

## 摘要

蛋白质谷氨酰胺酶 (EC 3.5.1.44, protein glutaminase, PG) 是一种新型的蛋白质脱酰胺酶, 能够特异性地催化底物蛋白或多肽侧链的谷氨酰胺, 脱去酰胺基团产生谷氨酸和氨, 从而改善植物基蛋白的溶解度等功能特性, 在食品工业中具有应用潜力。但是目前 PG 存在酶学性能低、产酶水平与功能研究不足等问题限制其应用推广。因此, 提高 PG 催化性能与异源表达水平具有重要意义。本研究通过半理性设计的 PG 分子改造和基于 D-丙氨酸缺陷型表达系统的构建等策略, 实现 PG 在枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168) 中的安全高效表达。此外, 还评价了 PG 的脱酰胺作用对小麦蛋白 (WG) 的结构性质改善及其在高内相乳液 (HIPE) 构建中的应用, 为植物基蛋白的功能改善提供指导。主要结果如下:

(1) 基于半理性设计的策略对 PG 进行分子改造以提高催化活性。通过软件 Discovery Studio 对 PG 和底物进行分子模拟对接, 选取潜在影响 PG 与底物结合的 9 个关键氨基酸位点构建饱和突变体库以筛选高活性 PG 突变体。得到的 PG 最佳突变体 A291S 在摇瓶水平发酵酶活达到  $5.10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 较初始 PG 提高了 45.71%。酶学性质表征表明, 其比酶活提高了 34.04%,  $K_{\text{cat}}$  值提高了 30.40%, 催化效率 ( $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) 提高了 27.66%。进一步对初始 PG 和突变体 A291S 的分子动力学 (MD) 模拟分析表明, 突变引入更多的氢键作用可能增加了底物进出口袋的通量进而提高酶活。

(2) 构建 D-丙氨酸缺陷型枯草芽孢杆菌表达系统促进 PG 安全、稳定表达。在枯草芽孢杆菌 168 中利用 Cre/lox 重组系统敲除基因组上的丙氨酸消旋酶编码基因 (*dal*), 构建 D-丙氨酸缺陷型表达系统, 从而避免发酵过程添加抗生素。菌株表达稳定性研究表明, D-丙氨酸缺陷型系统展现出较抗生素系统更高的稳定性。利用开发的 D-丙氨酸缺陷型表达系统, 获得突变体 A291S 的发酵酶活为  $5.25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 与改造前的卡那霉素抗性系统酶活相当 ( $5.10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。在 5-L 发酵罐的扩大培养中, 发酵酶活达到  $8.15 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

(3) 评价 PG 对 WG 的结构性质改善及其在 HIPE 构建中的应用。本研究利用 PG 对 WG 进行脱酰胺作用, 随着脱酰胺反应的持续, 脱酰胺度 (DD) 不断增加, 48 h 后达到 70.50%。溶解度随之改善的同时蛋白分子量没有显著变化。选择不同 DD 的 WG 作为稳定剂制备 HIPE。与 WG 相比, 脱酰胺 WG (DWG) 可形成稳定 HIPE。此外, 具有适度 DD (28.70-40.50%) 的 DWG 形成的 HIPE 具有更为致密的网络结构、更高的弹性模量和相对较低的口腔摩擦系数。

**关键词:** 蛋白质谷氨酰胺酶; 半理性设计; D-丙氨酸缺陷型表达系统; 脱酰胺作用

## Abstract

Protein glutaminase (EC 3.5.1.44, PG) is a deamidase that has been widely concerned in recent years. It can specifically remove the amide group of glutamine from the side chain of protein, improving the solubility and functional properties of plant-based proteins. It has potential applications in the food industry. However, PG is limited by its low enzymatic properties, lack of studies on enzyme production level and functional properties. Therefore, it is of great significance to improve the catalytic performance and heterologous expression level of PG. In this study, the safe and efficient expression of PG in *Bacillus subtilis* 168 was achieved through the semi-rational design of PG molecular modification and the construction of D-Alanine defected expression system. In addition, the structure improvement of wheat gluten (WG) by PG deamidation and its application in the construction of high internal phase emulsions were evaluated to provide guidance for the functional improvement of plant-based proteins. The main results are as follows:

(1) Molecular modification of PG based on semi-rational design strategy to improve the catalytic activity. The software Discovery Studio was used to conduct molecular simulation docking between PG and substrate, and 9 key amino acid sites potentially affecting the binding of PG and substrate were selected to construct a saturated mutant library to screen highly active PG mutants. The enzyme activity of the optimal PG mutant A291S reached  $5.10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  at shaking flask level, which increased by 45.71% compared with initial PG. The  $K_{\text{cat}}$  and catalytic efficiency ( $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) were increased by 30.40% and 27.66% respectively. Further molecular dynamics (MD) simulations of the initial PG and the mutant A291S showed that the mutation introduced more hydrogen bonding, which may increase substrate flux to and from the pocket and thus increase enzyme activity.

(2) The D-Alanine deficient *Bacillus subtilis* system was constructed to promote the safe and stable expression of PG. In order to avoid the addition of antibiotics during fermentation, a D-Alanine defective expression system was constructed in *Bacillus subtilis* 168 by using the Cre/lox recombinant system to knock out the alanine racemase coding gene (*dal*). The study on the expression stability of the strain showed that the D-Alanine deficient system exhibited higher stability than the antibiotic system. The enzyme activity of mutant A291S was  $5.25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , which was similar to that of kanamycin resistant system before modification ( $5.10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). In the expanded culture of 5-L fermenter, the activity of fermentation enzyme reached  $8.15 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

(3) The improvement of WG structural properties by PG and its application in the construction of HIPE were evaluated. In this study, PG was used to deaminate WG. The deamidation degree (DD) increased and reached 70.50% after 48 h with the continuous deamidation reaction. The solubility was improved with no significant change in molecular weight. WG with different DD was selected as stabilizer to prepare HIPE. Compared with WG, deamidation WG (DWG) results in stable HIPE. In addition, the HIPE stabilized by DWG with moderate DD (28.70-40.50%) has denser network structure, higher modulus of elasticity and relatively lower coefficient of oral friction.

**Keywords:** protein glutaminase; semi-rational design; D-Alanine deficient expression system; deamidation

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 蛋白质谷氨酰胺酶的研究进展 .....	1
1.1.1 PG 概论.....	1
1.1.2 PG 的分子结构及催化机制 .....	2
1.1.3 PG 的分子改造及异源表达 .....	3
1.2 PG 的应用研究进展 .....	4
1.2.1 PG 对植物基蛋白溶解性的改善 .....	4
1.2.2 PG 对植物基蛋白乳化和发泡性质的改善 .....	5
1.3 枯草芽孢杆菌表达系统研究进展 .....	6
1.3.1 PG 在枯草芽孢杆菌中的异源表达 .....	6
1.3.2 枯草芽孢杆菌中的食品级表达系统.....	6
1.3.3 Cre/lox 定点重组系统.....	7
1.4 立项依据、研究意义以及主要研究内容 .....	8
1.4.1 立项依据与研究意义.....	8
1.4.2 主要研究内容.....	8
第二章 材料与amp;方法 .....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 菌种、质粒的来源与获得.....	9
2.1.2 培养基及溶剂.....	10
2.1.3 实验所用主要试剂.....	11
2.1.4 实验所用主要仪器.....	11
2.2 分子生物学实验方法.....	12
2.2.1 表达载体构建.....	12
2.2.2 枯草芽孢杆菌化学转化方法.....	12
2.2.3 蛋白纯化方法.....	12
2.3 宿主及质粒的构建.....	12
2.3.1 D-丙氨酸缺陷型宿主的构建 .....	12
2.3.2 D-丙氨酸缺陷型系统表达质粒的构建 .....	13
2.3.3 不同位点饱和突变质粒的构建.....	14
2.4 产 PG 菌株的发酵 .....	14
2.4.1 摇瓶水平 .....	14
2.4.2 5-L 发酵罐水平 .....	14
2.5 蛋白分析方法.....	15
2.5.1 PG 酶活测定方法.....	15

2.5.2 酶学性质测定.....	15
2.5.3 分子动力学模拟.....	15
2.6 PG 应用研究实验方法 .....	15
2.6.1 脱酰胺小麦蛋白(WG)的制备 .....	15
2.6.2 脱酰胺度(DD)的测定 .....	15
2.6.3 Zeta 电位测定.....	16
2.6.4 溶解度测定.....	16
2.6.5 分子量分布测定.....	16
2.6.6 界面张力测定.....	16
2.6.7 高内相乳液的制备.....	16
2.6.8 高内相乳液微观结构观察.....	16
2.6.9 高内相乳液粒度测定.....	17
2.6.10 高内相乳液流变学行为的测定.....	17
2.6.11 高内相乳液摩擦学性质的测定.....	17
2.6.12 数据分析.....	17
第三章 结果与讨论 .....	18
3.1 基于半理性设计的 PG 分子改造 .....	18
3.1.1 PG 催化底物结合位点的预测 .....	18
3.1.2 饱和突变体文库的构建与基于酶活的筛选 .....	18
3.1.3 酶学性质表征.....	19
3.1.4 分子动力学模拟分析.....	21
3.2 D-丙氨酸缺陷型枯草芽孢杆菌表达系统的构建 .....	24
3.2.1 D-丙氨酸缺陷型枯草芽孢杆菌宿主的构建 .....	25
3.2.2 带有营养缺陷标记的互补表达质粒的构建 .....	27
3.2.3 系统表达稳定性验证.....	28
3.2.4 PG 在 D-丙氨酸缺陷型系统中的表达 .....	29
3.2.5 5-L 发酵罐发酵验证.....	30
3.3 PG 对 WG 的结构性质改善及其在高内相乳液构建中的应用 ..	31
3.3.1 DWG 的 DD 与溶解度 .....	31
3.3.2 DWG 的结构性质及界面性质表征 .....	32
3.3.3 DWG 制备 HIPE 的外观与粒度表征 .....	33
3.3.4 HIPE 的微观结构.....	34
3.3.5 HIPE 的流变学性质 .....	35
3.3.6 HIPE 的摩擦学性质 .....	36
主要结论与展望 .....	38
主要结论.....	38
展望.....	39
参考文献.....	40

# 第一章 绪论

## 1.1 蛋白质谷氨酰胺酶的研究进展

### 1.1.1 PG 概论

蛋白质谷氨酰胺酶（EC 3.5.1.44, protein glutaminase, PG）是一种新型的用于食品蛋白质改性的脱酰胺酶。它能够催化底物蛋白质或多肽中的谷氨酰胺残基脱酰胺为谷氨酸，同时释放氨，目前已通过国家食品安全标准<sup>[1]</sup>。PG 最先是来自土壤细菌解脲金杆菌（*Chryseobacterium proteolyticum*）9670<sup>T</sup> 中筛选得到的<sup>[2]</sup>。PG 的脱酰胺作用将底物蛋白侧链的酰胺基转化为羧基，蛋白质分子之间的静电排斥作用增强使得蛋白质解聚，从而改善溶解性和其他功能性质，如乳化性和发泡性等<sup>[3]</sup> (图 1-1)。传统的酶促脱酰胺作用如肽谷氨酰胺酶（EC 3.5.1.2）虽然也能使蛋白质解聚，但其作用底物仅限于短肽<sup>[4]</sup>，不适用于肽和蛋白质；而化学脱酰胺过程中会发生蛋白质水解<sup>[5]</sup>，造成蛋白质功能性质的丧失。PG 作用于单一底物，仅催化底物蛋白或多肽侧链的谷氨酰胺脱酰胺，不与游离谷氨酰胺或天冬酰胺残基反应<sup>[6]</sup>，特异性好且不会引起蛋白质的水解<sup>[7]</sup>，避免蛋白质功能性质的损失。因此，PG 是催化食品蛋白质脱酰胺的理想酶，对于改善蛋白质外观、质地和风味有较大的潜力。

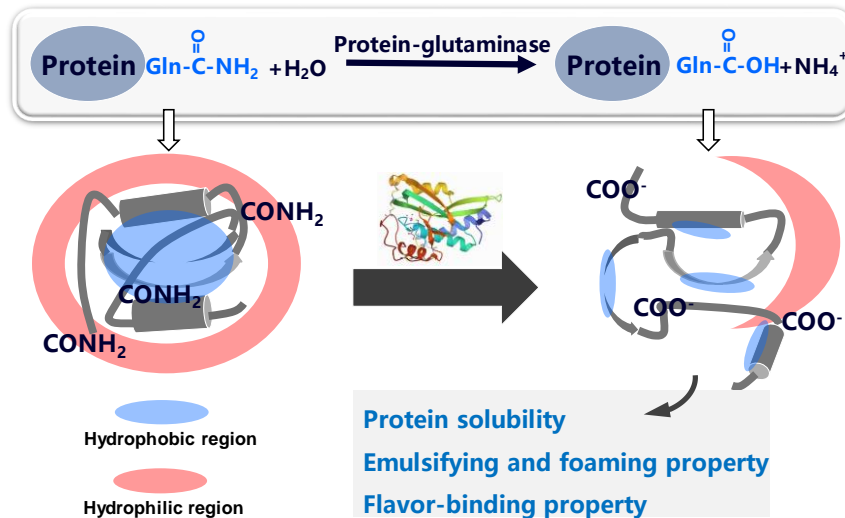


图 1-1 PG 的脱酰胺作用机制<sup>[8]</sup>

Figure 1-1 Deamidation mechanism of PG

植物基蛋白的功能性质如乳化、起泡和凝胶性质等与其溶解性密切相关，也受氨基酸组成和序列的影响。对于一些谷类蛋白质，由于其富含谷氨酰胺，与非极性氨基酸残基产生疏水或氢键相互作用而诱导蛋白质分子聚集，影响蛋白的分散和溶解。这极大地限制了它们的食品应用。PG 在对其进行脱酰胺的过程中对蛋白质进行去折叠，使其展开蛋白高级结构，疏水基团的暴露增强其溶解性。

乳化和发泡特性是蛋白质的关键功能特性，主要影响基于乳液和泡沫结构的食品结构的特性，例如牛奶、搅打奶油和啤酒泡沫。脱酰胺作用可以改变食品蛋白质的亲水-疏水平衡，进而影响其乳化和起泡性能。因此，由 PG 脱酰胺引起的可溶性蛋白质

浓度的增加有利于在油-水界面或空气-水界面形成稳定的界面层。此外，在将谷氨酰胺残基转化为谷氨酸后，蛋白质多肽的负电荷可以形成界面电子排斥力，从而减缓液滴的运动以提供更好的稳定性<sup>[9]</sup>。

### 1.1.2 PG 的分子结构及催化机制

PG 以单体形式存在，等电点为 10.0，分子量为 19.9 kDa，具有半胱氨酸残基含量高的特点。酶原（pro-PG）由前肽（114 个氨基酸）和成熟肽（185 个氨基酸）共同组成<sup>[10-12]</sup>。PG 是以酶原形式进行表达的，但酶原形式的 PG 没有活性，只有当 pro-PG 被细胞外蛋白酶切割后，才能在 *C. proteolyticum* 中转化为有活性的成熟酶形式<sup>[10]</sup>。成熟酶形式 PG 的 N 末端氨基酸前 20 位中第 17 位氨基酸由 Q 编码，并且在纯化 PG 进行氨基酸测序的过程中发现 Q 和 E 出现的机率几乎是相同的，该现象说明 PG 会发生部分自脱酰胺作用<sup>[13]</sup>。

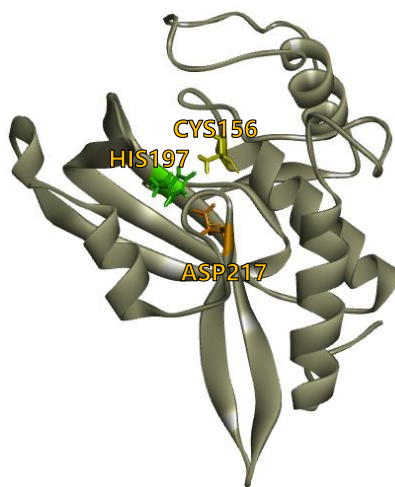


图 1-2 PG 的催化三联体

Figure 1-2 Catalytic triad of PG

Hashizume 等研究了 PG 的晶体结构，得到成熟酶形式的 PG 空间结构（PDB 的登录号为 3A56）<sup>[11]</sup>，发现 PG 具有单一且紧凑的结构域，包括 2 个弯曲的  $\beta$  折叠和四个  $\alpha$  螺旋。PG 的催化口袋由催化三联体 Cys-156、His-197 和 Asp-217 构成<sup>[10]</sup> 图（1-2）。比较 PG 与 TG 的催化活性中心，发现两者活性中心的 Cys-His-Asp 结构一致<sup>[14]</sup>。TG 由 331 个氨基酸组成，分子量为 37.9 kDa。TG 也具有单一紧凑的结构，活性中心半胱氨酸残基位于深裂缝和带负电荷的口袋中，其中，深裂缝左右两侧的前庭分别呈现带负电荷的表面和疏水的表面，分别是酰基供体和酰基受体的结合位点<sup>[15]</sup>。因此，PG 和 TG 在结构基础上的差异与其催化机理有一定的关联性<sup>[11, 14]</sup>。在与蛋白的反应中，TG 不仅具有 PG 的蛋白质脱酰胺作用，还能诱导蛋白质发生交联反应。从而研究 PG 的催化机制，Yamaguchi 等发现 PG 的成熟区有 11 个半胱氨酸残基，通过表面电位图发现第 177 位的半胱氨酸残基周围形成一个带负电荷的“口袋”，猜测是 PG 的底物结合口袋。口袋的深度正好适合谷氨酰胺侧链的长度而不适合天冬酰胺侧链的长度。因此，一旦谷氨酰胺残基中的酰胺基团被水解，所得的羧酸基团就会从带负电荷的口袋中排出，从而加速产物的周转，加快催化反应的速率<sup>[13, 16]</sup>。通过使用几种短肽作为底物探

究 PG 的特异性,发现 PG 更偏好谷氨酰胺残基 N 末端的疏水残基<sup>[17]</sup>。这种偏好可能是由于该表面与底物之间的疏水相互作用。

### 1.1.3 PG 的分子改造及异源表达

酶的效率和精度是大多数传统工业催化剂无法比拟的。然而,天然存在的酶通常缺乏商业应用所必需的特征,因此对其进行适当的改造和修饰就显得尤为重要。酶的分子改造策略包括理性设计、半理性设计及非理性设计<sup>[18, 19]</sup>。一方面,酶的非理性设计需要高通量的筛选方法且具有一定的盲目性,酶学性质改善的突变体的获得不具有经济性。另一方面,酶的理性设计必须清楚蛋白质的高级结构、相关功能区以及催化机制等,从而对其氨基酸序列进行精准的设计。由于对 PG 的蛋白质的高级结构以及结构和功能之间的关系缺乏深入的认识,采用半理性设计的策略对其进行分子改造的报道较为常见。通常采用计算机辅助预测酶与底物结合的关键氨基酸残基,通过替换蛋白质序列中特定位点的氨基酸构建突变体文库,从而筛选获得性质改善的酶,这是一种经济且高效的分子改造策略。

最近报道了对 PG 进行基于等温压缩扰动的分子改造<sup>[20]</sup>。Nan 等通过模拟高压环境来提高酶的性能。其中突变体 N16M/Q21H/T113E 的比酶活性和半衰期显著提高,与野生型相比,比活性提高了 4.28 倍 ( $117.18 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ),半衰期提高了 1.23 倍 (472 min),是迄今为止报道过的综合性能最高的酶突变体之一。随后使用突变体 N16M/Q21H/T113E 和野生型对大豆分离蛋白分别进行脱酰胺作用后,与野生型 PG 脱酰胺相比,溶解度提高了 55.74%,且具有更小的粒径和更好的乳化性和发泡性。

由于野生型宿主解脲金黄杆菌表达的 PG 产量低,开发用于大规模生产 PG 的异源表达系统是至关重要的。据报道,PG 在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌及毕赤酵母系统中已经进行了表达研究及相关优化(表 1-1)。此外,现代基因工程技术已被用于改善 PG 的异源表达,例如蛋白质分泌途径的信号肽优化。

大肠杆菌作为最常用的蛋白质表达系统,具有生长周期短、成本低和操作简单的优点,有利于蛋白质的生产。Lu 等开发了一种用于大规模生产活性 PG 的大肠杆菌表达系统<sup>[21]</sup>。他们使用连续双质粒系统生产重组 pro-PG 以简化表达和酶原激活步骤。该系统最终产生  $29 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  的 PG 纯酶活性。为了进一步研究 PG 的激活机制,通过评估对 PG 活性的影响,优化前肽和成熟肽之间的不同切割位点和插入序列<sup>[22]</sup>。大肠杆菌作为活性 PG 的表达宿主,存在威胁人类健康的外毒素,因此并非食品酶生产的优选宿主。毕赤酵母和谷氨酸棒杆菌表达系统由于其蛋白质生产的安全性而备受关注。Guo 等实现了 pro-PG 在毕赤酵母 GS115 中的表达,pro-PG 在摇瓶水平经 1% 甲醇诱导 120 h 以及胰蛋白酶加工活化后,PG 发酵活性达到  $0.878 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[23]</sup>。Niu 等研究了来源于地衣芽孢杆菌的双精氨酸信号肽 GlnU 在地衣芽孢杆菌 CBB302 中介导 PG 分泌的作用,其在 25-L 发酵罐中达到的最高 PG 活性为  $6.8 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[24]</sup>。Kikuchi 等通过双精氨酸移位酶 (Tat) 途径在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中成功表达了 pro-PG,随后被外源蛋白酶 SAM-P45 激活,产量为  $183 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过对信号肽 GlnU 的定点突变使得 PG 活性从  $0.16 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  提高到  $0.23 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[25]</sup>。Kikuchi 等还优化了信号肽 TorA,通过



TatABC 表达系统在谷氨酸棒杆菌中表达 pro-PG，最终 pro-PG 的产量为 1237 mg·L<sup>-1</sup>，比酶活性为 26 U·mg<sup>-1</sup>[26]。然而，用于激活 PG 的蛋白酶 SAM-P45 具有非特异性且成本高的特点，限制了 PG 的大规模工业化生产。在现有的研究中，PG 尽管已经在不同的宿主及系统中进行实现表达，但仍然无法实现 PG 酶活的显著提高，这制约了 PG 的大规模生产和应用。同时，目前得到的结论也为 PG 后续的活性改造提供了研究思路和方法。

表 1-1 PG 的异源表达研究

Table 1-1 Study on heterologous expression of PG

表达宿主	信号肽	表达形式	酶活	参考文献
大肠杆菌	NR	pro-PG	29 U·mg <sup>-1</sup>	[21]
毕赤酵母 GS115	NR	pro-PG	0.878 U·mL <sup>-1</sup>	[23]
谷氨酸棒杆菌 ATCC13869	GlmU	pro-PG	0.23 U·mL <sup>-1</sup>	[25]
谷氨酸棒杆菌 ATCC13869	TorA	pro-PG	26 U·mg <sup>-1</sup>	[26]
地衣芽孢杆菌 CBBD302	GlmU-K	pro-PG	6.8 U·mL <sup>-1</sup>	[24]

注：NR 表示没有报道

## 1.2 PG的应用研究进展

PG 作为一种符合食品安全标准的脱酰胺酶制剂新品种，在植物蛋白研究领域具有广泛的应用。植物基蛋白（如肉类、奶制品和鸡蛋替代品）在生产过程中更环保，比传统牲畜使用的地球资源更少<sup>[27]</sup>。并且，基于植物蛋白的饮食由于比基于动物蛋白的饮食更有益于人类健康，受到大众的青睐。然而，大多数植物蛋白质地差，溶解度低，异味重，有一部分原因是谷氨酰胺的含量较高。并且与动物蛋白相比，它们更难加工，更易受温度、pH 值和离子强度等外部因素的影响，功能性较差<sup>[28]</sup>。尽管酸催化和碱催化脱酰胺是一种高效且经济的食品蛋白质修饰方法，但其引起的蛋白质水解和副反应限制了在植物蛋白上的应用<sup>[29]</sup>。PG 具有特异性强的优势，只作用于蛋白质侧链的谷氨酰胺，不会导致蛋白水解，能保持植物蛋白的优良功能特性，如乳化性和发泡性等。因此，PG 已成为食品蛋白质在加工过程中质构、口感和营养价值改良的有力工具。

### 1.2.1 PG 对植物基蛋白溶解性的改善

溶解性是植物蛋白在食品中发挥功能的先决条件，也是影响蛋白质乳化和发泡特性以及在食品工业中广泛应用的关键因素<sup>[30]</sup>。然而，对于某些食品蛋白质来说，大量的非极性氨基酸残基和谷氨酰胺残基通过疏水或氢键作用诱导蛋白质分子聚集，导致溶解性降低，这极大地限制了富含谷氨酰胺的食品蛋白质的应用。PG 对蛋白的脱酰胺

作用产生的羧基可以改变蛋白质的电荷，降低等电点，增加蛋白质疏水基团的暴露以改善溶解性。

到目前为止，研究人员已经利用 PG 对多种植物蛋白进行了脱酰胺作用以评价 PG 对溶解度的改善。PG 对植物蛋白（大豆和椰子蛋白）进行脱酰胺的溶解度随脱酰胺时间的增加而提高<sup>[22, 31]</sup>。对于未脱酰胺和脱酰胺蛋白质的溶解性显示出对环境条件如 pH 和温度的不同敏感性。与 WG 相比，DWG 在中性条件下即使经历脱酰胺时间很短，其溶解度也显著提高，但在酸性条件下（pH 3）脱酰胺样品的溶解度表现出下降趋势<sup>[32]</sup>。Yong 等研究了 PG 处理对高度不溶  $\alpha$ -玉米醇溶蛋白溶解性的影响，脱酰胺后的  $\alpha$ -玉米醇溶蛋白在 pH 5 和 pH 7 条件下的溶解度显著增加达到 80%，而在 pH 3 条件下几乎没有变化<sup>[9]</sup>。此外，低 DD 值（15% 和 42%）的燕麦蛋白在 50°C 时的溶解度远高于在 21°C 时的溶解度。然而，对于高 DD 值（59%）燕麦蛋白，50°C 高温不会增加其溶解度<sup>[33]</sup>。因此，PG 的脱酰胺作用可能不需要通过增加温度来提高植物蛋白的溶解性。综上所述，在这些食品蛋白质中均观察到 PG 脱酰胺对溶解度的积极影响。

### 1.2.2 PG 对植物基蛋白乳化和发泡性质的改善

乳化性和发泡性是蛋白质的关键功能特性，对于具有乳液和泡沫结构的食品如牛奶、奶油和啤酒泡沫等至关重要。脱酰胺可以改变食品蛋白质的亲水-疏水平衡，并进一步影响其乳化和发泡性能。因此，PG 脱酰胺导致的溶解度提高改善了蛋白的两亲性质，有助于在油-水界面或空气-水界面形成稳定的界面层。此外，PG 在将谷氨酰胺残基转化为谷氨酸后，蛋白质负电荷的增加可以形成界面电子排斥力，从而减缓液滴的运动，并且提供更好的稳定性<sup>[34]</sup>。

对于富含谷氨酰胺的蛋白质稳定的乳液，乳化能力与脱酰胺度（DD）密切相关。Jiang 等研究发现 DD 值较高的燕麦蛋白稳定的乳液相较于未脱酰胺的燕麦蛋白，形成的界面蛋白网络结构更均匀和稳定。将 PG 脱酰胺后的燕麦蛋白（DD 为 15%）作为乳化剂制备的乳液在储存一天后就出现了稀化现象，而具有较高 DD（DD 为 59%）的乳液在储存长达 30 天后状态仍然是稳定的<sup>[35]</sup>。此外，经 PG 处理的小麦蛋白、 $\alpha$ -玉米醇溶蛋白和乳蛋白在中性条件下的乳化性能均得到显著改善<sup>[32]</sup>。

空气-水界面的高自由能使泡沫不稳定，但蛋白质在界面层的吸附抵消了自由能，增加泡沫稳定性。蛋白质向空气-水界面的扩散受到其溶解度的影响。Suppavorasatit 等研究了 PG 脱酰胺对大豆分离蛋白发泡性能的影响，结果表明在脱酰胺后其具有更好的发泡能力，但发泡稳定性下降<sup>[22]</sup>。Kunarayakul 等发现脱酰胺时间更长的高 DD 值椰子蛋白显示出较高的乳化活性指数和较低的乳化稳定性指数<sup>[31]</sup>。发泡能力和乳化能力的提高是由于脱酰胺导致可溶性蛋白质的增加，但过高的 DD 值可能会导致蛋白质电荷的过度增加，静电排斥作用增强，蛋白质和蛋白质之间的相互作用减弱，造成稳定性下降。

适当的脱酰胺作用可以增强植物蛋白的溶解性和两亲性，有助于蛋白质吸附在界面上，从而提高乳液和泡沫的稳定性。PG 对植物基蛋白的适当修饰使其具有成为良好乳化稳定剂的潜力<sup>[36]</sup>。因此，为了使乳化能力或发泡能力与稳定性之间形成最佳平

衡，有必要研究利用PG对植物基蛋白进行脱酰胺的最佳条件。

### 1.3 枯草芽孢杆菌表达系统研究进展

#### 1.3.1 PG 在枯草芽孢杆菌中的异源表达

枯草芽孢杆菌在酶制剂的生产和食品发酵中具有悠久的历史，因此它是通常被认为是安全的食品级微生物（GRAS）<sup>[37]</sup>，并且枯草芽孢杆菌表达系统因其能够分泌可溶性和活性靶蛋白，成为一种有前途的表达系统。目前在枯草芽孢杆菌中已经开发了几种基因表达系统用于生产高水平的异源蛋白，如淀粉酶<sup>[38, 39]</sup>、溶菌酶<sup>[40]</sup>、蛋白酶<sup>[41]</sup>和脂肪酶<sup>[42]</sup>。因此 PG 在枯草芽孢杆菌中的表达有利于其后续在食品工业上的应用。

Wang 等提出将成熟 PG 在大肠杆菌中表达，发现表达产物主要是包涵体，之后将其在枯草芽孢杆菌 DB403 中活化表达获得具有活性的 PG<sup>[43]</sup>。Wang 等用 GlmU、YbxG 和 YhdH 三种信号肽构建了用于 Tat 分泌途径的重组表达载体，携带 GlmU 的 PG 在枯草芽孢杆菌 WB600 中表达的最高活性为  $0.12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[44]</sup>。Niu 等研究了来源于地衣芽孢杆菌的双精氨酸信号肽 GlmU 对 PG 在枯草芽孢杆菌 WB600 中分泌的影响以及信号肽 GlmU 在地衣芽孢杆菌 CBBD302 中介导 PG 分泌的作用，其在 25-L 发酵罐中达到的最高 PG 活性为  $6.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[24]</sup>。在本课题组前期研究中，Yin 等利用组合工程策略开发了基于枯草芽孢杆菌的高效 PG 活化系统，通过对启动子、信号肽和培养基的优化，PG 活性达到  $7.07 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[45]</sup>。PG 在枯草芽孢杆菌中的异源表达情况见表 1-2。

表 1-2 PG 在枯草芽孢杆菌中的异源表达

Table 1-2 Heterologous expression of PG in *Bacillus subtilis*

表达宿主	信号肽	表达形式	酶活	参考文献
枯草芽孢杆菌 DB403	NprB	mPG	NR	[43]
枯草芽孢杆菌 WB600	GlmU	pro-PG	$0.12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$	[44]
枯草芽孢杆菌 168	SamyQ	pro-PG	$0.76 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$	[46]
枯草芽孢杆菌 WB600	YdeJ	pro-PG	$7.07 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$	[45]

注：NR 表示没有报道

尽管PG已经在枯草芽孢杆菌中被成功表达和优化，但是很少有报道涉及重组枯草芽孢杆菌直接应用于食品加工，其中一个重要原因是该系统中使用的大多数载体需要抗生素，因此实现PG的食品级表达至关重要。

#### 1.3.2 枯草芽孢杆菌中的食品级表达系统

在食品工业中应用的生物工程微生物及其产物的安全性尤为重要。无论是生物工程微生物作为有活性的益生菌被食用，还是纯化产物被用作食品成分，它们都应该是安全的、稳定的和具有良好性能的<sup>[47]</sup>。食品由于其食用特性，在安全方面希望达到更高的要求，例如在食品中不能含有或产生毒素、热源、抗生素以及抗生素抗性蛋白等

[48]。食品级系统意味着生产菌株应该来源于食品安全微生物，并且不应该使用抗生素抗性标记<sup>[49, 50]</sup>。因此特殊的表达系统改造和分子生物技术是至关重要的，使改造系统能够表达满足食品工业要求的产物<sup>[51, 52]</sup>。

D-丙氨酸缺陷型系统在枯草芽孢杆菌中的应用能够安全有效的表达异源蛋白。丙氨酸消旋酶基因 (*dal*) 参与 D-丙氨酸和 L-丙氨酸的转化<sup>[53]</sup>，转化得到的 D-丙氨酸为细胞提供自然界中无法获得的生长必需营养。并且 D-丙氨酸不是大规模发酵培养基的常见成分<sup>[54]</sup>，因此 *dal* 作为枯草芽孢杆菌的食品级选择标记具有一定的潜力，通过质粒上的 *dal* 基因的表达互补宿主缺陷进行筛选，同时表达目的蛋白。例如，Chen 等以 *dal* 作为选择标记，用于在枯草芽孢杆菌中生产 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(RDPE)。基于 D-丙氨酸缺失的筛选严格，并且质粒在培养过程中保持稳定。该食品级系统中 RDPE 的表达水平与在常规的基于卡那霉素的系统中获得的水平相当<sup>[55]</sup>。另外，这种新的表达系统在生产食品级异源蛋白方面具有广泛的适用性。

基于毒素-抗毒素 (TA) 系统的异源蛋白表达在枯草芽孢杆菌中也被证明是有效的。在枯草芽孢杆菌中，EndoA-EndoB 是一种毒素-抗毒素 (Toxin-antitoxin, TA) 系统，其中 EndoA 是一种 mRNA 干扰物，能够对序列 UACAU 的第一和第二位之间进行特异性切割。当毒素 EndoA 能够与抗毒素 EndoB 形成六聚体复合体时毒性丧失。Sen 等为了避免抗生素的使用以及保证重组蛋白更加稳定的表达，通过在枯草芽孢杆菌中人工调控内源 EndoA-EndoB 系统的表达，构建了基于 TA 的食品级表达系统<sup>[56]</sup>。传统的抗生素依赖性表达系统相比，该表达系统的质粒稳定性好，并且用于表征的绿色荧光蛋白表现出更高的表达量以及代谢产物透明质酸表现出更高的产量<sup>[56]</sup>。此外，所使用的 DNA 片段都来源于安全菌株枯草芽孢杆菌，这使得该表达系统能够安全用于食品领域。

### 1.3.3 Cre/lox 定点重组系统

如图 1-3 所示，Cre 重组酶可以识别 *loxP* 位点并进行特异性重组，从而对 *loxP* 位点间的 DNA 片段产生切除、倒位、DNA 链间的交换或染色体易位作用<sup>[57]</sup>。Cre 重组酶的特异性重组效率能高达 70%，并且不需要借助其他的辅助因子。另外，其作用底物包含不同结构的 DNA。Cre/*lox* 定点重组系统已广泛用于特定基因的敲除、外源基因的整合、基因功能的鉴定、基因的捕获以及染色体工程等方面。并且，该定点重组系统作为 DNA 重组的有力工具，在低级单细胞酵母到高级哺乳动物中均实现了高效重组。

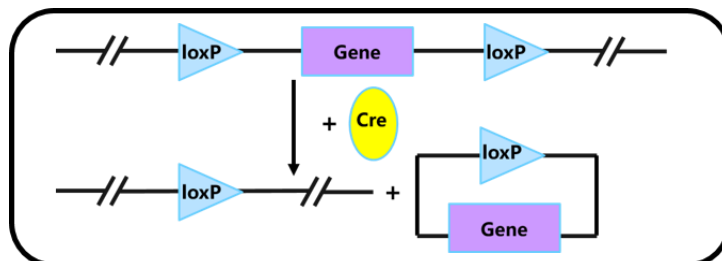


图 1-3 Cre/*lox* 定点重组原理

Figure 1-3 Cre/*lox* fixed-point recombination principle

重组枯草芽孢杆菌表达系统中的一部分载体带有抗生素抗性标记单元。因此利用 Cre/lox 定点重组系统可将抗生素抗性单元消除以实现 PG 的无抗生素安全表达。

## 1.4 立项依据、研究意义以及主要研究内容

### 1.4.1 立项依据与研究意义

植物蛋白在被 PG 催化脱酰胺的过程中，蛋白质侧链的谷氨酰胺基团被特异性地转变为羧基，增加蛋白的静电排斥作用和解聚作用，从而改善植物蛋白的溶解性和乳化性等，并且 PG 对蛋白的特异性修饰不会导致蛋白水解，从而避免蛋白功能性质的丧失，拓展植物蛋白在食品工业中的应用。因此，PG 在食品工业中具有广阔的应用前景，是脱酰胺的优良酶制剂。

目前，PG 存在重组菌株活性表达低、稳定性差以及缺乏适用于食品的表达系统等问题。在以往研究中，主要关注产 PG 野生菌株的筛选、PG 的重组表达以及对表达元件的优化，缺少针对提高 PG 活性的分子改造策略以及食品级表达应用的系统性研究，限制了 PG 的高效、安全表达。因此，对 PG 进行分子改造，建立安全表达系统，使 PG 在工业发酵中不添加抗生素，有利于其在食品系统中的应用。

### 1.4.2 主要研究内容

本研究采用半理性设计策略对 PG 与底物 Cbz-Gln-Gly 进行基于计算机辅助的分子模拟对接，通过对突变体文库的筛选提高 PG 的催化活性。同时，在枯草芽孢杆菌 168 中构建 D-丙氨酸缺陷型表达系统，在不添加抗生素的情况下实现 PG 的安全稳定表达。最后，以小麦蛋白为模式蛋白，评价 PG 的脱酰胺作用对蛋白结构性质的改善及其在高内相乳液构建中的应用。主要研究内容如下：

1. 采用半理性设计的策略挖掘潜在影响 PG 与底物结合的关键氨基酸位点，进行简并密码子 NNK 的设计以构建饱和突变体文库。然后，将得到的突变体全部转化入枯草芽孢杆菌 168 中进行表达，通过测定 PG 活性来筛选出高活性 PG 突变体。比较分析初始 PG 和筛选得到的最佳突变体的酶学性质和分子动力学模拟结果。

2. 为了使 PG 更加安全的应用于食品工业中，构建生产 PG 的 D-丙氨酸缺陷型表达系统，使之在发酵中不需抗生素。另外，还对该系统的稳定性与卡那霉素抗性系统进行了比较研究。最后，通过 5-L 发酵罐的扩大培养验证 PG 的安全高效表达。

3. 为研究 PG 的脱酰胺作用对 WG 的结构性性质改善与乳液构建潜力，利用 PG 对 WG 进行脱酰胺作用，表征不同 DWG 的电位、溶解度、分子量变化，并分析不同 DWG 制备的 HIPE 的微观结构、流变学行为及摩擦学性质，解析 DD 与乳液的结构功能之间的关系。

## 第二章 材料与amp;方法

## 2.1 实验材料

## 2.1.1 菌种、质粒的来源与amp;获得

将大肠杆菌 *E. coli* JM109 作为所有质粒的克隆，将枯草芽孢杆菌 168 和枯草芽孢杆菌-dal 作为 PG 表达的宿主，质粒 pP43NMK-P<sub>SecA</sub>-pPG-YdeJ 作为构建表达质粒的模板，用于分子改造和菌株发酵，质粒 T-CMR(lox)作为 D-丙氨酸缺陷型宿主构建中使用的敲除质粒的模板。以上菌株与质粒均为实验室统一保藏。由生工生物工程（上海）股份有限公司制备提供 PCR 扩增及菌落 PCR 的引物及测序验证结果。菌种与质粒的具体名称和来源详见表 2-1。

表 2-1 本研究所使用的质粒与amp;菌株  
Table 2-1 Plasmids and strains used in this study

质粒/菌株	基因	来源
质粒		
T-CMR(lox)	CmR, lox66, lox71	实验室保藏
pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His	实验室保藏
PDG148-Cre	Cre	实验室保藏
T-CMR(lox)-168-dalUD	CmR, lox66, lox71, dalU, dalD	本文构建
pP43NMK-dal-bla	dal, bla	本文构建
pP43NMK-dal-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ	dal, P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His	本文构建
153-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, V153NNK	本文构建
154-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, D154NNK	本文构建
157-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, Y157NNK	本文构建
193-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, A193NNK	本文构建
195-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, S195NNK	本文构建
196-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, Y196NNK	本文构建
290-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, P290NNK	本文构建
291-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, A291NNK	本文构建
292-NNK	P <sub>SecA</sub> , YdeJ, pro-PG, 6His, P292NNK	本文构建
菌株		
<i>B. subtilis</i> -PG	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ	本文构建
<i>B. subtilis</i> -CMR(lox)	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 T-CMR(lox)-168-dalUD	本文构建
<i>B. subtilis</i> -dal-cre	缺失 <i>dal</i> 基因的枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 PDG148-Cre	本文构建
<i>B. subtilis</i> -dal	缺失 <i>dal</i> 基因的枯草芽孢杆菌 168	本文构建

表 2-1 本研究所使用的质粒与菌株（续表）

Table 2-1 Plasmids and strains used in this study (continued)

质粒/菌株	基因	来源
<i>B. subtilis</i> -dal-bla	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-dal-bla	本文构建
<i>B. subtilis</i> -dal-PG	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-dal-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ	本文构建
V153NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/V153NNK	本文构建
D154NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/D154NNK	本文构建
Y157NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/Y157NNK	本文构建
A193NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/A193NNK	本文构建
S195NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/S195NNK	本文构建
Y196NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/Y196NNK	本文构建
P290NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/P290NNK	本文构建
A291NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/A291NNK	本文构建
P292NNK	枯草芽孢杆菌 168 携带质粒 pP43NMK-P <sub>SecA</sub> -pPG-YdeJ/P292NNK	本文构建

### 2.1.2 培养基及溶剂

LB 种子培养基：5 g·L<sup>-1</sup> 酵母粉，10 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨，10 g·L<sup>-1</sup> NaCl，若配置固体 LB 培养基则加入 15 g·L<sup>-1</sup> 琼脂，大肠杆菌克隆质粒时氨苄青霉素添加的终浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup>，培养重组枯草芽孢杆菌时卡那霉素添加的终浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup>，D-丙氨酸缺陷型表达系统不添加卡那霉素。

TB 发酵培养基：10 g·L<sup>-1</sup> 甘油，16.43 g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O，2.32 g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，24 g·L<sup>-1</sup> 酵母粉，12 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨。D-丙氨酸缺陷型表达系统不添加卡那霉素，卡那霉素抗性表达系统添加终浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup> 的卡那霉素。

PBS 缓冲液的配置：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 母液通过称取 71.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 溶于 900 mL 蒸馏水中定容至 1 L 得到。NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 母液通过称取 31.2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 溶于 900 mL 蒸馏水中定容至 1 L 得到。pH 7.0 的 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液通过将 62 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 母液混合 38 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 母液，再加入 900 mL 蒸馏水得到。pH 6.5 的 0.176 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液通过将 31.5 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 母液混合 68.5 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 母液，再加入 900 mL 蒸馏水得到。

三氯乙酸溶液（0.4 mol·L<sup>-1</sup>）：6.536 g 三氯乙酸，加蒸馏水定容至 100 mL。

显色试剂 A: 7.5 mg 亚硝基铁氰化钠, 2.023 g 苯酚, 加蒸馏水定容至 50 mL, 避光。

显色试剂 B: 2.5 g KOH, 加蒸馏水定容至 50 mL。

显色试剂 C: 417  $\mu\text{L}$  NaClO 溶液, 10.2 g 无水  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 加蒸馏水定容至 50 mL, 于 4°C 冷藏, 现配现用。

底物 Cbz-Gln-Gly 溶液: 0.176  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液 (pH 6.5) 中加入 0.337 g Cbz-Gln-Gly 粉末, 加蒸馏水定容至 100 mL。

平衡液: 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 0.02  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS。

洗脱液: 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑, 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 0.02  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS。

### 2.1.3 实验所用主要试剂

2  $\times$  Phanta Max Master Mix 高保真 PCR 扩增酶购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 超级感受态细胞制备试剂、柱式 DNA 质粒提取试剂盒以及用于载体连接的无缝连接酶购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Taq PCR 扩增酶购于杭州宝赛生物科技有限公司; 氨检测试剂盒和荧光染料尼罗蓝 A 购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 小麦蛋白 (74.7wt%) 购自美国 Bob's Red Mill Natural Food; 其他所用化学试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司, 均为分析级。

### 2.1.4 实验所用主要仪器

本研究所用仪器详见表 2-2。

表 2-2 本研究所用仪器

Table 2-2 Instruments used in this study

实验仪器	来源
PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
Zeta 电位测定仪	英国 Malvern 公司
凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司
冷冻真空干燥器	宁波新芝生物科技股份有限公司
紫外可见分光光度计	德国 Eppendorf 公司
分子排阻高效液相色谱分析仪	美国 Waters 公司
酶标仪	南京拜尔沃克智能科技有限公司
集热式磁力搅拌器	郑州艾特仪器设备有限公司
快速核酸提取仪	北京安诺伦生物科技有限公司
视频光学接触角测量仪 OCA15EC	北京奥德利诺仪器有限公司
微量核酸检测仪	赛默飞世尔科技
IKA 高速分散仪	德国 Staufen 公司
台式高速离心机	德国 Eppendorf 公司
TCS SP8 共聚焦激光扫描显微镜	德国徕卡显微系统公司
发酵罐 (5-L)	上海迪必尔生物工程有限公司



表 2-2 本研究所用仪器(续表)

Table 2-2 Instruments used in this study (continued)

实验仪器	来源
发酵罐 (5-L)	上海迪必尔生物工程有限公司
激光衍射粒度仪 MAZ3000	英国 Malvern 公司
核酸凝胶电泳仪	北京六一仪器厂
旋转流变仪 MCR302	奥地利 Anton Paar 公司
M2T2 摩擦仪	英国 PCS 仪器公司

## 2.2 分子生物学实验方法

### 2.2.1 表达载体构建

PCR 重组片段使用购自生工生物工程（上海）股份有限公司的即用型无缝克隆酶以及购自南京诺唯赞（Vazyme）生物科技有限公司的一步克隆酶进行载体连接和质粒构建，采用菌落 PCR 和生工生物工程（上海）股份有限公司提供的基因测序结果进行序列验证。

### 2.2.2 枯草芽孢杆菌化学转化方法

挑取枯草芽孢杆菌单菌落置于 37°C、220 rpm 条件下在 LB 培养基中进行过夜活化培养，按照 10% 的接种量转接至 LB 培养液中直至 OD<sub>600</sub> 达到 1.0 左右时加入 2-3% 的木糖诱导 2-3 h 得到感受态细胞。在 500 μL 的感受态细胞中加入浓度为 500 ng·μL<sup>-1</sup> 的质粒摇菌 2-3 h。将菌液在低速下离心以弃去上清，将剩余沉淀菌液重悬并涂布到含有不同筛选标记的平板上，于培养箱中生长直至观察到明显清晰的菌落后拿出进行验证。

### 2.2.3 蛋白纯化方法

将发酵液离心后所得的上清液过膜（0.22 μm）；将沉降柱柱中 20% 的乙醇储存液从上封口倒出，打开下封口同时在上封口加入双蒸水使其流出以润洗；依次加入平衡缓冲液 15 mL、发酵上清 50 mL、平衡缓冲液 15 mL、5% 洗脱缓冲液 10 mL、10% 洗脱缓冲液 10 mL 并收集流出液体；再依次加入洗脱缓冲液 15 mL、平衡缓冲液 15 mL、双蒸水以及 20% 乙醇以洗涤。最后将 20% 乙醇留存在沉降柱中。

## 2.3 宿主及质粒的构建

### 2.3.1 D-丙氨酸缺陷型宿主的构建

枯草芽孢杆菌 168 中丙氨酸消旋酶基因 *dal*（GenBank no. CAB12271.1）的缺失是使用如前所述的 Cre/lox 重组酶系统进行的<sup>[57]</sup>。首先利用引物对 T-f/T-r 和 CMR(lox)-f/CMR(lox)-r 从质粒载体 T-CMR(lox) 中分别扩增出载体骨架和 lox71-CMR-lox66 片段，再分别用引物对 dalU-f/dalU-r 和 dalD-f/dalD-r 扩增出 *dal* 基因侧边的两个同源区 dalU 和 dalD (各约 1000 bp)。将四个 DNA 片段纯化后，连接反应通过一步克隆酶在 37°C 条件下进行 30 min 完成，转化步骤通过将获得的连接产物加入大肠杆菌感受态中来完成。转

化后涂板验证步骤通过挑取添加了氨苄青霉素、氯霉素以及D-丙氨酸的琼脂板上的单菌落进行菌落PCR，再将阳性菌落进行DNA测序，得到正确的测序质粒。将测序正确的质粒转化入*B. subtilis* 168，通过先前的策略<sup>[57]</sup>进行同源重组双交换、突变体(*B. subtilis* 168-CMR)的筛选、带有lox位点的氯霉素筛选标记的切除以及*dal*缺失的无抗生素突变体(*B. subtilis* 168-dal)的筛选。最后，通过PCR扩增技术进一步证实了*B. subtilis* 168-dal基因组中的同源重组双交换和抗生素筛选标记的切除，得到了成功地删除整个*dal*基因的无抗生素食品级表达系统。本步骤所用引物列出如表2-1所示。

表 2-1 本步骤引物列表

Table 2-1 List of primers in this step

引物	基因序列
T-f	AAAGCCAAATCAGCGTCGTCGAACGGCAGGCG
T-r	ACGCTCGGTACACGTTATCTCTGGAAGATCCGCGCG
CMR(lox)-f	TGGACATATGACGGCTTCGAGCTCGGTACCCGGG
CMR(lox)-r	TACGACTCTTTTATCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG
dalU-f	GATCTTCCAGAGATAACGTGTACCGAGCGTACCG
dalU-r	GGTACCGAGCTCGAAGCCGTCATATGTCCATGATAATGATGC
dalD-f	AGGCATGGCAAGCTTGGATAAAAGAGTATCCGTAAGTTTGGTGG
dalD-r	CCTGCCGTTTCGACGACGCTGATTTGGCTTTCAGCAG

### 2.3.2 D-丙氨酸缺陷型系统表达质粒的构建

以先前实验室保藏的质粒 Pp43NMK-P<sub>secA</sub>-pPG-YdeJ 为模板，将 *B. subtilis* 168 基因组上的丙氨酸消旋酶基因 *dal* 添加到模板质粒中来构建 D-丙氨酸缺陷型系统的表达质粒。根据 *dal* 的核苷酸序列，设计引物对 dal-PG-F/dal-PG-R，以 *B. subtilis* 168 为模板扩增 *dal* 片段。以质粒 Pp43NMK-P<sub>secA</sub>-pPG-YdeJ 为模板，使用引物对 P43-PG-F/P43-PG-R，扩增线性载体骨架 Pp43NMK-P<sub>secA</sub>-pPG-YdeJ。将这两个片段纯化后，在 50℃ 条件下使用无缝克隆连接酶进行 1 h 的连接反应。最终将获得的连接产物转化入大肠杆菌 JM109，得到重组质粒 Pp43NMK-dal-P<sub>secA</sub>-pPG-YdeJ。本步骤所用引物列出如表 2-2 所示。

表 2-2 本步骤引物列表

Table 2-2 List of primers in this step

引物	基因序列
dal-PG-F	TGAAGATTAGATGCTGTAGATTACCTTCTCTCTTCTAAAGATCTTTCTAAAGAGG
dal-PG-R	ATTAGAGGTCATCGTCATCCAGTGATAATGATACCATTAATCACTCTTCAAG
P43-PG-F	CATTATCACTGGATGACGATGACCTCTAATAATTGTTAATCATGTTGGT
P43-PG-R	GAGAAGGTAATCTACAGCATCTAATCTTCAACAAACTGGCCC
dal-bla-F	TGAGCAACTGGATCCTGATGAAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA
dal-bla-R	GCCAAGCTTTCATCAGGATCCAGTTGCTCAAAAAAATCTCGG

### 2.3.3 不同位点饱和突变质粒的构建

通过模拟软件 Discovery Studio 分子对接预测得到 PG 与底物的潜在结合位点，以先前实验室保藏的质粒 Pp43NMK-P<sub>secA</sub>-pPG-YdeJ 为模板，分别在相应位点设计引物对进行 PCR 重组，构建基于简并密码子 NNK 设计的饱和突变体库。本步骤所用引物列出如表 2-3 所示。

表 2-3 本步骤引物列表  
Table 2-3 List of primers in this step

引物名称	序列
153-F	GTGCATTACATTTAGATATCCGNNKGATGGCTGCTAT
153-R	CGGATATCTAAATGTAATGCACGGGCTTGATG
154-F	TACATTTAGATATCCGGTTNNKGGCTGCTATG
154-R	AACCGGATATCTAAATGTAATGCACGGG
157-F	CATTTAGATATCCGGTTGATGGCTGCNNKGCGAGAGCA
157-R	GCAGCCATCAACCGGATATCTAAATGTAATGCACGGG
193-F	CACAGGCACATGCTGCGTCNNKTGGAGCTATCATGTGGCAATTCTGGTTT
193-R	GACGCAGCATGTGCCTGTGCTTGCTTTCA
195-F	ACATGCTGCGTCGCATGGNNKTATCATGTG
195-R	CCATGCGACGCAGCATGTGCCTGTGC
196-F	AGGCACATGCTGCGTCGCATGGAGCNNKCATG
196-R	GCTCCATGCGACGCAGCATGTGCCTGTG
290-F	TGAGCGGCTGTAGCNNKAGCCCGGCACCGGATG
290-R	TGTTTTAAATCGGAAGACTCGCCGACATCGGGCTCG
291-F	AGCGGCTGTAGCCCGAGCCCGNNKCCGGATGTTTCATCATGCGGCTTTCATC
291-R	CGGGCTCGGGCTACAGCCGCTCAGAA
292-F	GCTGTAGCCCGAGCCCGGCANNKGATGTTTCATCATGCGGCTTTCATCATCAT
292-R	TGCCGGGCTCGGGCTACAGCCGCTCAGAA

## 2.4 产PG菌株的发酵

### 2.4.1 摇瓶水平

挑取单菌落接种到 3 mL 的 LB 培养液中，在 37°C 的培养温度和 220 rpm 的转速下活化培养 8~10 h（作为发酵对照的普通卡那霉素抗性系统添加 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素）。转接 1 mL 到装液量为 25 mL TB 培养基的 250 mL 摇瓶中，在 37°C 和 220 rpm 条件下发酵 40 h。

### 2.4.2 5-L 发酵罐水平

(1) 挑取枯草芽孢杆菌单菌落接种到装液量为 25 mL LB 培养液的 250 mL 摇瓶中（作为发酵对照的普通卡那霉素抗性系统添加 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素），在 37°C 的培养温度和 220 rpm 的转速下活化培养 8~10 h 后得到种子液，将种子液转接至 5-L 发酵罐。

(2) 使用实验室优化条件：5-L 发酵罐装液量 2.5 L、种子液接种量 4%，通氧量 5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 、溶氧控制为 20%、转速设置为溶氧关联 300-900 rpm，同时在发酵 4-16 h 期间以 20  $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速恒速流加葡萄糖（100 g/300 mL），发酵培养基为 TB。

(3) 发酵 48 h 停止发酵，每 4 h 取样测定 PG 活性和 OD<sub>600</sub>。

## 2.5 蛋白分析方法

### 2.5.1 PG 酶活测定方法

PG 能够特异性地催化底物蛋白或多肽侧链的谷氨酰胺，脱去酰胺基团产生谷氨酸和氨。将次氯酸钠作为氧化剂，生成的产物氨可在硝普钠的作用下与苯酚反应生成蓝绿色的染料靛酚蓝。在波长 630 nm 下靛酚蓝具有吸光特性，因此通过测定反应溶液的 OD<sub>630</sub> 值即可得到 PG 的相对活力。按照 Kang 等的方法进行氨标准曲线的绘制与 PG 酶活力的测定及计算<sup>[18]</sup>。

### 2.5.2 酶学性质测定

最适温度在 6 个不同温度 (30°C-80°C) 条件下测定 PG 的活性变化，反应时间为 30 min；最适 pH 通过配置 9 个不同 pH (3-11) 的底物溶液与 PG 反应进行，反应 30 min 后测定 PG 活性；将 WT-PG 和分子改造得到的突变体 PG 稀释到相同的蛋白浓度，配制不同浓度的底物 Cbz-Gln-Gly 溶液 (0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 2 mmol·L<sup>-1</sup>, 4 mmol·L<sup>-1</sup>, 8 mmol·L<sup>-1</sup>)，分别测定与不同浓度的底物反应 30 min 后 WT-PG 和突变体 PG 的活性，再利用双倒数曲线和非线性拟合得出 WT-PG 和突变体 PG 的米氏常数 ( $K_m$ )、最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 以及转化数 ( $K_{cat}$ )。

### 2.5.3 分子动力学模拟

在前期实验室构建的 PDB 结构文件基础上，通过 Discovery Studio 软件在 300K 的恒温条件下模拟野生酶和突变体与底物作用的均方根偏差 (RMSD)、均方根波动 (RMSF) 以及周围残基与底物的相互作用力。利用 Discovery Studio 分析相互作用力和绘制相关二维及三维结构图。

## 2.6 PG 应用研究实验方法

### 2.6.1 脱酰胺小麦蛋白 (WG) 的制备

将 0.1 U·mL<sup>-1</sup> PG 与 10 mg·mL<sup>-1</sup> WG 加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> PBS 缓冲液 (pH 7) 中，在 40 °C 水浴锅中磁力搅拌以进行脱酰胺反应，添加 NaN<sub>3</sub> 以防止细菌生长。在不同时间段 (0-48 h) 进行取样。

### 2.6.2 脱酰胺度 (DD) 的测定

使用氨检测试剂盒 (Sigma-Aldrich) 测定样品中谷氨酰胺和天冬酰胺残基释放的氨的量。DD 值定义为脱酰胺反应中释放的氨量与 WG 中谷氨酰胺和天冬酰胺残基总量的比值。将 WG 于 2 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液中以 110 °C 反应 2 h 测定 WG 中谷氨酰胺和天冬酰胺残基释放的总氨量<sup>[9]</sup>。将剩余的各悬浊液样品用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸透析，冷冻干燥备用。

### 2.6.3 Zeta 电位测定

将样品用蒸馏水稀释至浓度为  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，使用 Zeta 电位分析仪测定 Zeta 电位。

### 2.6.4 溶解度测定

将冻干样品  $10 \text{ mg}$  分散在  $10 \text{ mL}$   $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液 (pH 7) 中。将悬浊液进行磁力搅拌 12 h 后涡旋，在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下以  $3000 \times g$  的转速离心 10 min 以收集可溶性部分，并使用 Bradford 方法测定其可溶蛋白含量<sup>[58]</sup>。样品溶解度为可溶蛋白含量占总蛋白含量的百分比。

### 2.6.5 分子量分布测定

根据文献报道描述的方法，将  $10 \text{ mg}$  冻干样品加入到  $1 \text{ mL}$  含有 1.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液 (pH 7) 中，在  $50^\circ\text{C}$  下反应 12 h。将所得悬浊液在  $20^\circ\text{C}$  下以  $10000 \times g$  的转速离心 10 min。然后将上清液与洗脱缓冲液 (0.1% SDS、20% 乙腈和  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠; pH 7) 以 1:1 的比例混合并进行过膜 ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ) 处理<sup>[59]</sup>。最后，使用分子排阻高效液相色谱 (SE-HPLC) 分析冻干样品的分子量分布。

### 2.6.6 界面张力测定

根据文献报道，使用悬滴法监测 WG 和 DWG 的动态界面特性<sup>[60]</sup>。将  $10 \text{ mg}$  冻干样品分散在  $10 \text{ mL}$   $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液 (pH 7) 中。用注射器吸取混合溶液，在纯化油中将  $10 \text{ }\mu\text{L}$  液滴挤出到针口并保持不滴落，使液滴在油相中保持悬空。使用光学接触角仪监测  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  下界面压力和膨胀系数随吸附时间的变化来确定动态界面张力。

### 2.6.7 高内相乳液的制备

通过磁力搅拌将冻干样品分散在  $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液 (pH 7) 中。将葵花籽油缓慢加入到悬浊液中以获得油相为 75% (w/v) 的油水混合物。混合物中的冻干样品粉末占 1% (w/v)。使用 IKA T25 高速分散器在  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  下以  $20000 \times g$  的转速将各混合物均质 2 min 后获得脱酰胺度不同的乳液样品。

### 2.6.8 高内相乳液微观结构观察

将尼罗蓝 A 以 0.1% 的浓度加入无水乙醇中搅拌溶解以制备用于蛋白染色的尼罗蓝 A 荧光染料溶液，将  $30 \text{ }\mu\text{L}$  染料溶液加入  $1 \text{ mL}$  乳液样品中轻轻搅拌进行染色，然后在凹形载玻片上滴加染色乳液，用盖玻片轻轻覆盖以保证样品的固定。将激光共聚焦显微镜的激发波长设置为  $633 \text{ nm}$ ，观察乳液样品的结构并采集图片。

### 2.6.9 高内相乳液粒度测定

使用 MasterSizer 3000 激光衍射粒度仪测定乳液样品的粒度分布和体积平均直径 ( $d_{4,3}$ )。将乳液样品滴加在装满去离子水的样品槽中，水相和葵花籽油的折射率分别设置为 1.33 和 1.52。

### 2.6.10 高内相乳液流变学行为的测定

使用旋转流变仪测定各乳液样品的流变学性质。选用直径为 50 mm 的样品板，间隙高度设置为 1 mm。将各乳液样品轻轻地放置在样品台上，进行应力扫描 (0.1-1000%，频率为 1 Hz) 以确定线性粘弹区域 (LVR)。频率扫描 (0.1-10 Hz，应变为 0.1%) 用于测量粘弹性参数。还分别对各乳液样品进行三段式触变恢复试验以研究乳液的触变性行为。

### 2.6.11 高内相乳液摩擦学性质的测定

使用 MTM2 摩擦仪对乳液样品进行摩擦性质测定。将软硅胶球以规定的正常载荷加载到软硅胶弹性盘的平坦表面上，将乳液放置在球与板之间以降低两者的摩擦力。Stribeck 曲线是通过测试在 1-1000 mm·s<sup>-1</sup> 的速度范围内的摩擦系数来获得的<sup>[61]</sup>。

### 2.6.12 数据分析

所有乳液样品的测定均重复进行三次，各乳液样品均为新鲜制备，通过 Origin 2018 软件进行数据的方差分析和显著性分析 ( $P < 0.05$ )。

## 第三章 结果与讨论

### 3.1 基于半理性设计的PG分子改造

由于目前对 PG 的结构和催化机制研究不够深入且缺乏高通量的筛选方法，因此基于半理性设计的分子改造更适用于 PG。相比于传统的设计方法，利用计算机辅助的分子模拟更加经济、高效和精确。根据模拟结果替换蛋白质序列中特定位点的氨基酸以构建突变体文库，筛选高酶活 PG 突变体。另外，分子动力学（MD）模拟可以对突变体与底物的结合情况进行系统性分析，这可以为后续 PG 的理性设计提供理论指导。

#### 3.1.1 PG 催化底物结合位点的预测

利用计算机模拟软件 Discovery Studio 对 PG 与底物结合的关键氨基酸位点进行预测。首先在软件的小分子模块对底物 Cbz-Gln-Gly 的结构进行绘制，并对其结构进行优化。另外，选择来源于解阮金黄杆菌的 PG 成熟酶的蛋白晶体结构（PDB 登录号：3A56）与配体进行分子对接。已有研究表明，PG 的催化口袋由催化三联体 Cys-156、His-197 和 Asp-217 构成<sup>[10]</sup>。通过其催化三联体确定本研究中 PG 的底物口袋进行分子模拟对接，并对结果进行 RMSD 聚类分析。依据 PG 的催化脱酰胺机制，选择的 PG 与底物结合构象如图 3-1（a）所示。随后选择与底物距离 5Å 范围内的氨基酸残基位点 V153、D154、Y157、A193、S195、Y196、P290、A291 和 P292 作为研究对象，进行基于简并密码子 NNK 构建突变体文库，如图 3-1（b）。

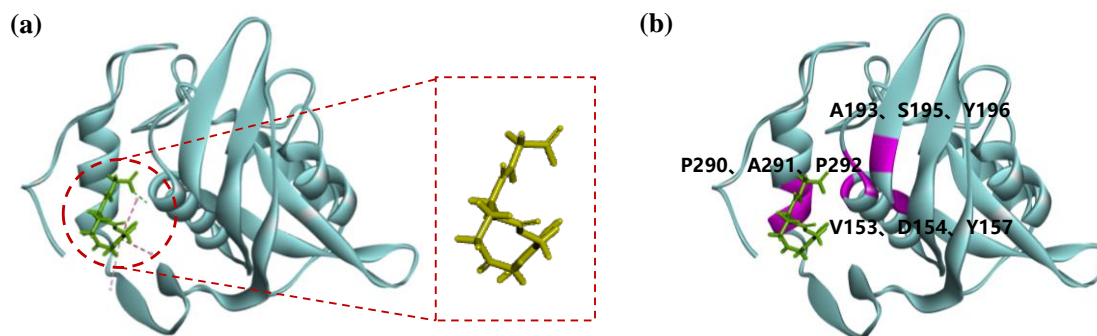


图 3-1 对接结果以及选择突变的氨基酸位点

Figure 3-1 Docking results and selecting amino acid sites for mutations

(a) PG 与底物的对接结果；(b) 通过软件模拟选择的氨基酸位点

#### 3.1.2 饱和突变体文库的构建与基于酶活的筛选

以质粒 Pp43NMK-PsecA-pPG-YdeJ 为模板，构建 V153、D154、Y157、A193、S195、Y196、P290、A291 和 P292 位点的基于简并密码子 NNK 设计的饱和突变文库，并将该文库转化到 *B. subtilis* 168 中进行基于摇瓶水平的发酵验证。结果显示了每个突变体的发酵酶活，在 171 个饱和突变体中，只有 22 个突变体保留了野生型（WT）50% 以上的 PG 活性，其余突变体都保留了小部分的活性甚至完全丧失了活性

(图 3-2)。其中, 在进行分子改造的突变体中, 仅突变体 A291S 的发酵酶活高于初始 PG, 为  $5.10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提高了 45.71%, 如图 3-2 (h)。

虽然目前关于 PG 分子改造的报道不多, 但在最近报道的基于等温压缩扰动的 PG 分子改造中<sup>[20]</sup>, 突变体 N16M/Q21H/T113E 的比活性较野生型显著提高了 4.28 倍 ( $117.18 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), 其酶活性远远高于本文所得到的最佳突变体, 原因可能在于本文采用的基于软件模拟的半理性设计方法过于传统, 未找到影响酶活性的关键氨基酸位点。因此挖掘关键的氨基酸位点的策略显得尤为重要, 可能成为进一步提高 PG 高效表达的突破点。

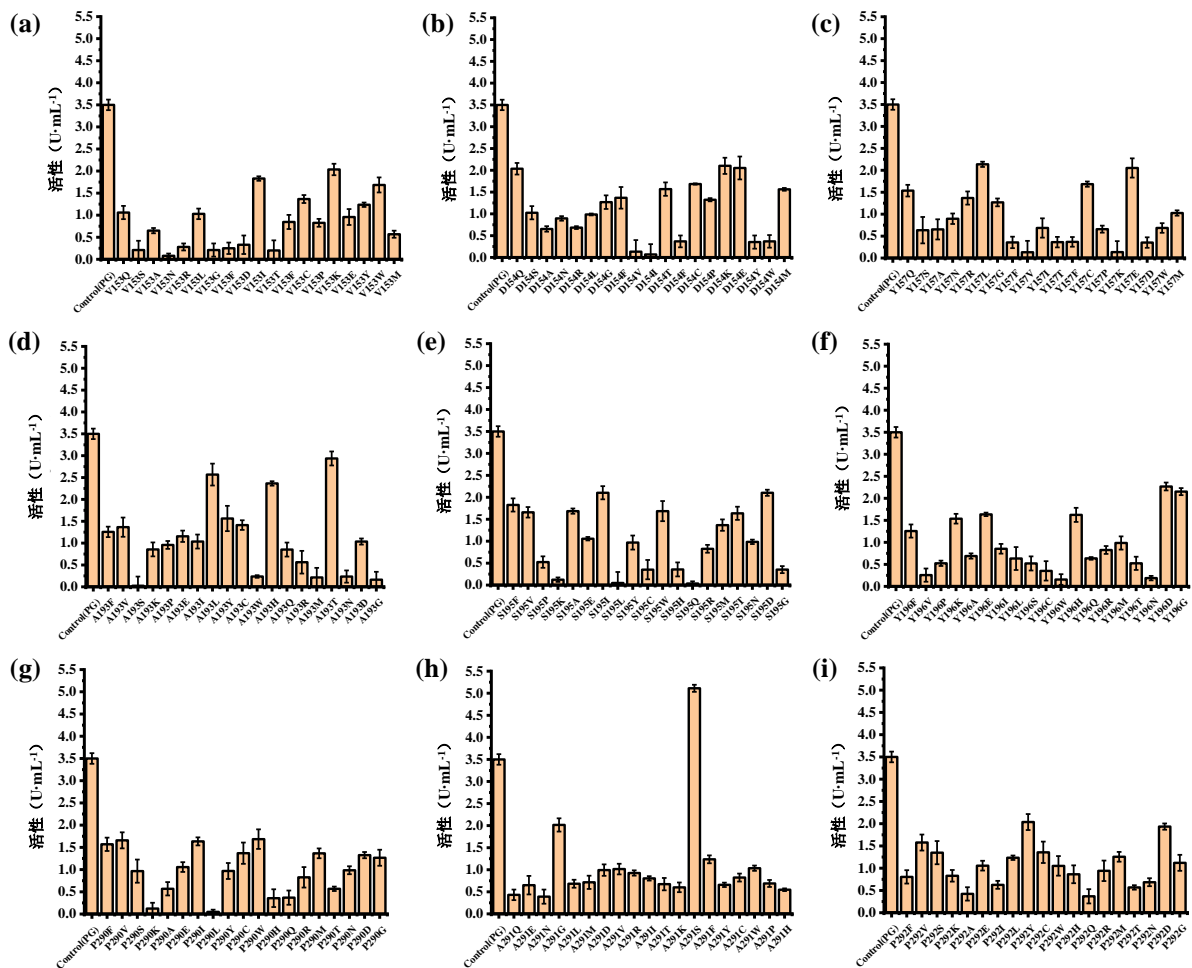


图 3-2 PG 突变体酶活

Figure 3-2 Activity of PG mutants (site 153, 154, 157, 193, 195, 196, 290, 291 and 292)

(a) 153 位点; (b) 154 位点; (c) 157 位点; (d) 193 位点; (e) 195 位点; (f) 196 位点; (g) 290 位点; (h) 291 位点; (i) 292 位点

### 3.1.3 酶学性质表征

将上述通过分子改造得到的发酵酶活最高的突变体 A291S 和初始 PG 重新在枯草芽孢杆菌 168 中进行发酵表达, 将分别得到的新鲜发酵液按照第二章材料与方 法 2.2.3 进行 PG 发酵液的纯化。将洗脱得到的蛋白溶液在超滤管进行浓缩后, 使用 SDS-PAGE 法分析初始 WT-PG 与 PG 突变体 A291S 的蛋白条带大小。如图 3-3 所示, 纯化后的初始 WT-PG 与 PG 突变体 A291S 纯酶液均在 20 kDa 左右和 31 kDa 左右出现明显的蛋白



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/17804502003006042>