶 PulA, 本研究可为其他大分子量蛋白在 *V. natriegens* VnDX 中的分泌表达提供参考和借鉴。

关键词: 需钠弧菌; 普鲁兰酶; 分泌表达; 发酵条件优化

Secretory expression and fermentation optimization for extracellular production of pullulanase in *Vibrio natriegens*

ZHANG Yuhua, DUAN Xuguo*

College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

Abstract: Pullulanase is a starch debranching enzyme, which is difficult in secretory expression due to its large molecular weight. *Vibrio natriegens* is a novel expression host with excellent efficiency in protein synthesis. In this study, we achieved secretory expression of the full-length

资助项目: 南京林业大学青年拔尖人才培养计划(GXL2018010); 江苏省高校优秀中青年骨干教师和校长境外研修计划 (2020) This work was supported by the Nanjing Forestry University Youth Talent Support Program (GXL2018010) and the Jiangsu Overseas Visiting Scholar Program for Prominent Young and Middle-aged University Teachers and Presidents (2020).

*Corresponding author. E-mail: xgduan@njfu.edu.cn

Received: 2022-12-05; Accepted: 2023-02-08

pullulanase PulA and its truncated mutant PulN2 using *V. natriegens* VnDX strain. Subsequently, we investigated the effects of signal peptide, fermentation temperature, inducer concentration, glycine concentration and fermentation time on the secretory expression. Moreover, the extracellular enzyme activities of the two pullulanases produced in *V. natriegens* VnDX and *E. coli* BL21(DE3) were compared. The highest extracellular enzyme activity of PulA and PulN2 in *V. natriegens* VnDX were 61.6 U/mL and 64.3 U/mL, which were 110% and 62% that of those in *E. coli* BL21(DE3), respectively. The results indicated that *V. natriegens* VnDX can be used for secretory expression of the full-length PulA with large molecular weight, which may provide a reference for the secretory expression of other large molecular weight proteins in *V. natriegens* VnDX.

Keywords: *Vibrio natriegens*; pullulanase; secretory expression; fermentation optimization

普鲁兰酶是糖苷水解酶 13 家族(glycoside hydrolase 13, GH13)的一种淀粉脱支酶, 作用于 α -1,6-葡萄糖苷键, 可以高效地水解普鲁兰多糖和较低分子量的分支糊精^[1], 广泛应用于淀粉糖、抗性淀粉、环糊精等产品的生产^[2]。普鲁兰酶一般为四聚体, 单亚基分子量约为 100 kDa, 该蛋白的胞外分泌重组表达难度大, 是限制其规模化生产的关键瓶颈之一。目前, 普鲁兰酶主要在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中异源表达。但是大肠杆菌表达系统存在蛋白折叠性较差, 易形成包涵体^[3]、胞外分泌效率低^[4]等缺点; 枯草芽孢杆菌表达系统虽然分泌能力强, 但是容易产生不完全折叠的普鲁兰酶以及分泌较多的胞外蛋白酶^[5], 容易降解外源蛋白, 对后续应用产生影响; 而毕赤酵母为真核生物, 存在蛋白翻译后修饰和密码子偏好性。因此, 需要寻找新的表达宿主来实现普鲁兰酶蛋白的高效分泌表达。

需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)是非致病性的^[6]兼性厌氧革兰氏阴性海洋细菌, 其生长速度快, 对数生长期的倍增时间小于 10 min^[7]。此外, *V. natriegens* 与 *E. coli* 虽然在核心代谢^[8]上相似, 但是 *V. natriegens* 具有以下优点: (1) 在对

数生长期, *V. natriegens* 的核糖体数量比 *E. coli* 多 30%–60%^[9], 且 *V. natriegens* 5.16 Mbp 的基因组分布在两条染色体上, 可以进行平行复制^[10], 这两个机制使 *V. natriegens* 的细胞生长快速, 蛋白合成速率高^[11]; (2) *V. natriegens* 具有较高的比底物消耗速率 Q_s , 其 Q_s 在有氧与无氧的条件下至少比 *E. coli* [1.9 g/(g·h)]高 2 倍, 这意味着可被汇集到产品中碳的数量很高^[12]; (3) 与 *E. coli* 相比, *V. natriegens* 的过氧化氢酶活性明显更低^[6], 应激反应不那么激烈, 对环境以及压力波动的耐受性更强^[13]。上述优势使得 *V. natriegens* 有潜力成为代谢工程与蛋白质表达的下一代主力表达宿主。

有研究表明 *V. natriegens* 可以作为工业底盘细胞, 利用廉价碳源生产多种化学物质, 如氨基酸^[14]、黑色素^[15]、聚 β -羟基丁酸酯^[16]、多元醇^[17]等。此外, *V. natriegens* 还可以表达、分泌异源蛋白。Kormanová 等^[18]将 *V. natriegens* 作为表达古菌过氧化氢酶(AfKatG)的宿主与 *E. coli* 作比较, 结果显示 AfKatG 在 *V. natriegens* 中的可溶性蛋白比 *E. coli* 高。Xu 等^[19]将携带 196 种不同目的基因(gene of interest, GOIs)的 pET 质粒在基因组整合 T7 RNA 聚合酶表达框的 *V. natriegens* VnDX 中异源表达, 结果表明 65% 的 GOIs 可以

在 *V. natriegens* VnDX 中可溶性表达, 说明 *V. natriegens* VnDX 与 pET 系统可以相互兼容。崔阳等^[20]表征分析了 *V. natriegens* 外膜囊泡 (outer membrane vesicle, OMV) 蛋白组, 发现 OmpA 家族的 OmpA24 可以作为外源蛋白融合载体, 将超折叠绿色荧光蛋白 (superfolder green fluorescent protein, sfGFP) 以融合蛋白的形式运载到外膜囊泡 OMV 中。目前已经有约 150 多种蛋白在 *V. natriegens* 实现了异源表达, 其中酶蛋白有 130 多种, 但是未见普鲁兰酶在 *V. natriegens* 异源表达的报道。

本研究使用了基因组整合 T7 RNA 聚合酶表达框的 *V. natriegens* VnDX 作为普鲁兰酶的表达宿主, 将带有普鲁兰酶编码基因的表达载体质粒转入 *V. natriegens* VnDX 中, 成功实现了普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中的异源分泌表达。此外分别对信号肽、发酵温度、诱导剂浓度以及甘氨酸浓度进行优化, 以期提高大分子量普鲁兰酶蛋白在需钠弧菌中的分泌表达水平。最后, 对比了大肠杆菌与需钠弧菌对普鲁兰酶分泌表达的能力。本研究可为大分子量蛋白在原核宿主细胞中的分泌表达提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*) VnDX 菌株由中国科学院分子植物科学卓越创新中心杨晟研究员提供, 其基因组整合 T7 RNA 聚合酶表达框^[19]; 大肠杆菌 *E. coli* JM109 为本实验保藏; 重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-OmpA/PulA)、*E. coli* BL21(DE3) (pET24a-OmpA/PulN2) 均由本实验室构建并保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 脑心浸液肉汤培养基 (brain-heart infusion broth, BHI Broth) 购自青岛海博生物技术有限公司, 酵母粉与蛋白胨购自 Oxoid 公司, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, dNTPs 与 DNA 聚合酶 PrimerSTAR[®] 购自宝生物工程(大连)有限公司, 普鲁兰多糖来自北京百灵威科技有限公司。其余试剂均为分析纯, 来自国药集团化学试剂有限公司。引物合成与测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

PCR 仪、蛋白电泳仪购自 Bio-Rad 公司, 722N 可见光分光光度计购自上海仪电分析仪器有限公司, JY92-IIN 型超声波细胞破壁仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

BHI 培养基: BHI Broth 38.5 g/L。BHIv2 培养基: BHI 培养基中添加 v2 盐 (11.9 g/L 氯化钠, 0.33 g/L 氯化钾, 4.7 g/L 六水合氯化镁)。LB 液体培养基: 10 g/L 氯化钠, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, pH 7.2; LB 固体平板在 LB 液体培养基中加入 15 g/L 琼脂粉。TB 发酵培养基: 5 g/L 甘油, 12 g/L 蛋白胨, 24 g/L 酵母粉, 16.43 g/L 磷酸氢二钾, 2.3 g/L 磷酸二氢钾。TBv2 培养基: TB 培养基中添加 v2 盐。

用于培养 *V. natriegens* VnDX 的 BHIv2 培养基与 TBv2 培养基使用前加入终浓度为 200 μ g/mL 的卡那霉素; 用于培养 *E. coli* BL21(DE3) 的 LB 培养基与 TB 培养基使用前加入 50 μ g/mL 的卡那霉素。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞的制备及转化

详见参考文献[21]中方法。

1.2.2 需钠弧菌感受态细胞的制备及电转化方法

根据 Weinstock 等^[6]报道的方法,略有改动。将 *V. natriegens* VnDX 接种至 10 mL 的 BHIv2 培养基中,在 30 °C、200 r/min 条件下培养过夜。取 0.6 mL 的菌液接种至 60 mL BHIv2 培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下生长,直至 OD_{600} 达到 0.5。将培养物移入离心管中,置冰上孵育 15 min 后,在 4 °C、6 500 r/min 条件下离心 20 min。弃去上清,将细胞沉淀重悬于 10 mL 电击缓冲液(680 mmol/L 蔗糖,7 mmol/L K_2HPO_4 , pH 7.0)。在 4 °C、6 700 r/min 条件下离心 15 min,弃上清收集细胞,重复洗涤 2 次。将细胞轻轻悬浮于电击缓冲液中至 OD_{600} 达到 16,将细胞分装到冷冻管中,每管 100 μ L,放置于 -80 °C 保存备用。

通过质粒小提试剂盒提取质粒 pET24a-*OmpA/PulA* 与 pET24a-*OmpA/PulN2*,将感受态细胞从 -80 °C 中取出,在冰上融化。取 10 μ L 质粒与感受态细胞混合,在冰上放置 3 min。将感受态细胞-质粒 DNA 混合物转移到 1 mm 电击杯中,在 0.7 kV、25 μ F、200 Ω 条件下电击转化。之后,加入 500 μ L 恢复培养基(BHIv2, 680 mmol/L 蔗糖),转移到 1.5 mL 离心管,在 37 °C、100 r/min 条件下孵育 1-2 h。将菌液涂布于 100 μ g/mL 卡那霉素的 LBv2 平板上,37 °C 过夜筛选阳性转化子。筛选到阳性转化子分别命名为 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 和

V. natriegens VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*)。

1.2.3 基于一步 PCR 扩增的需钠弧菌天然信号肽编码基因片段置换

为考察需钠弧菌天然信号肽对重组普鲁兰酶分泌表达的影响,以 *V. natriegens* 海藻酸裂解酶信号肽编码基因片段 *SPalg521* (5'-ATGAAGCATATTTTCTTCAAAAGCTTGTTAGCTTCTTCTATTTACTTGCTGTGGGC-3') 替换 pET24a-*OmpA/PulA* 中原有的信号肽编码基因 *OmpA*。首先,设计合成一对扩增引物 Fusion-*SPalg521-F* 与 Fusion-*SPalg521-R* (表 1),以 pET24a-*OmpA/PulA* 质粒为模板,通过 PCR 反应扩增质粒原有信号肽以外区域,同时引入信号肽 *SPalg521* 编码片段。PCR 的反应体系(50 μ L)为:0.5 μ L PrimeSTAR[®], 10 μ L 5 \times PS 缓冲液(Mg²⁺ plus), 4 μ L dNTPs, 上下游引物各 1 μ L, 0.5 μ L 质粒模板, 33 μ L 双蒸水。PCR 扩增程序为:94 °C 8 min; 98 °C 30 s, 55 °C 5 s, 72 °C 8 min 20 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 *Dpn* I 消化后,热激转化大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞。转化混合物经过孵育后,涂布含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子。挑取阳性转化子进行培养,抽提质粒测序。经过测序验证正确的质粒即为 pET24a-*SPalg521/PulA*。将质粒 pET24a-*SPalg521/PulA* 电击转化 *V. natriegens* VnDX 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL 卡那霉素的 LBv2 平板上筛选阳性转化子,阳性转化子即为重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*SPalg521/PulA*)。

表 1 用于置换信号肽编码基因片段的引物

Table 1 Primers used for exchanging the gene segment of signal peptide

| Primer name | Primer sequence (5'→3') | Size (bp) |
|---------------------------|---|-----------|
| Fusion- <i>SPalg521-F</i> | TCAAAAGCTTGTTAGCTTCTTCTATTTTACTTGCTGTGGGCATGGATGGTAACACGACC | 65 |
| Fusion- <i>SPalg521-R</i> | GCTAACAAGCTTTTGAAGAAAATATGCTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC | 59 |

1.2.4 重组蛋白表达和 SDS-PAGE 分析

重组需钠弧菌培养:取 10 μ L 甘油菌接种至 BHIv2 培养基中,30 $^{\circ}$ C 过夜培养。然后,以 5% (体积分数)的接种量转接至 TBv2 发酵培养基中,继续在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养 2 h,加入 0.3 mmol/L IPTG 后,继续诱导培养 36 h。12 000 r/min 离心 5 min,分别收集发酵上清液与菌体沉淀,用于后续分析。

重组大肠杆菌培养:取 10 μ L 甘油菌接种至 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 8–10 h。按 5%接种量接种种子液至 TB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 3 h,加入 0.05 mmol/L IPTG,在 30 $^{\circ}$ C 条件下继续培养 36 h,离心收集发酵上清与菌体。

将菌体用 20 mmol/L PBS (pH 6.0)悬浮至 OD_{600} 为 5,超声破碎 10 min。离心收集破碎上清与破碎沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 普鲁兰酶活力测定

分别取 1 mL 1.0%普鲁兰多糖溶液与 0.9 mL 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 4.5)于试管中,在 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中预热 10 min。加入 0.1 mL 酶液,混匀后 60 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 3 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂终止反应,沸水浴 7 min,在冰水中冷却。使用去离子水把反应体系定容至 15 mL,在 540 nm 处检测吸光值。

1.2.6 普鲁兰酶的表达条件优化

将重组菌株分别在 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 与 37 $^{\circ}$ C 条件下发酵,考察不同温度条件对重组菌株生长情况与普鲁兰酶分泌表达水平的影响。

在最优温度条件下,考察 0.05、0.1、0.3、1、2 mmol/L IPTG 对重组菌株生长情况与普鲁兰酶分泌表达水平的影响。

为了进一步提高普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中的胞外表达,在 TBv2 培养基中加入 2.5、5、7.5、10、15、20、25、30、40 g/L 甘氨酸,

对比不同浓度的甘氨酸对重组菌株生长情况与普鲁兰酶分泌表达水平的影响。

1.2.7 重组菌株生长及产酶曲线测定

按最优条件发酵重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 与 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*),每隔 4 h 取样。同时以 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*) 与 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*) 为对照,在最优条件下发酵 36 h 考察重组菌株在诱导表达后不同时间的生长情况与普鲁兰酶的分泌表达水平,并与需钠弧菌重组菌株进行对比。

2 结果与分析

2.1 普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中的重组表达

首先,提取质粒并分别电击转化至 *V. natriegens* VnDX,获得重组菌株。重组菌株转接到 TBv2 培养基中,在 30 $^{\circ}$ C 经 0.3 mmol/L IPTG 诱导表达 36 h 后,取发酵上清液、菌体破碎上清以及菌体破碎沉淀分别进行酶活力测定,并进行 SDS-PAGE 分析。同时,以重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*) 作为对照,进行对比。

如图 1 所示,*PulA* 和 *PulN2* 分别在 66.2–116.4 kDa 之间有明显的蛋白条带,条带分子量大小与对照菌株(重组大肠杆菌)以及预期理论蛋白分子量一致,表明 *PulA* (理论分子量 101 kDa) 与 *PulN2* (理论分子量 80 kDa) 在 *V. natriegens* VnDX 中成功表达。如图 1A 所示,*PulA* 在 *V. natriegens* VnDX 中表达时,在细胞破碎上清中的 *PulA* 蛋白含量最高,少量在细胞破碎沉淀与发酵上清中;而在 *E. coli* BL21(DE3) 中,*PulA* 只有极少量在发酵液上清,较多蛋白

存在于细胞破碎沉淀和细胞破碎上清中。如图1B所示, PulN2在 *V. natriegens* VnDX 中表达时, 在细胞破碎上清与细胞破碎沉淀中蛋白含量很高, 少部分在发酵液上清中, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中, PulN2 蛋白含量的分布情况与在 *V. natriegens* VnDX 相似, 但蛋白含量更高。

如表2所示, 普鲁兰酶 PulA (PulN2) 的发酵液上清酶活与总酶活分别为 13.6 U/mL (9.3 U/mL) 和 122.0 U/mL (108.9 U/mL), 分别是对照组的 186.3% (18.5%) 和 96.4% (57.5%)。由发酵结果可知, 在 *V. natriegens* VnDX 中, PulA 的分泌表达效果比 PulN2 更好。与大肠杆菌相比, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中分泌表达效果较差的分子量较大

的 PulA, 在 *V. natriegens* VnDX 得到了更好的分泌表达; 而在 *E. coli* BL21(DE3) 中分泌表达效果较好的 PulN2, 在 *V. natriegens* VnDX 的分泌表达效果则比较差。

2.2 *V. natriegens* 天然信号肽 SPAlg521 对普鲁兰酶分泌表达的影响

利用 PCR 技术将质粒 pET24a-*OmpA/PulA* (图 2A 上) 中原有的信号肽 *OmpA* 编码片段替换为 *V. natriegens* 海藻酸裂解酶蛋白的信号肽 SPAlg521 编码片段, 转入 *E. coli* JM109 中筛选阳性转化子, 并测序验证, 得到重组质粒 pET24a-SPAlg521/*PulA* (图 2A 下)。采用电击法将重组质粒转化入 *V. natriegens* VnDX 中。将重组

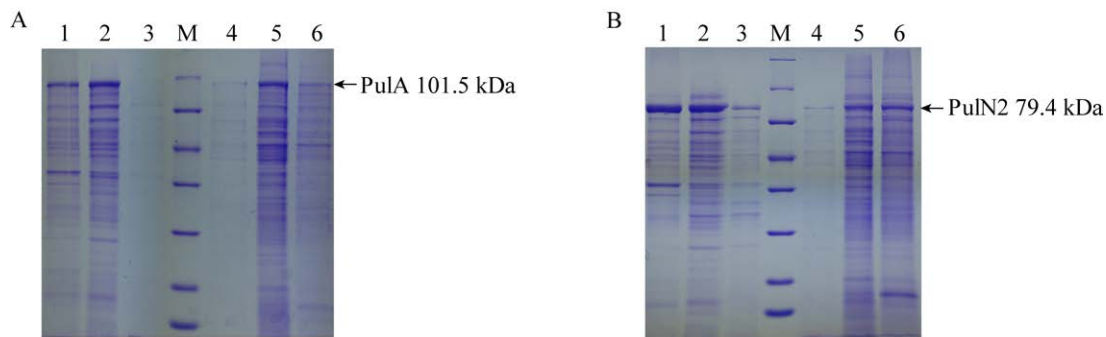


图1 SDS-PAGE 分析 PulA 与 PulN2 分别在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 与 *Vibrio natriegens* VnDX 中分泌表达情况

Figure 1 SDS-PAGE analysis of the secretory expression of PulA and PulN2 in *Escherichia coli* BL21(DE3) and *Vibrio natriegens* VnDX. A: Lane 1, 2, and 3 are cell lysate precipitation, cell lysate supernatant and culture supernatant of *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*), respectively; M: Protein marker (from bottom to top: 14.4, 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2 and 116.0 kDa); Lane 4, 5, and 6 are culture supernatant, cell lysate supernatant and cell lysate precipitation of *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*), respectively. B: Lane 1, 2, and 3 are cell lysate precipitation, cell lysate supernatant and culture supernatant of *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*), respectively; M: Protein marker (from bottom to top: 14.4, 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2 and 116.0 kDa); Lane 4, 5, and 6 are culture supernatant, cell lysate supernatant and cell lysate precipitation of *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*), respectively.

表2 普鲁兰酶(PulA、PulN2)在需钠弧菌与大肠杆菌中重组表达酶活力对比

Table 2 Comparison of the activities of PulA and PulN2 in *Vibrio natriegens* VnDX and *E. coli* BL21(DE3)

| Expression host | <i>E. coli</i> BL21(DE3) | | <i>V. natriegens</i> VnDX | |
|--------------------------------------|--------------------------|-------|---------------------------|-------|
| | PulA | PulN2 | PulA | PulN2 |
| Type of pullulanase | | | | |
| Extracellular enzyme activity (U/mL) | 7.3 | 50.4 | 13.6 | 9.3 |
| Intracellular enzyme activity (U/mL) | 119.7 | 139.0 | 108.4 | 99.6 |
| Total enzyme activity (U/mL) | 126.6 | 189.4 | 122.0 | 108.9 |

菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-SPalg521/PulA) 与对照菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulA) 分别进行诱导表达。两种重组菌发酵后, 培养基上清与菌体破细胞上清样品分别跑 SDS-PAGE 蛋白电泳进行分析。结果如图 2B 所示, 置换信号肽后的重组普鲁兰酶 PulA 在 *V. natriegens* VnDX 中的胞外上清与破细胞上清目的蛋白条带明显变细。

酶活力测定结果如表 3 所示, 重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-SPalg521/PulA), 胞外酶活和细胞破碎上清酶活分别为 4.2 U/mL 和

28.8 U/mL, 仅为对照菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulA) 胞外酶活力与破细胞上清酶活的 21.9% 和 32.2%。进一步延长发酵时间至 72 h, 重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-SPalg521/PulA) 发酵胞外酶活和细胞破碎上清分别为 12.6 U/mL 和 17.3 U/mL, 分别为对照菌株的 65.6% 和 19.4%。结果表明将信号肽 *OmpA* 置换为 *Spalg521* 使得 PulA 在需钠弧菌中的表达量降低, 因此没有进一步将 *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulN2) 的 *OmpA* 信号肽替换为 *Spalg521* 信号肽。

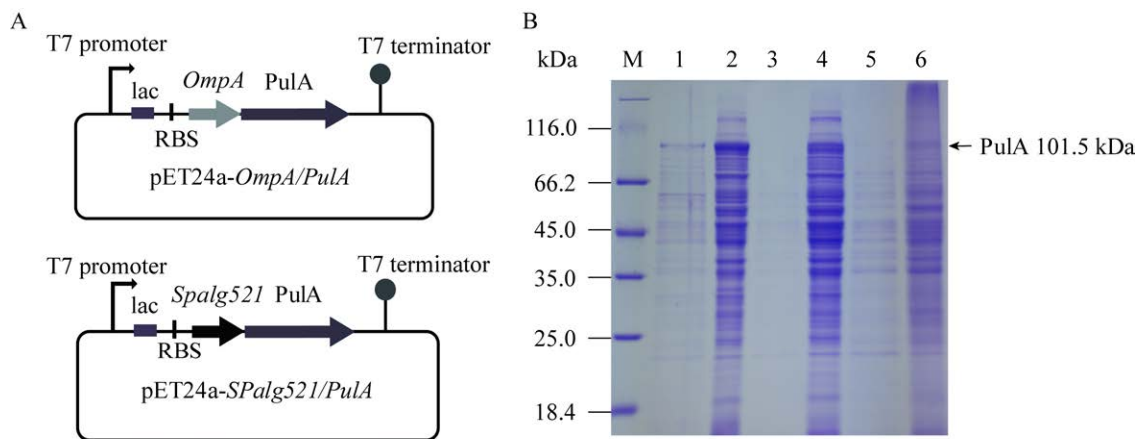


图 2 质粒图谱示意图以及 SDS-PAGE 分析不同信号肽的重组需钠弧菌分泌表达 PulA 情况

Figure 2 Plasmid profile diagram and SDS-PAGE analysis of the secretory expression of PulA in *Vibrio natriegens* VnDX with different signal peptide. A: Plasmid profile diagram of pET24a-OmpA/PulA and pET24a-SPalg521/PulA. B: SDS-PAGE analysis of the secretory expression of PulA. M: Protein marker; Lane 1 and 2 are culture supernatant and cell lysate supernatant of *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulA) at 36 h; Lane 3 and 4 are culture supernatant and cell lysate supernatant of *V. natriegens* VnDX (pET24a-SPalg521/PulA) at 36 h; Lane 5 and 6 are culture supernatant and cell lysate supernatant of *V. natriegens* VnDX (pET24a-SPalg521/PulA) at 72 h.

表 3 采用不同信号肽的普鲁兰酶 PulA 在需钠弧菌中发酵表达的酶活力对比

Table 3 Comparison of the activity of PulA in *Vibrio natriegens* VnDX with different signal peptide

| Plasmid | pET24a-OmpA/PulA | pET24a-SPalg521/PulA | |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|------|
| Fermentation time (h) | 36 | 36 | 72 |
| Extracellular enzyme activity (U/mL) | 19.2 | 4.2 | 12.6 |
| Intracellular enzyme activity (U/mL) | 89.2 | 28.8 | 17.3 |
| Total enzyme activity (U/mL) | 108.4 | 33.0 | 29.9 |

2.3 发酵温度对重组 *V. natriegens* VnDX 分泌表达普鲁兰酶的影响

诱导温度是影响重组蛋白表达以及折叠的重要因素之一。为考察发酵温度对重组普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中分泌表达的影响,将重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 与 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*) 分别在 20、25、30、37 °C 温度条件下进行诱导表达。

由图 3A 可知,当诱导温度为 25 °C 时, *V. natriegens* VnDX 的生长情况最好, OD_{600} 为 12.0。随着温度的进一步升高,菌株的 OD_{600} 逐渐降低,在 37 °C 时达到最低, OD_{600} 为 7.2。由图 3B 可知,随着诱导温度的升高, *PulA* 与 *PulN2* 的胞外酶活逐渐升高,在 30 °C 时达到最大值,分别为 23.6 U/mL 和 14.3 U/mL。当温度进一步升高至 37 °C 时, *PulA* 和 *PulN2* 胞外酶活降低。此外,计算发现在 37 °C 时 *PulA* 和 *PulN2* 的胞外分泌比例达到最高,但此时 *PulA* 和 *PulN2* 总酶活显著降低,仅为 43.8 U/mL 和 20.6 U/mL。因此,30 °C 为需钠

弧菌中 *PulA* 和 *PulN2* 分泌表达的最佳温度。

综上所述,高温与低温对菌体生长以及普鲁兰酶的表达均有不利的影响。随着诱导温度的升高,重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*) 菌体生长情况及 *PulA* 和 *PulN2* 的胞外酶活出现了先增高后降低的趋势,尽管最佳菌体生长温度与普鲁兰酶最佳分泌温度不同,选择 30 °C 作为发酵条件,此时菌体生长与酶分泌达到平衡状态。

2.4 IPTG 浓度对重组 *V. natriegens* VnDX 分泌表达普鲁兰酶的影响

在最佳发酵温度 30 °C 条件下,分别采用 0.05、0.1、0.3、1.0 与 2.0 mmol/L 的 IPTG 对重组菌株进行诱导,考察 IPTG 浓度对重组菌株生长情况以及普鲁兰酶分泌表达的影响。

如图 4A 所示, IPTG 的浓度对重组 *V. natriegens* VnDX 的生长情况没有明显影响。IPTG 浓度在 0.05–2.0 mmol/L 范围内,重组需钠弧菌的 OD_{600} 都在 9.0 左右。

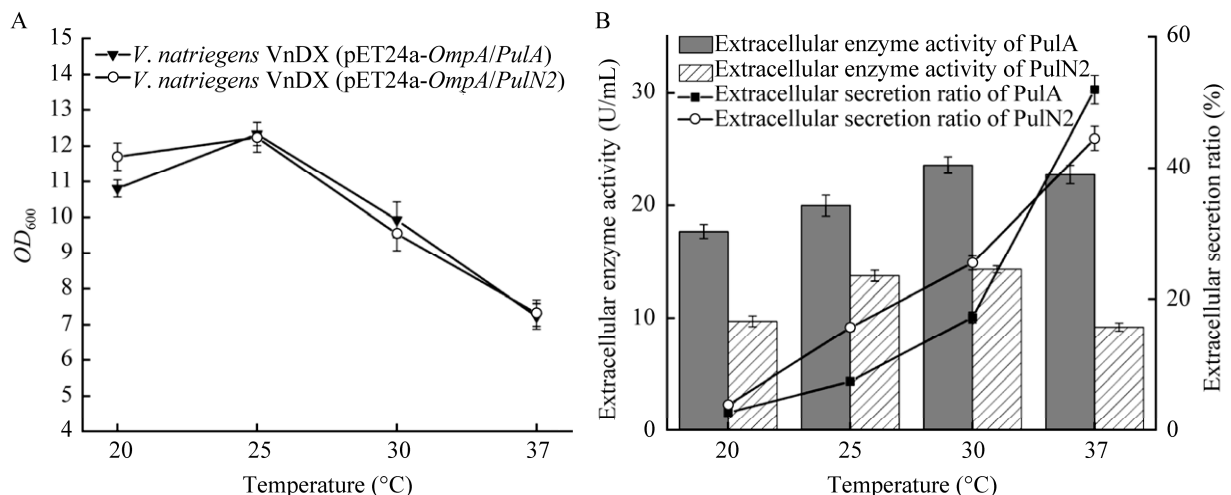


图 3 发酵温度对重组菌株生长以及普鲁兰酶分泌表达的影响

Figure 3 Effect of fermentation temperature on the growth (A) and secretory expression of pullulanase (B) in recombinant strain.

如图 4B 所示,随着诱导剂 IPTG 添加浓度的增加, PulA 的胞外酶活与胞外分泌比例逐渐升高,并且在 0.3 mmol/L 时达到最高,分别为 24.3 U/mL 和 25.7%;此外,1 mmol/L 的 IPTG 对 PulN2 的胞外酶活与胞外分泌比例的促进效果最佳,分别为 28.5 U/mL 和 28.6%。

2.5 甘氨酸浓度对普鲁兰酶分泌表达的影响

通过温度以及 IPTG 浓度的初步优化,普鲁兰酶的胞外酶活以及胞外分泌比例得到一定的提高,但仍然只有不足 30% 的普鲁兰酶分泌到胞外。文献报道显示,培养基中添加甘氨酸,可以显著提高重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 分泌表达(渗漏表达)胞外蛋白的能力^[22-24],但是未见添加甘氨酸对于重组蛋白在需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 中胞外分泌能力影响的报道。因此,本研究分别在 TBv2 和 TB 发酵培养基中分别添加 2.5、5、7.5、10、15、20、25、30、40 g/L 甘氨酸,考察甘氨酸对需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 和大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 分泌表达普鲁兰酶效率的影响。

由图 5A 可知,随着培养基中甘氨酸浓度的

增加,重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 和需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 细胞的生长均会受到影响。当甘氨酸浓度为 2.5 g/L 时对菌体生长影响最小, *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 与 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*) 的菌体浓度 OD_{600} 值分别为 10.29 和 10.32。随后,重组菌株菌体量急剧下降,在 40 g/L 时,二者的菌体浓度 OD_{600} 值降到最低,分别为 3.18 和 4.23。甘氨酸浓度对重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 生长的影响更为明显,随着甘氨酸浓度的提高,重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 细胞的生长受到显著抑制。当甘氨酸浓度达到 30 g/L 时,重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 几乎无法生长。

随着甘氨酸浓度的增加, PulA 与 PulN2 在需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 中的胞外酶活与胞外分泌比例都在逐步升高。当甘氨酸浓度为 40 g/L 时,可以显著增加普鲁兰酶的胞外产量, PulA 的胞外酶活与胞外分泌比例分别为 62.2 U/mL 和 64.5% (图 5B 和 5D); PulN2 的胞外酶活与胞外分泌比例分别为 65.2 U/mL 和 67.7% (图 5C 和 5E)。由图 5B 和 5C 可知,在大肠杆菌 *E. coli*

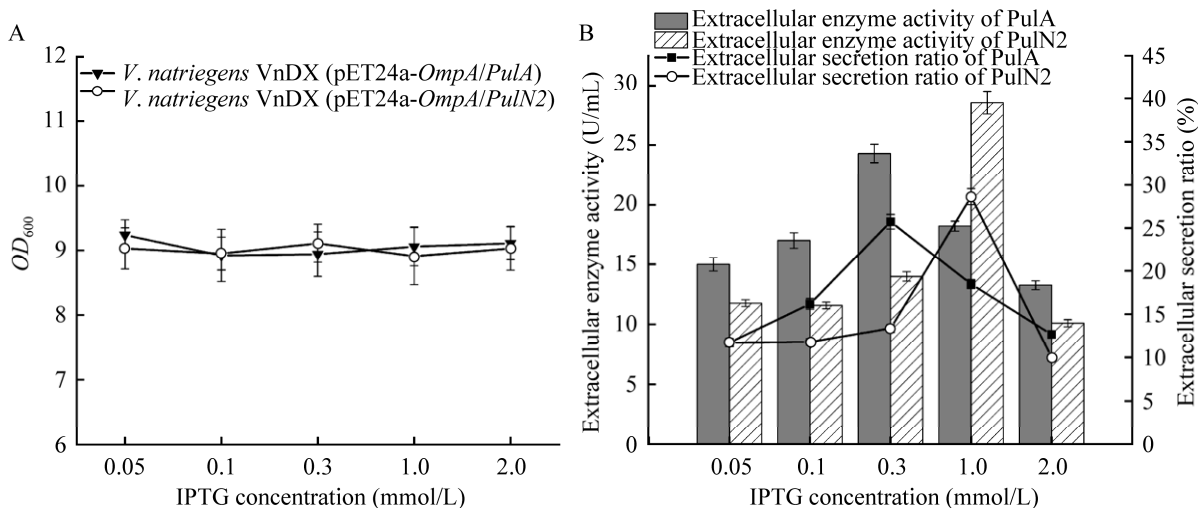


图 4 诱导剂浓度对重组菌株生长以及普鲁兰酶分泌表达的影响

Figure 4 Effect of inducer concentration on the growth (A) and secretory expression of pullulanase (B) in recombinant strain.

BL21(DE3)中, PulA 在甘氨酸浓度达到 20 g/L 时, 其胞外酶活以及胞外分泌比例达到最优, 分别为 56.4 U/mL 和 52.0% (图 5B); 甘氨酸浓度达到 7.5 g/L 时, PulN2 的胞外酶活达到最高, 其胞外酶活以及胞外分泌比例为 96.1 U/mL 和 62.6% (图 5C)。

结果表明, 需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 对高浓度甘氨酸的耐受能力显著高于大肠杆菌

E. coli BL21(DE3)。通过在发酵培养基中添加甘氨酸, PulA 在 *V. natriegens* VnDX 中的胞外酶活达到 *E. coli* BL21(DE3)的 1.1 倍, 总酶活为在 *E. coli* BL21(DE3)中的 88.9%; 而 PulN2 的胞外酶活虽然提高了, 但其胞外酶活仅为 *E. coli* BL21(DE3)中的 67.8%, 总酶活也仅为在 *E. coli* BL21(DE3)中的 62.7%。

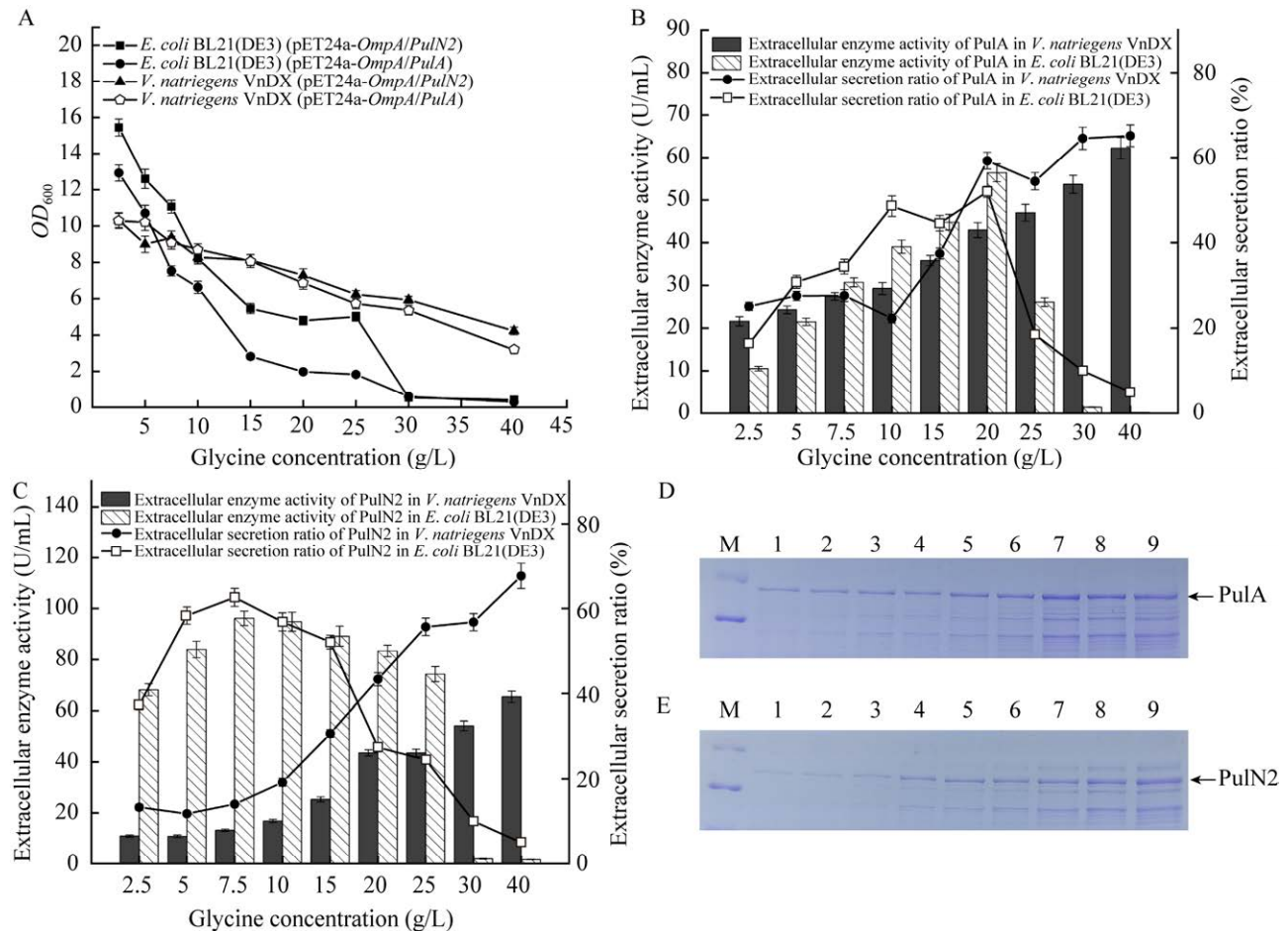


图 5 甘氨酸浓度对重组菌株的生长以及普鲁兰酶分泌表达的影响

Figure 5 Effect of glycine concentration on the growth of recombinant strain and secretory expression of pullulanase. A: Growth of cell with different concentration of glycine. B: Secretory expression of PulA in *V. natriegens* VnDX and *E. coli* BL21(DE3) with different concentration of glycine. C: Secretory expression of PulN2 in *V. natriegens* VnDX and *E. coli* BL21(DE3) with different concentration of glycine. D: SDS-PAGE analysis of *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulA) culture supernatant with different concentration of glycine. E: SDS-PAGE analysis of *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulN2) culture supernatant with different concentration of glycine. M: Protein marker; Lane 1: 2.5 g/L; Lane 2: 5 g/L; Lane 3: 7.5 g/L; Lane 4: 10 g/L; Lane 5: 15 g/L; Lane 6: 20 g/L; Lane 7: 25 g/L; Lane 8: 30 g/L; Lane 9: 40 g/L.

2.6 重组菌株生长及产酶曲线

根据上述信号肽、发酵温度、IPTG 浓度和甘氨酸浓度等条件的优化结果, 在最优条件下, 考察发酵时间对重组需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 与大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 生长以及胞外分泌表达普鲁兰酶的影响。 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*) 在添加 40 g/L 甘氨酸的 TBv2 培养基中发酵; *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*) 分别在添加 20 g/L 与 7.5 g/L 甘氨酸的 TB 培养基中发酵。

由图 6A、6B 可知, *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *V. natriegens* VnDX

(pET24a-*OmpA/PulN2*) 分别在 20 h 和 16 h 时细胞密度达到最高。由图 6C 和 6D 可知, *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*) 和 *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*) 分别在 16 h 与 24 h 时细胞密度达到最高。

由表 4 可知, 发酵结束后普鲁兰酶 PulA (PulN2) 在需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 和大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中的胞外酶活分别为 61.6 U/mL (64.3 U/mL) 和 57.1 U/mL (104.4 U/mL), PulA 在需钠弧菌中的胞外酶活是大肠杆菌的 1.1 倍, 而 PulN2 在需钠弧菌中的胞外酶活仅为大肠杆菌的 61.6%。结果表明, 需钠弧菌 *V. natriegens* VnDX 分泌大分子量的普鲁兰酶 PulA 比大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 更有优势。

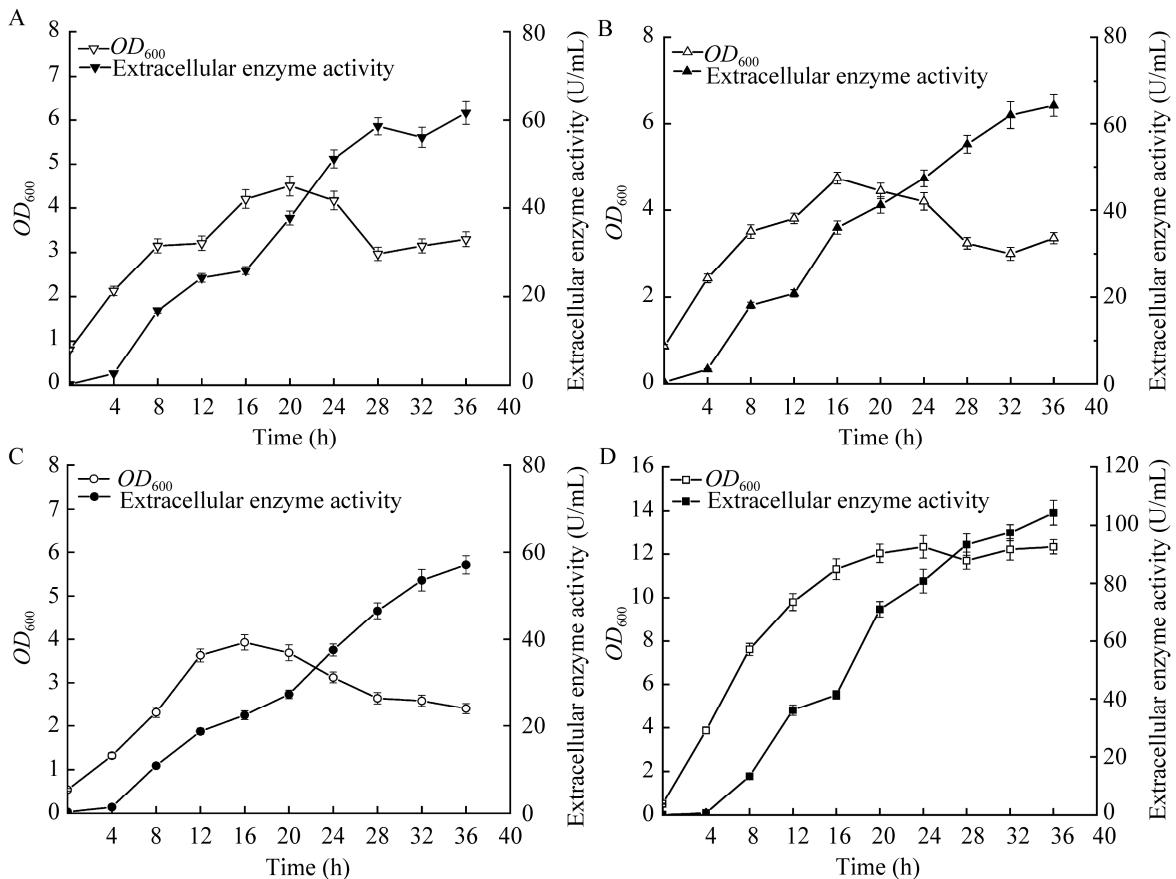


图 6 重组菌株生长及产酶曲线

Figure 6 Profile of growth and enzyme production of recombinant strains. Growth and enzyme production curve of *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulA*) (A), *V. natriegens* VnDX (pET24a-*OmpA/PulN2*) (B), *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulA*) (C), and *E. coli* BL21(DE3) (pET24a-*OmpA/PulN2*) (D).

表4 普鲁兰酶(PulA、PulN2)在 *Vibrio natriegens* VnDX 与 *Escherichia coli* BL21(DE3)分泌表达情况的对比

Table 4 Comparison of secretory expression of PulA and PulN2 in *Vibrio natriegens* VnDX and *Escherichia coli* BL21(DE3)

| Expression host | <i>V. natriegens</i> VnDX | | <i>E. coli</i> BL21(DE3) | |
|--------------------------------------|---------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | PulA | PulN2 | PulA | PulN2 |
| Type of pullulanase | | | | |
| Fermentation temperature (°C) | 30 | 30 | 30 | 30 |
| IPTG concentration (mmol/L) | 0.3 | 1.0 | 0.05 | 0.05 |
| Glycine concentration (g/L) | 40.0 | 40.0 | 20.0 | 7.5 |
| Extracellular enzyme activity (U/mL) | 61.6 | 64.3 | 57.1 | 104.4 |

3 讨论

近年来,随着对需钠弧菌的深入研究,外源蛋白在此系统中的表达与分泌受到了越来越多人的关注。研究发现,需钠弧菌有着生长迅速、底物广谱性、易于遗传操作、易于表达外源蛋白等优点,有望成为下一代重要的外源蛋白表达宿主^[25-26]。但是,已有研究多为异源蛋白在需钠弧菌中的胞内重组表达,对分泌表达外源蛋白方面的研究还较少,且未见普鲁兰酶在需钠弧菌中分泌表达的报道。本研究将普鲁兰酶在需钠弧菌中进行分泌表达,并对发酵条件进行了优化,最后比较了需钠弧菌表达系统与大肠杆菌表达系统分泌表达普鲁兰酶的差异,可为需钠弧菌分泌表达外源蛋白提供参考。

本研究首先构建了产普鲁兰酶 PulA 和 PulN2 的重组菌株 *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulA) 和 *V. natriegens* VnDX (pET24a-OmpA/PulN2),发现 PulA 在 *V. natriegens* VnDX 分泌效果优于 *E. coli* BL21(DE3)。然后,在 *V. natriegens* VnDX 中评估了 *V. natriegens* 天然分泌的海藻酸裂解酶的信号肽 SPAlg521 对 PulA 分泌表达的影响,研究发现 SPAlg521 信号肽降低了 PulA 在 *V. natriegens* VnDX 中的分泌表达水平,可能由于 SPAlg521 信号肽与普鲁兰酶匹配度较低,后续研究可以考虑筛选更多不同的信号肽。其次,发酵温度是影响 *V. natriegens*

VnDX 分泌表达普鲁兰酶的关键因素之一,本研究发现 *V. natriegens* VnDX 的最佳发酵温度为 30 °C,温度过低和过高均不利于普鲁兰酶的分泌表达,可能原因是:温度过低会影响细胞膜的流动性,不利于重组蛋白的分泌;温度过高则会使重组蛋白在胞内来不及分泌形成包涵体^[27],从而影响重组蛋白的表达。

此外,本研究还考察了 IPTG 浓度和甘氨酸浓度对普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中分泌表达的影响,其中甘氨酸浓度的影响更为显著。研究表明,在 TBv2 培养基中添加 40 g/L 的甘氨酸可以显著提高普鲁兰酶在 *V. natriegens* VnDX 中的分泌表达,PulA 和 PulN2 的胞外酶活分别达到 61.6 U/mL 与 64.3 U/mL,可能原因是甘氨酸可以修饰肽聚糖,取代肽聚糖层中的 D-丙氨酸,形成更松散的交联肽聚糖^[28],提高细胞外膜的渗透性来改善目标蛋白的分泌。同时,在低浓度甘氨酸条件下,需钠弧菌的发酵密度低于大肠杆菌,这可能是由于需钠弧菌比大肠杆菌生产更多的胞外多糖与细胞多糖,碳源被用于多糖合成,导致细胞被荚膜多糖或生物膜包裹^[19],这是未来需钠弧菌在工业应用中的局限性。但是,随着甘氨酸浓度的增加,需钠弧菌的菌体密度逐渐高于大肠杆菌,因为需钠弧菌对甘氨酸的耐受度比大肠杆菌高。

此外,如表 5 所示,普鲁兰酶的常用表达宿

主还有枯草芽孢杆菌与毕赤酵母。枯草芽孢杆菌与需钠弧菌相比无外膜结构,有蛋白分泌能力强大的优势,所以十分适合普鲁兰酶的异源表达。关于普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中的异源表达已有大量研究,其中 Zhang 等^[29]通过增强普鲁兰酶在细胞外的折叠以及优化信号肽,在 3 L 发酵罐中,普鲁兰酶胞外酶活可达迄今为止报道的最高的 8 037.91 U/mL。但是,枯草芽孢杆菌能够本底表达多种蛋白酶,目的蛋白在枯草芽孢杆菌中表达时较在需钠弧菌中稳定性较低。毕赤酵母作为应用最广泛的真核表达宿主,较需钠弧菌有发酵工艺成熟、产物易分离纯化等优势。李兵^[30]

在毕赤酵母 SMD1168 中成功表达普鲁兰酶,其胞外表达量最高可达 225 U/mL,并且该酶经过毕赤酵母糖基化修饰;王兵波等^[31]按照巴斯德毕赤酵母 GS115 的密码子偏好性对普鲁兰酶基因进行密码子优化,密码子优化后的普鲁兰酶胞内酶活为 165.2 U/mL,未经优化的普鲁兰酶胞内酶活为 39.4 U/mL,经发酵优化后在 5 L 发酵罐中其胞内酶活最高可达 2 031 U/mL。由于毕赤酵母较需钠弧菌有翻译后修饰与密码子偏好性等特点,而普鲁兰酶基因的来源一般为细菌^[32],所以在毕赤酵母中异源表达的成功率与产量较低。

表 5 不同宿主表达普鲁兰酶的水平

Table 5 The production of pullulanases in different expression hosts

| Expression host | Pullulanase | Molecular mass (kDa) | Fermentation scale | Production (U/mL) | Reference |
|----------------------------|-------------|----------------------|--------------------|-------------------|-----------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | PulA | 101.0 | Flask | 57.1 | This work |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | PulN2 | 80.0 | Flask | 104.4 | This work |
| <i>V. natriegens</i> VnDX | PulA | 101.0 | Flask | 61.6 | This work |
| <i>V. natriegens</i> VnDX | PulN2 | 80.0 | Flask | 64.3 | This work |
| <i>B. subtilis</i> WS9D | PulBd | 78.9 | 3 L fermentor | 8 037.9 | [29] |
| <i>P. pastoris</i> SMD1168 | PUL | 120.0 | Flask | 225.0 | [30] |
| <i>P. pastoris</i> GS115 | PulBd | 106.4 | 5 L fermentor | 2 031.0 | [31] |

REFERENCES

- [1] 黄婷婷, 张玉华, 段绪果. 普鲁兰酶的异源表达、结构解析及分子改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4432-4448.
HUANG TT, ZHANG YH, DUAN XG. Advances in heterologous expression, structural elucidation and molecular modification of pullulanase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4432-4448 (in Chinese).
- [2] XU P, ZHANG SY, LUO ZG, ZONG MH, LI XX, LOU WY. Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(3): 1-10.
- [3] BANEYX F, MUJACIC M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(11): 1399-1408.
- [4] WANG XY, CHEN YQ, NIE Y, XU Y. Improvement of extracellular secretion efficiency of *Bacillus naganensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli*: peptide fusion and cell wall modification[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 155: 72-77.
- [5] SONG W, NIE Y, MU XQ, XU Y. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus naganensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis*: effects of promoter and host[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 124: 23-31.
- [6] WEINSTOCK MT, HESEK ED, WILSON CM, GIBSON DG. *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology[J]. Nature Methods, 2016, 13(10): 849-851.
- [7] EAGON RG. *Pseudomonas natriegens*, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes[J]. Journal of Bacteriology, 1962, 83(4): 736-737.
- [8] LONG CP, GONZALEZ JE, CIPOLLA RM, ANTONIEWICZ MR. Metabolism of the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens* elucidated by ¹³C

- metabolic flux analysis[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 191-197.
- [9] AIYAR SE, GAAL T, GOURSE RL. rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(5): 1349-1358.
- [10] XU J, YANG S, YANG L. *Vibrio natriegens* as a host for rapid biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(4): 381-384.
- [11] ZHU ML, MU HY, JIA MM, DENG LF, DAI XF. Control of ribosome synthesis in bacteria: the important role of rRNA chain elongation rate[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(5): 795-802.
- [12] HOFFART E, GRENZ S, LANGE JL, NITSCHER R, MÜLLER F, SCHWENTNER A, FEITH A, LENFERS-LÜCKER M, TAKORS R, BLOMBACH B. High substrate uptake rates empower *Vibrio natriegens* as production host for industrial biotechnology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22): e01614-17.
- [13] UTRILLA J, O'BRIEN EJ, CHEN K, McCLOSKEY D, CHEUNG J, WANG H, ARMENTA-MEDINA D, FEIST AM, PALSSON BO. Global rebalancing of cellular resources by pleiotropic point mutations illustrates a multi-scale mechanism of adaptive evolution[J]. *Cell Systems*, 2016, 2(4): 260-271.
- [14] STELLA RG, BAUMANN P, LORKE S, MÜNSTERMANN F, WIRTZ A, WIECHERT J, MARIENHAGEN J, FRUNZKE J. Biosensor-based isolation of amino acid-producing *Vibrio natriegens* strains[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2021, 13: e00187.
- [15] WANG Z, TSCHIRHART T, SCHULTZHAUS Z, KELLY EE, CHEN A, OH E, NAG O, GLASER ER, KIM E, LLOYD PF, CHARLES PT, LI WY, LEARY D, COMPTON J, PHILLIPS DA, DHINOJWALA A, PAYNE GF, VORA GJ. Melanin produced by the fast-growing marine bacterium *Vibrio natriegens* through heterologous biosynthesis: characterization and application[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(5): e02749-19.
- [16] CHIEN CC, CHEN CC, CHOI MH, KUNG SS, WEI YH. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132(3): 259-263.
- [17] ZHANG Y, LI ZH, LIU Y, CEN XC, LIU DH, CHEN Z. Systems metabolic engineering of *Vibrio natriegens* for the production of 1,3-propanediol[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 52-65.
- [18] KORMANOVÁ L, RYBECKÁ S, LEVARSKI Z, STRUHÁRŇANSKÁ E, LEVARSKÁ L, BLAŠKO J, TURŇA J, STUHLÍK S. Comparison of simple expression procedures in novel expression host *Vibrio natriegens* and established *Escherichia coli* system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 321: 57-67.
- [19] XU JQ, DONG F, WU MX, TAO RS, YANG JJ, WU MB, JIANG Y, YANG S, YANG LR. *Vibrio natriegens* as a pET-compatible expression host complementary to *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 627181.
- [20] 崔阳, 董涛. 需钠弧菌外膜囊泡的蛋白质组分析与异源蛋白的递送(英文)[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4564-4580.
- CUI Y, DONG T. Proteome analysis and heterologous cargo delivery of *Vibrio natriegens* outer membrane vesicles[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4564-4580 (in Chinese).
- [21] 黄学娟, 张金迪, 张壮, 李裕静, 曹雪松, 胡全安. 一种优化的大肠杆菌感受态细胞制备及转化方法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(12): 5199-5204.
- HUANG XJ, ZHANG JD, ZHANG Z, LI YJ, CAO XS, HU QA. An optimized method for preparation and transformation of *Escherichia coli* competent cells[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(12): 5199-5204 (in Chinese).
- [22] 徐雪姣, 查向东, 车媛媛, 马利娟, 吴思群, 杨培龙, 黄火清, 姚斌. 美洲拟蝶抗菌肽 Pleurocidin 在大肠杆菌中的高效分泌表达及优化[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 365-374.
- XU XJ, ZHA XD, CHE YY, MA LJ, WU SQ, YANG PL, HUANG HQ, YAO B. Expression of pleurocidin from winter flounder in *Escherichia coli* and optimization of culture conditions[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(3): 365-374 (in Chinese).
- [23] NIK-PA NIM, SOBRI MFM, ABD-AZIZ S, IBRAHIM MF, KAMAL BAHIRIN E, MOHAMMED ALITHEEN NB, RAMLI N. Combined optimization of codon usage and glycine supplementation enhances the extracellular production of a β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. NR5 UPM in *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 3919.
- [24] LU JW, Zhang JG. Extracellular expression of *Aerococcus viridans* pyruvate oxidase in recombinant *Escherichia coli* through SecB co-expression[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(45): 26291-26301.

- [25] 吴凤礼, 梁艳霞, 张媛媛, 霍亚楠, 王钦宏. 新型生长快速需钠弧菌基因组无痕编辑体系构建[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2387-2397.
WU FL, LIANG YX, ZHANG YY, HUO YN, WANG QH. Construction of seamless genome editing system for fast-growing *Vibrio natriegens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11): 2387-2397 (in Chinese).
- [26] 王静, 彭源, 许平, 陶飞. 下一代底盘微生物 *Vibrio* sp. FA2 的抗生素抗性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 861-874.
WANG J, PENG Y, XU P, TAO F. Antibiotic resistance of next-generation microbial workhorses: a case of *Vibrio* sp. FA2[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 861-874 (in Chinese).
- [27] 李家冬, 王弘. 重组蛋白正确折叠与修饰的提高策略[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 591-600.
LI JD, WANG H. Strategies to improve the folding and modification of recombinant proteins: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(4): 591-600 (in Chinese).
- [28] ZOU C, DUAN XG, WU J. Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 174-179.
- [29] ZHANG K, SU LQ, WU J. Enhancing extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* through *dltB* disruption and signal peptide optimization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(3): 1206-1220.
- [30] 李兵. 普鲁兰酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(6): 24-27.
LI B. Cloning and expression of pullulanase gene in *Pichia* Yeast[J]. Food and Fermentation Science and Technology, 2012, 48(6): 24-27 (in Chinese).
- [31] 王兵波, 沈微, 钱灵紫, 李琛, 罗泉, 樊游, 陈献忠. 一种密码子优化的酸性普鲁兰酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 9-15.
WANG BB, SHEN W, QIAN LZ, LI C, LUO X, FAN Y, CHEN XZ. High expression of a codon-optimized acid-resistant pullulanase-encoding gene in *Pichia pastoris*[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(7): 9-15 (in Chinese).
- [32] WANG XY, NIE Y, XU Y. Industrially produced pullulanases with thermostability: discovery, engineering, and heterologous expression[J]. Bioresource Technology, 2019, 278: 360-371.

(本文责编 陈宏宇)