

· 工业生物技术 ·

## 篮状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 来源的高温葡萄糖淀粉酶性质与结构

郭玉杰, 涂涛, 邱锦, 彤丽格, 罗会颖, 姚斌

中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

郭玉杰, 涂涛, 邱锦, 等. 篮状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 来源的高温葡萄糖淀粉酶性质与结构. 生物工程学报, 2019, 35(4): 616–625.  
Guo YJ, Tu T, Qiu J, et al. Characterization and structure of a novel thermostable glucoamylase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802. Chin J Biotech, 2019, 35(4): 616–625.

**摘 要:** 葡萄糖淀粉酶作为淀粉糖化的关键用酶之一, 广泛应用于食品、医药和发酵工业等行业。由于整个制糖过程都是在高温下完成的, 因此对葡萄糖淀粉酶的反应温度和热稳定性有较高要求。本研究从嗜热篮状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 中克隆到一个糖苷水解酶第 15 家族 (GH15) 葡萄糖淀粉酶基因 (*Tlga15A*) 并在毕赤酵母 GS115 中实现异源表达。重组葡萄糖淀粉酶 *Tlga* 的最适 pH 为 4.5, 在 75 °C 下表现出最高酶活。*Tlga* 热稳定性好, 65 °C 条件下处理 1 h 剩余 70% 以上酶活力; 70 °C 处理 30 min 后仍有 43% 酶活力。*Tlga* 有较强的离子抗性和宽泛的底物特异性, *Tlga* 水解可溶性淀粉、支链淀粉、糖原、糊精和普鲁兰的比活力分别为 (255.6±15.3) U/mg、(342.3±24.7) U/mg、(185.4±12.5) U/mg、(423.3±29.3) U/mg 和 (65.7±8.1) U/mg。从葡萄糖淀粉酶 *Tlga* 的一级结构、二级结构和三级结构 3 个层面对其进行比较分析, 发现一级结构中较少的 Gly 组成和三级结构中较低的非极性基团溶剂可及表面积可能是维持葡萄糖淀粉酶 *Tlga* 温度稳定性的主要原因。综合其性质特点和对结构的分析, 葡萄糖淀粉酶 *Tlga* 在工业葡萄糖生产中有较大应用潜力。

**关键词:** 篮状菌, 高温葡萄糖淀粉酶, 克隆表达, 性质特点, 结构分析

## Characterization and structure of a novel thermostable glucoamylase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802

Yujie Guo, Tao Tu, Jin Qiu, Lige Tong, Huiying Luo, and Bin Yao

Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Glucoamylase is a critical ingredient for saccharification in the starch decomposition, and widely used in food, pharmaceutical and fermentation industries. Glucoamylases are usually thermostable and have peak activities at high

**Received:** August 15, 2018; **Accepted:** November 7, 2018

**Supported by:** The Collaborative Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (No. CAAS-463 XTCX2016011-04-5).

**Corresponding author:** Bin Yao. Tel: +86-10-82106065; E-mail: binyao@caas.cn

中国农业科学院协同创新项目 (No. CAAS-463 XTCX2016011-04-5) 资助。

网络出版时间: 2018-11-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181122.1104.002.html>

temperature, as required for the industrial process of glucose production. In this study, a glucoamylase gene belonging to the glycoside hydrolase (GH) family 15, *Tlga15A*, was cloned from *Talaromyces leycettanus* JCM12802, and successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. Recombinant glucoamylase *TlGA* showed optimal activities at pH 4.5 and 75 °C. The result of thermostability analysis showed that *TlGA* retained above 70% activity after incubating for 1 h at 65 °C, and 43% residual activity after 30 min at 70 °C. Moreover, *TlGA* had high resistance to most metal ions and chemical reagents tested. Various starch substrates could be hydrolyzed by *TlGA*, including soluble starch ( $255.6 \pm 15.3$ ) U/mg, amylopectin ( $342.3 \pm 24.7$ ) U/mg, glycogen ( $185.4 \pm 12.5$ ) U/mg, dextrin ( $423.3 \pm 29.3$ ) U/mg and pullulan ( $65.7 \pm 8.1$ ) U/mg. The primary, secondary and tertiary structures of glucoamylase were further analyzed. The low ratio of Gly in the primary structure and low exposed nonpolarity solvent accessible surface in the tertiary structure may be the main reasons for *TlGA*'s thermostability. These results show that *TlGA* is great promising for potential use in the commercial production of glucose syrups. Moreover, this research will provide knowledge and innovating ideas for the improvement of glucoamylase thermostability.

**Keywords:** *Talaromyces leycettanus*, thermostable glucoamylase, cloning and expression, characterization, structural analysis

葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3) 又称糖化酶, 它能够从淀粉糖链的非还原末端切下葡萄糖分子, 是一种典型的外切酶<sup>[1]</sup>。葡萄糖淀粉酶在食品、医药和发酵工业等行业都有广泛应用<sup>[2-4]</sup>, 尤其是对于葡萄糖的生产。葡萄糖的工业生产主要分为淀粉液化和糖化两步。首先是高温  $\alpha$ -淀粉酶在 95–105 °C、pH 5.5–6.5 的条件下将淀粉分解成寡糖和麦芽糖, 降低黏度; 然后冷却降温到 60–65 °C、调整 pH 至 4.0–4.5 后, 添加葡萄糖淀粉酶分解寡糖和麦芽糖, 最终生成葡萄糖<sup>[5]</sup>。工业生产中所用的  $\alpha$ -淀粉酶有极好的温度稳定性, 在 95–105 °C 条件下能够快速完成淀粉的液化。但是葡萄糖淀粉酶的最适反应温度相对较低, 在进行糖化反应之前需要进行降温处理。提高糖化过程的反应温度不仅可以减少降温过程的处理时间, 还能够增加底物溶解度, 降低底物黏度, 有效降低染菌风险和加快反应速率<sup>[4]</sup>。但是, 一直以来糖化酶的最适反应温度和热稳定性距离期望值还有一定的差距<sup>[6-7]</sup>, 因此高温葡萄糖淀粉酶的研究一直都备受关注。

目前, 工业普遍应用的葡萄糖淀粉酶主要来源于黑曲霉、泡盛曲霉和米根霉等丝状真菌。这些葡萄糖淀粉酶在碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-active enzymes, CAZy) 数据库中属于 GH15 家族。在三维结构上, 它们通常含有一个催化域

(Catalytic domain, CD) 和一个淀粉结合域 (Starch-binding domain, SBD); 两个结构域之间通过富含 *O*-糖基化的 Linker 连接, 也有一些葡萄糖淀粉酶只存在催化域<sup>[8]</sup>。糖化酶的催化区域是一个通过  $(\alpha/\alpha)_6$  形成的漏斗状活性中心, 主要负责底物的水解<sup>[9]</sup>; 淀粉结合域可以有效地结合淀粉颗粒协同催化域水解不溶性底物, 它通常位于葡萄糖淀粉酶的 C 端, 但是来源于稻根霉菌 *Rhizopus oryzae* 葡萄糖淀粉酶的 SBD 位于其催化结构域的 N 端<sup>[10]</sup>。有关葡萄糖淀粉酶结构的研究起始较早, 当前被 PDB (Protein Data Bank) 数据库收录的葡萄糖淀粉酶晶体结构有很多<sup>[11]</sup>, 但是早期报道的葡萄糖淀粉酶结构只有催化结构域。Li 等<sup>[12]</sup>对红褐肉座菌 *Hypocrea jecorina* 来源的葡萄糖淀粉酶 HJGA 进行了晶体结构的解析, 成功报道了第一个涵盖了催化域、淀粉结合域和连接域完整的葡萄糖淀粉酶的晶体结构 (2VN4)。近来, 工业上应用最广泛的 3 种葡萄糖淀粉酶 HrGA、PoGA 和 AnGA 完整的晶体结构也相继被成功解析并报道<sup>[13]</sup>。以上研究主要分析了葡萄糖淀粉酶整体的结构特点及其与催化底物反应的关系, 针对其与温度稳定性相关的结构分析尚未见报道。由于高温葡萄糖淀粉酶资源相对匮乏和与温度稳定性相关的结构特点尚不清楚, 当前提高葡萄糖淀粉酶温度稳定性的研究主要通过定向进化的方法<sup>[14-15]</sup>。该方法需要

建立庞大的突变体库, 筛选过程耗时较长且工作量大。因此, 新颖高温葡萄糖淀粉酶的基因资源挖掘和结构特点的分析对于高温葡萄糖淀粉酶的研究具有重要意义。

嗜热真菌是高温葡萄糖淀粉酶的重要来源之一<sup>[5]</sup>, 目前报道的产葡萄糖淀粉酶的嗜热真菌有篮状菌属 *Talaromyces*<sup>[16]</sup>、嗜热真菌属 *Thermomyces*<sup>[17]</sup> 和毛壳菌属 *Chaetomium*<sup>[18]</sup> 等。 *T. leycettanus* JCM12802 的最适生长温度为 40 °C, 属于典型的嗜热真菌。该真菌来源的众多酶资源已被发掘和研究, 且大多具有较高的温度特性, 例如淀粉酶、木聚糖酶、葡聚糖酶、甘露聚糖酶和果胶酶等<sup>[19-23]</sup>。本研究中, 我们从嗜热真菌 *T. leycettanus* JCM12802 基因组中检索到一个葡萄糖淀粉酶基因, 并命名为 *Tlga15A*。将其成功克隆后在毕赤酵母中进行高效异源表达和基本性质研究, 发现其具有较高的反应温度和温度稳定性, 在工业葡萄糖生产中有较大应用潜力。最后, 我们针对高温葡萄糖淀粉酶 *Tlga15A* 的结构特点进行了初步分析, 为今后的突变研究提供了思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体及试剂

菌株 *T. leycettanus* JCM12802 购自日本微生物保藏中心 (Japan Collection of Microorganisms, JCM), 活化和培养所选用的培养基均为马铃薯葡萄糖培养基 (PDA), 培养温度为 40 °C。用于基因克隆的载体为 pEASY-T3, 宿主菌为大肠杆菌 Trans-T1, 均购自北京全式金生物技术有限公司。葡萄糖淀粉酶基因 *Tlga15A* 的表达载体为 pPIC9, 表达宿主为毕赤酵母 GS115。试验中所用的总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒分别购自天根生化科技有限公司和东洋纺生物科技有限公司; DNA 高保真聚合酶 FastPfu Fly 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega, 限制性内切酶均购自 NEB。用于酶活测定的可溶

性淀粉、支链淀粉、直链淀粉、糖原、糊精、普鲁兰酶、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精等底物均购自 Sigma-Aldrich。其他常见化学试剂均为分析纯。

### 1.2 培养基的配制

实验中所用的培养基有马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA)、马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB)、LB 液体培养基、LB 固体培养基、MD 固体培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基和 YPD 培养基。其详细制备方法可参照文献[24]。

### 1.3 基因序列信息的获取及分析

根据 *T. leycettanus* JCM12802 的全基因组测序结果, 查找到一个 GH15 家族葡萄糖淀粉酶基因并命名为 *Tlga15A*, 然后对该基因进行生物信息学分析。将葡萄糖淀粉酶 *Tlga15A* 的基因序列通过 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 检索同源序列, 从而对该基因的新颖性进行评估, 然后提交 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), 对基因的内含子和外显子进行预测。利用 Vector NTI Advance 10.0 软件将基因序列翻译成氨基酸序列后, 并分析其编码蛋白质的序列长度、等电点和分子量等信息。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其编码蛋白质的信号肽序列。

### 1.4 葡萄糖淀粉酶基因 *Tlga15A* 的克隆与毕赤酵母表达载体构建

将菌株 *T. leycettanus* JCM12802 在 40 °C 摇瓶培养活化, 48 h 后转接以淀粉为唯一碳源的诱导培养基中培养 3-4 d, 12 000 r/min 离心收集菌体。根据总 RNA 提取试剂盒使用说明提取菌体的总 RNA, 然后参照东洋纺 ReverTra Ace-a-TM kit 反转录试剂盒方法, 将 RNA 反转录合成 cDNA。通过分析基因 *Tlga15A* 的全长序列和编码的成熟氨基酸序列, 去除信号肽序列后, 设计分别含有 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的引物 *TlgaF* (5'-GGGGAATTCGACACAGCCTGTGCTTCCCAGAG-3') 和

*TIGAR* (5'-GGGGCGGCCGCCTATCTCCAGGTATCGTTCTCCGTC-3'), 然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将扩增产物用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后连入 pPIC9 载体转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态, 挑选阳性克隆并测序验证。

### 1.5 葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 的表达与纯化

将经测序验证正确的表达载体 pPIC9-*Tiga15A* 用限制性内切酶 *Dra* I 线性化处理, 电击转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中; 将转化子涂布组氨酸缺陷型的 MD 平板于 30 °C 培养箱培养 2 d, 然后挑取 48 个单克隆菌落于 3 mL BMGY 液体培养基中培养 (30 °C、250 r/min), 培养 2 d 后 4 500 r/min 离心 5 min, 弃上清培养基并收集菌体, 然后重悬于 1.0 mL 的 BMMY 诱导培养基中诱导培养 2 d。最后, 通过酶活检测挑选出活性最高的克隆子进行摇瓶放大培养。

将筛选的高酶活转化子用 YPD 培养基活化后接种于 300 mL BMGY 液体培养基中, 接种量为 1% (V/V)。30 °C 条件下培养 48 h 后, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 转入 200 mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY 液体培养基继续培养 48 h, 期间每隔 12 h 补加 1 000  $\mu$ L 甲醇, 使甲醇终浓度控制在 0.5% 左右。

培养结束后, 将粗酶液 1 2000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 并用截留分子量为 10 kDa 的膜包 (Vivascience) 浓缩至 10 mL, 然后于 pH 6.5、10 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中过夜透析。将透析处理的酶液通过阴离子交换层析 (HiTrap Q XL) 进行纯化, 获得单一组分的目的蛋白。将纯化后的蛋白用 Endo H (NEB) 处理去除 *N*-糖基化修饰。最后, 将纯化后的蛋白与去除 *N*-糖基化修饰的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 *TIGA* 的酶活力测定及性质研究

葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 活力测定所使用的底物为 1% 可溶性淀粉, 在由 900  $\mu$ L 底物和 100  $\mu$ L 的

酶液组成的反应体系中 (pH 4.5), 75 °C 条件下反应 30 min, 使用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法检测还原糖生成量<sup>[25]</sup>, 每分钟产生 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量即为一个酶活力单位, 符号为 U/mL。

测定葡萄糖淀粉酶的最适 pH 时, 将纯化的葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 分别置于不同 pH 的反应环境中, 75 °C 条件下反应 30 min, 然后测定还原糖的生成量, 分别计算不同 pH 条件下的酶活, 其中酶活最高时对应的 pH 值即为该酶的最适 pH。pH 稳定性的测定方法为将纯化的酶液调至在 pH 1.0–12.0 范围内, 37 °C 下孵育 1 h, 然后于 pH 4.5 条件下 75 °C 反应 30 min 测定其剩余酶活, 计算不同 pH 处理下的相对剩余酶活。

葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 最适温度测定方法为将纯化的酶用 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 (50 mmol/L) 稀释到合适的浓度, 添加到相同 pH 的底物溶液中; 分别检测其在 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、75 °C、80 °C、85 °C 条件下酶活力, 其中酶活最高时的反应温度即为该酶的最适反应温度。将纯化的葡萄糖淀粉酶分别在 60 °C、65 °C 和 70 °C 条件下孵育 2–60 min 不同时间, 然后测定其剩余酶活。以 0 °C 处理的样品为参照 (100%), 分别计算不同温度条件下处理不同时间后样品的剩余酶活。

### 1.7 不同金属离子和化学试剂对葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 活力的影响

$\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、SDS、EDTA 和  $\beta$ -巯基乙醇等金属离子及化学试剂对 *TIGA* 活力的影响。在酶促反应体系中加入以上金属离子和化学试剂, 使其终浓度为 5 mmol/L。然后, 在标准反应条件下测定葡萄糖淀粉酶活力; 以未添加任何试剂的反应体系为对照组; 最终, 计算金属离子及化学试剂对酶活性的影响, 每组试剂设置 3 个平行反应。

## 1.8 *TlGA* 的酶学动力学及底物特异性研究

用 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液配制浓度为 1–10 mg/mL 不等的可溶性淀粉, 糊化后作为反应底物。然后在 pH 4.5、75 °C 条件下反应 5 min 并测定不同底物浓度下的酶活。将酶活数据使用 GraphPad Prism 5.01 进行处理分析。

分别选取支链淀粉、糖原、普鲁兰、糊精、直链淀粉、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精为底物, 用 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液配制浓度为 5 mg/mL。将酶液稀释到合适的浓度后, 分别测定葡萄糖淀粉酶 *TlGA* 对不同底物在 75 °C 条件下的酶活力。以可溶性淀粉为底物时的酶活为 100%, 分别计算其他底物的相对酶活力。

## 1.9 *TlGA* 同源建模与结构分析

为了探究葡萄糖淀粉酶 *TlGA* 的高温机制和与之对应的结构特点, 需要通过同源建模的方法获得葡萄糖淀粉酶 *TlGA* 三维结构。首先, 将 *TlGA* 的氨基酸序列输入 PDB 数据进行检索; 其次, 综合考虑一致性和覆盖度两个指标挑选适合的模板; 最后, 利用软件 Discovery Studio 2017 进行三维结构的预测和构建。

# 2 结果与分析

## 2.1 葡萄糖淀粉酶基因 *Tlga15A* 的克隆与序列分析

从 *T. leycettanus* JCM12802 成功克隆葡萄糖淀粉酶编码基因 *Tlga15A* 并提交 GenBank 数据库, 序列注册号为 MH730064。该基因全长为 2 186 bp, 包含 4 个内含子, 长度分别为 88 bp、57 bp、66 bp 和 64 bp。葡萄糖淀粉酶基因 *Tlga15A* 的 cDNA 全长为 1 911 bp, 能够编码 636 个氨基酸。对其编码的氨基酸序列进行信号肽预测分析结果表明, 其 N 端的前 20 个氨基酸残基是其信号肽序列。成熟肽部分的理论分子量为 63.3 kDa, 预测等电点为 4.76。网站预测有 3 个潜在的 N-糖基化修饰位点, 分别为 N183、N443 和 N572。葡萄糖淀粉

酶 *TlGA* 的氨基酸序列与丝衣霉 *Byssoschlamys spectabilis* 来源的葡萄糖淀粉酶 GAD95639 最为相似, 一致性为 76%; 与已报道过性质的葡萄糖淀粉酶 P69328<sup>[26]</sup> 的序列一致性为 70.6%; 并与来源于泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* 的葡萄糖淀粉酶晶体结构 1GAI\_A 的序列一致性为 75%。

## 2.2 葡萄糖淀粉酶 *TlGA* 同源建模与结构分析

在 PDB 数据库中, *TlGA* 与泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* 来源的葡萄糖淀粉酶晶体结构 1GAI\_A 有最高的序列一致性 (75%), 但是覆盖度仅有 74%; 而与黑曲霉 *Aspergillus niger* 来源的葡萄糖淀粉酶晶体结构 6FRV\_A 的序列一致性为 70%, 其覆盖度可高达 95%。因此, 我们以 1GAI\_A 和 6FRV\_A 同时作为模板进行同源建模。从结构上来看 (图 1), *TlGA* 由 2 个结构域组成: 底物结合域 (SBD) 和催化结构域 (CD), 二者之间为连接域 (Linker)。从序列比对的结果来看, *TlGA* 的底物结合域属于 CBM20, 位于葡萄糖淀粉酶的 C-末端。该区域在序列上富含苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等芳香族氨基酸残基, 其二级结构主要是由 7 段  $\beta$ -折叠片反向平行折叠形成的  $\beta$ -卷筒结构。葡萄糖淀粉酶催化域含有 440 个氨基酸残基, 是由 13 股  $\alpha$ -螺旋组成的  $(\alpha/\alpha)_6$  桶状结构。Glu188 和 Glu409 组成葡萄糖淀粉酶催化中心, Glu188 作为质子供体将  $H^+$  传递给淀粉链中易断裂键的糖苷键上形成含氧碳正离子, 然后水分子在

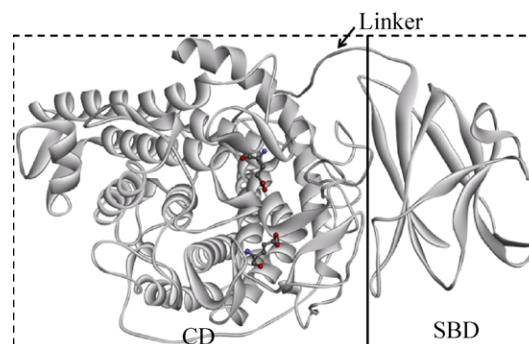


图 1 *TlGA* 的三维结构

Fig. 1 Overall structure of *TlGA*.



Glu409协助下发起亲核攻击,从而使糖苷键断裂。葡萄糖淀粉酶的连接域是一段高度 *O*-糖基化的多肽链,长度为 73 个氨基酸。该区域富含 Ser 和 Thr 残基并且容易发生 *O*-糖基化。糖基化作用能够有效稳定蛋白质骨架,避免蛋白酶水解,增强糖化酶亲和力和增加糖化酶热稳定性等作用。

## 2.3 重组葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 的表达和纯化

将转化了 *Tlga15A* 基因的 GS115 毕赤酵母菌株进行摇瓶发酵,获得粗酶液后进行浓缩、纯化和 SDS-PAGE 分析。结果显示 *TIGA* 的目的条带大小为 75 kDa (图 2A), Endo H 酶处理后,目的

条带有轻微减小,但仍旧比 63.3 kDa 的理论分子量大。可能的原因是连接催化域 (CD) 和底物结合域 (CBM) 的 Linker 区存在大量的 *O* 糖基化位点,从而导致电泳条带远大于理论分子量。为了进一步确认纯化得到的蛋白是编码葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 的目标蛋白,将条带进行质谱检测,检测结果显示有 5 个片段能与目的序列完全匹配,其覆盖度为 39% (图 2B)。质谱结果充分证明了 75 kDa 附近的蛋白条带是目的蛋白。

## 2.4 酶学性质的分析

与多数真菌来源的葡萄糖淀粉酶相似, *TIGA* 在酸性条件下有较高的酶活力。其最适 pH 为 4.5 (图 3A), 在 pH 3.0–5.5 范围内保持 40% 以上的酶活力; 在 pH 7.0 的中性条件和碱性条件下葡萄糖淀粉酶完全丧失活力。葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 在较宽的 pH 范围内均能保持稳定, 在 pH 3.0–9.0 范围内 37 °C 处理 1 h, 都有 80% 以上的剩余酶活 (图 3B)。在 40–75 °C 的温度范围内, 重组的葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 随着反应温度升高, 糖化酶活性逐步增加, 75 °C 时达到最高酶活力; 当反应温度超过 75 °C 时, 酶活骤降; 反应温度为 80 °C 时, 仅有不到 20% 的酶活 (图 3C)。 *TIGA* 具有较好的热稳定性, 65 °C 处理 1 h, 酶活损失在 30% 以内; 70 °C 条件下处理 30 min, 仍有 43% 的剩余酶活; 75 °C 条件下处理 5 min 的剩余酶活约为 40% (图 3D)。

## 2.5 金属离子及化学试剂对酶活的影响

尽管很多  $\alpha$ -淀粉酶都存在金属离子激活效应, 但是常见的离子对葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 促进作用并不明显。Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对葡萄糖淀粉酶有一定的促进作用; 而 Ag<sup>+</sup> (62.2%)、Mn<sup>2+</sup> (82.2%)、 $\beta$ -Mercaptoeth (61.8 $\pm$ 0.98)、EDTA (89.7 $\pm$ 1.41) 和 SDS (24.3 $\pm$ 0.75) 能有效抑制其酶活力 (表 1)。

## 2.6 底物特异性及动力学分析

纯化的葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 以可溶性淀粉为

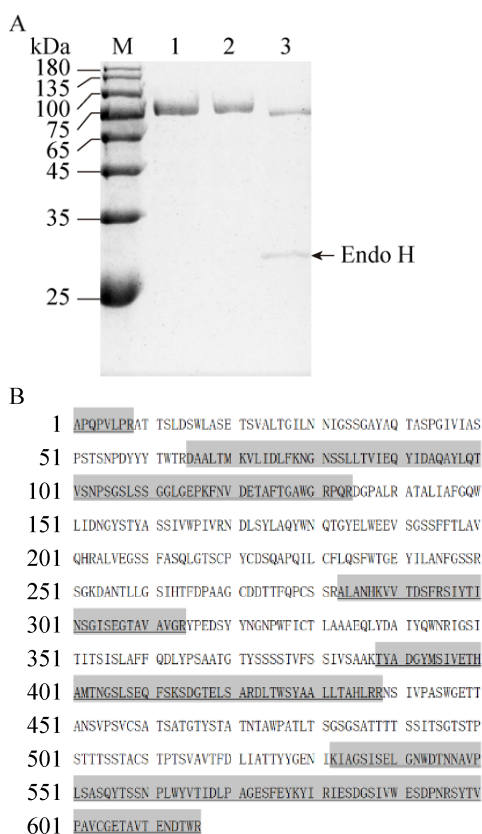


图 2 *TIGA* 的 SDS-PAGE 及质谱检测分析

Fig. 2 SDS-PAGE and mass spectrometry (MS) analysis of recombinant *TIGA*. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant *TIGA*. Lane M: the standard molecule weight; Lane 1: concentrated *TIGA* with a flow 200 ultrafiltration membrane; Lane 2: purified *TIGA*; Lane 3: purified *TIGA* treated with Endo H. (B) Amino acid sequence of *TIGA*. The correspondence of MS was labeled with shadow and underline.

底物时, 在 75 °C、pH 4.5 的条件下的比活力为  $(255.6 \pm 15.3)$  U/mg;  $K_m$  值为  $(1.79 \pm 0.11)$  mg/mL,  $V_{max}$  值为  $(276.0 \pm 3.5)$   $\mu$ mol/(min·mg)。葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 不仅可以高效地催化可溶性淀粉的水解, 对其他底物也表现出较高的水解活性。

对支链淀粉、糖原、糊精、普鲁兰的比活力分别为  $(342.3 \pm 24.7)$  U/mg、 $(185.4 \pm 12.5)$  U/mg、 $(423.3 \pm 29.3)$  U/mg 和  $(65.7 \pm 8.1)$  U/mg (表 2)。对于直链淀粉、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精等底物未检测到活性。

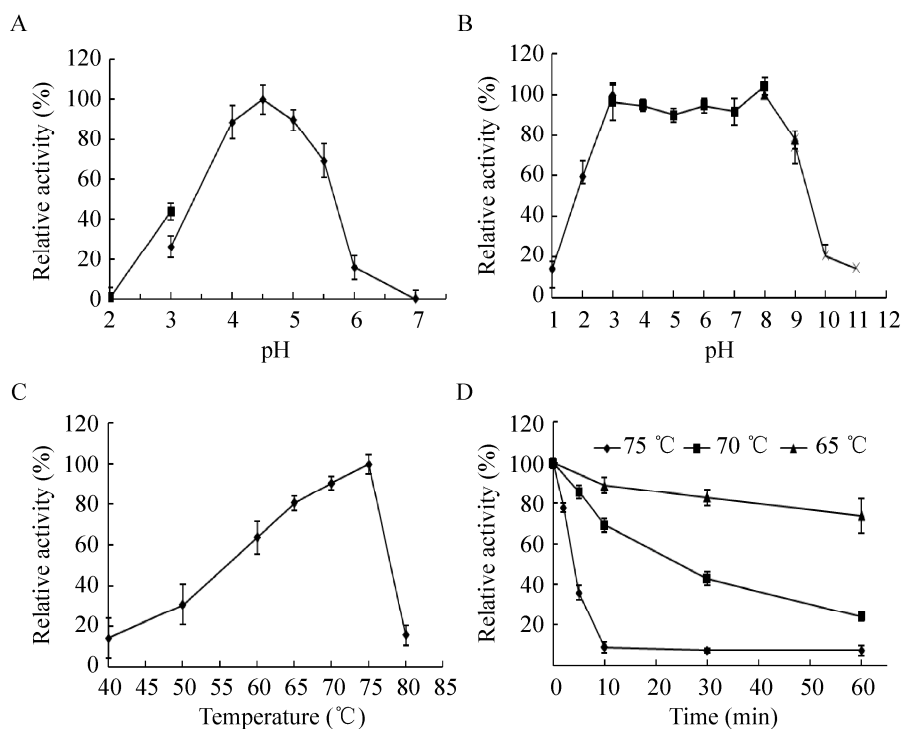


图 3 *TIGA* 的基本酶学性质(A: 最适 pH; B: pH 稳定性; C: 最适温度; D: 温度稳定性)

Fig. 3 Characterization of purified recombinant *TIGA*. (A) Effect of pH on enzyme activities. (B) pH stabilities. (C) Effect of temperature on enzyme activities. (D) Thermostability.

表 1 金属离子及化学试剂对 *TIGA* 活性的影响

Table 1 Effect of metal ions and chemical reagents on the enzyme activity

Chemicals	Relative activity (%)	Chemicals	Relative activity (%)
Control	100.0 $\pm$ 0.9	Ni <sup>2+</sup>	109.8 $\pm$ 1.3
K <sup>+</sup>	98.0 $\pm$ 1.1	Cr <sup>3+</sup>	105.5 $\pm$ 1.6
Mg <sup>2+</sup>	109.5 $\pm$ 1.2	Cu <sup>2+</sup>	116.6 $\pm$ 1.2
Na <sup>+</sup>	115.2 $\pm$ 0.7	Zn <sup>2+</sup>	117.2 $\pm$ 1.2
Ca <sup>2+</sup>	113.9 $\pm$ 0.4	Fe <sup>3+</sup>	98.7 $\pm$ 1.2
Pb <sup>2+</sup>	106.1 $\pm$ 0.7	$\beta$ -Mercaptoethanol	61.8 $\pm$ 0.9
Ag <sup>+</sup>	62.2 $\pm$ 1.2	EDTA	89.7 $\pm$ 1.4
Mn <sup>2+</sup>	82.2 $\pm$ 2.8	SDS	24.3 $\pm$ 0.8

表 2 *TIGA* 对不同底物的  $K_m$  和比活力Table 2 The  $K_m$  and specific activities of *TIGA* on different substrates

Substrates	$K_m$ (mg/mL)	Specific activities (U/mg)
Amylopectin	1.6±0.2	342.3±24.7
Soluble starch	1.8±0.1	255.6±15.3
Glycogen	2.7±0.2	185.4±12.5
Dextrin	1.1±0.1	423.3±29.3
Pullulan	2.4±0.1	65.7±8.1

### 3 讨论

工业制糖过程通常是在较高的温度条件下完成的,因此要求葡萄糖淀粉酶要有较高的温度稳定性。目前黑曲霉的葡萄糖淀粉酶 AnGA 应用最为广泛<sup>[4,27]</sup>,其最适反应温度为 65–70 °C,通常在 60 °C 条件下能够保持稳定<sup>[4]</sup>。在本研究中,从嗜热真菌 *T. leycettanus* JCM12802 中获得了一个高温葡萄糖淀粉酶 *TIGA*,其最适温度为 75 °C,65 °C 处理 1 h 仍剩余 70% 以上的酶活,在最适温度和温度稳定性上优于当前工业上广泛应用的葡萄糖淀粉酶。通常真菌来源的葡萄糖淀粉酶温度稳定性较差<sup>[8]</sup>,而嗜热真菌一直以来都是高温糖化酶的重要来源之一<sup>[28]</sup>。Nielsen 等从嗜热真菌

*Talaromyces emersonii* 克隆了一个耐热葡萄糖淀粉酶基因 *pJaL518*,并在黑曲霉 *A. niger* 中进行了表达<sup>[16]</sup>。该葡萄糖淀粉酶的最适温度为 70 °C,低于 *T. leycettanus* 来源的葡萄糖淀粉酶 *TIGA* (75 °C);但是二者在温度稳定性方面差距并不明显,可能的原因是由表达宿主差异导致糖基化程度不同造成的。结合高温葡萄糖淀粉酶 *TIGA* 的性质特点,以低温葡萄糖淀粉酶 AmyT1<sup>[29]</sup>和中温葡萄糖淀粉酶 HjGA<sup>[12]</sup>为参照,从蛋白的一级结构、二级结构和三级结构这 3 个层面进行了比较分析。

分析葡萄糖淀粉酶一级结构时,主要从特殊氨基酸组成、*N*-糖基化位点和形成二硫键数目这 3 个特点进行比较分析。Arg 和 Pro 在 3 种不同葡萄糖淀粉酶序列中出现的频率差异不大,但是 Gly 在 *TIGA* 中所占的比例明显低于 HjGA 和 AmyT1 (表 3)。Gly 作为柔性最强的氨基酸,它在蛋白分子中出现的频率与整个蛋白分子的柔性密切相关,这在以往的研究中已被广泛证实<sup>[30]</sup>。据报道,蛋白的糖基化程度和二硫键数目也与其稳定性密切相关<sup>[31,32]</sup>;我们对其进行了比较分析,发

表 3 葡萄糖淀粉酶 *TIGA*、HjGA、AmyT1 的结构比较Table 3 Structural factors comparison between *TIGA*, HjGA and AmyT1

	<i>TIGA</i>	HjGA	AmyT1
Total number of amino acid	616	617	616
Primary structure			
Arg	17 (2.75%)	18 (2.91%)	28 (4.54%)
Gly	43 (6.98%)	49 (7.94%)	52 (8.44%)
Pro	28 (4.54%)	27 (4.38%)	28 (4.54%)
Ratio of Gly/Pro	1.54	1.81	1.85
The number of disulfide bond	3	4	4
The number of <i>N</i> -glycosylation site	6	4	6
Secondary structure			
Amino acid number for $\alpha$ -helix	252 (40.92%)	255 (41.33%)	243 (39.45%)
Amino acid number for $\beta$ -pleated sheet	99 (16.07%)	101 (16.37%)	98 (15.91%)
Amino acid number for random coil	265 (43.01%)	261 (42.30%)	275 (44.64%)
Tertiary structure			
Solvent accessible surface (SASA, Å <sup>2</sup> )	13 808.2	13 669.7	14 057.4
Exposed nonpolarity SASA (Å <sup>2</sup> )	6 857.5	7 680.6	7 657.2
Exposed polarity SASA (Å <sup>2</sup> )	3 722.0	2 892.9	3 291.9
Exposed charge SASA (Å <sup>2</sup> )	3 228.7	3 095.5	3 108.3



现在不同葡萄糖淀粉酶分子的 *N*-糖基化位点与其温度特点没有明显规律;但是在二硫键组成方面,低温葡萄糖淀粉酶 AmyT1 和中温葡萄糖淀粉酶 HjGA 均有 4 对二硫键,而高温葡萄糖淀粉酶 TIGA 仅有 3 对。众所周知,二硫键是维持蛋白稳定的重要作用力;在蛋白的热稳定性改良时,引入二硫键也是一个重要的策略。但是在高温葡萄糖淀粉酶 TIGA 材料中二硫键缺失的生物学意义尚不清楚。因此,从氨基酸组成上来看,低频率的 Gly 是葡萄糖淀粉酶 TIGA 高温耐受性的重要原因之一。

蛋白的二级结构原件主要包括  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$  折叠和无规则卷曲,蛋白二级结构的组成往往会影响到蛋白整体的稳定性<sup>[30]</sup>。因此,我们对高温葡萄糖淀粉酶 TIGA、中温葡萄糖淀粉酶 HjGA 和低温葡萄糖淀粉酶 AmyT1 的二级结构进行了统计。从结果可以看出,高温葡萄糖淀粉酶 TIGA 在二级结构组成和占比上与 HjGA 和 AmyT1 没有明显差异(表 3)。可能的原因是 3 种葡萄糖淀粉酶在序列上有很高的相似性,从而其二级结构的差异也不明显。因此,从二级结构层面并不能很好地解释葡萄糖淀粉酶 TIGA 的高温机制。

在三级结构层面上,我们主要分析不同葡萄糖淀粉酶分子的溶剂可及表面积并比较它们的差异。与中温葡萄糖淀粉酶 HjGA 和低温葡萄糖淀粉酶 AmyT1 相比,高温葡萄糖淀粉酶 TIGA 的非极性残基的溶剂可及表面积明显小于 HjGA 和 AmyT1(表 3)。疏水作用力是维持蛋白质三级结构稳定的主要因素,因此,过多的疏水残基暴露在溶剂环境是影响蛋白稳定的重要原因。非极性残基的溶剂可及表面积越小,整个蛋白分子在三级结构上越稳定。因此,从氨基酸组成上来看,较小的非极性残基的溶剂可及表面积是葡萄糖淀粉酶 TIGA 高温耐受性的又一重要原因。

综上所述,本研究获得了一个新颖的高温葡萄糖淀粉酶基因 *Tlga15A*,并在毕赤酵母中成功进行

了高效表达。该葡萄糖淀粉酶有较高的最适反应温度和温度稳定性,同时对普鲁兰有较好的降解活性。这些特点使其在工业制糖中有很好的应用前景。另外,我们分析了 TIGA 的结构特点,对葡萄糖淀粉酶的分子改造具有重要的指导意义。

## REFERENCES

- [1] Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, et al. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543(2): 275–293.
- [2] Nguyen QD, Rezessy-Szabó JM, Claeysens M, et al. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(3): 345–352.
- [3] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, et al. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31: 135–152.
- [4] Kumar P, Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2009, 29(3): 225–255.
- [5] Saha BC, Zeikus JG. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. *Starch-Starke*, 1989, 41(2): 57–64.
- [6] Liu Y, Li QS, Zhu HL, et al. Purification and characterization of two thermostable glucoamylases produced from *Aspergillus niger* B-30. *Chem Res Chin Univ*, 2013, 29(5): 917–923.
- [7] Wu J, Duan XG. Research progress of enzymes involved in starch processing. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2015, 15(6): 14–25 (in Chinese).  
吴敬, 段绪果. 淀粉加工用酶研究进展. *中国食品学报*, 2015, 15(6): 14–25.
- [8] Hostinová E, Gašperík J. Yeast glucoamylases: molecular-genetic and structural characterization. *Biologia*, 2010, 65(4): 559–568.
- [9] Coutinho PM, Reilly PJ. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins*, 1997, 29(3): 334–347.
- [10] Lin SC, Liu WT, Liu SH, et al. Role of the linker region in the expression of *Rhizopus oryzae* glucoamylase. *BMC Biochem*, 2007, 8(1): 9.
- [11] Li ZL, Wei PY, Cheng HR, et al. Functional role of  $\beta$

- domain in the *Thermoanaerobacter tengcongensis* glucoamylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 2091–2099.
- [12] Bott R, Saldajeno M, Cuevas W, et al. Three-dimensional structure of an intact glycoside hydrolase family 15 glucoamylase from *Hypocrea jecorina*. *Biochemistry*, 2008, 47(21): 5746–5754.
- [13] Roth C, Moroz OV, Ariza A, et al. Structural insight into industrially relevant glucoamylases: flexible positions of starch-binding domains. *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol*, 2018, 74(5): 463–470.
- [14] McDaniel A, Fuchs E, Liu Y, et al. Directed evolution of *Aspergillus niger* glucoamylase to increase thermostability. *Microb Biotechnol*, 2008, 1(6): 523–531.
- [15] Wang Y, Fuchs E, da Silva R, et al. Improvement of *Aspergillus niger* glucoamylase thermostability by directed evolution. *Starch-Starke*, 2006, 58(10): 501–508.
- [16] Nielsen BR, Lehmbeck J, Frandsen TP. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a thermostable glucoamylase from *Talaromyces emersonii*. *Protein Express Purif*, 2002, 26(1): 1–8.
- [17] Thorsen TS, Johnsen AH, Josefsen K, et al. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(4): 671–676.
- [18] Chen J, Zhang YQ, Zhao CQ, et al. Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(6): 2277–2284.
- [19] Wang XY, Ma R, Xie XM, et al. Thermostability improvement of a *Talaromyces leycettanus* xylanase by rational protein engineering. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15287.
- [20] Shuai Y, Tao T, Zhang L, et al. Improvement of the thermostability and catalytic efficiency of a highly active  $\beta$ -glucanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 by optimizing residual charge-charge interactions. *Biotechnol Biof*, 2016, 9(1): 124.
- [21] Zhang DD, Tu T, Wang Y, et al. Improving the catalytic performance of a *Talaromyces leycettanus*  $\alpha$ -amylase by changing the linker length. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(24): 5041–5048.
- [22] Wang CH, Luo HY, Niu CF, et al. Biochemical characterization of a thermophilic  $\beta$ -mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(3): 1217–1228.
- [23] Li YQ, Wang Y, Tu T, et al. Two acidic, thermophilic GH28 polygalacturonases from *Talaromyces leycettanus* JCM 12802 with application potentials for grape juice clarification. *Food Chem*, 2017, 237: 997–1003.
- [24] Li XL, Tu T, Yao B, et al. A novel bifunctional xylanase/cellulase TcXyn10A from *Thermoascus crustaceus* JCM12803. *Chin J Biotech*, 2018, 34(12): 1996–2006 (in Chinese).  
李晓丽, 涂涛, 姚斌, 等. 嗜热子囊菌 JCM12803 来源的双功能木聚糖/纤维素酶. *生物工程学报*, 2018, 34(12): 1996–2006.
- [25] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426–428.
- [26] Svensson B, Larsen K, Gunnarsson A. Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem*, 1986, 154(3): 497–502.
- [27] Rezaul Karim KM, Husaini A, Hossain MA, et al. Heterologous, expression, and characterization of thermostable glucoamylase derived from *Aspergillus flavus* NSH9 in *Pichia pastoris*. *BioMed Res Int*, 2016, 2016: 5962028.
- [28] Ben Abdelmalek-Khedher I, Urdaci MC, Limam F, et al. Purification, characterization, and partial primary sequence of a major-maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase, ScAmy43, from *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(9): 1555–1563.
- [29] Carrasco M, Alcaíno J, Cifuentes V, et al. Purification and characterization of a novel cold adapted fungal glucoamylase. *Microb Cell Factor*, 2017, 16(1): 75–85.
- [30] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(1): 1–43.
- [31] Fonseca-Maldonado R, Vieira DS, Alpointi JS, et al. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. *J Biol Chem*, 2013, 288(35): 25522–25534.
- [32] Min R, Li JF, Gao SJ, et al. Correlation between thermostability of the xylanase EvXyn11<sup>TS</sup> and its N-terminal disulfide bridge. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(4): 346–353 (in Chinese).  
闵柔, 李剑芳, 高树娟, 等. 木聚糖酶 EvXyn11<sup>TS</sup> 耐热性与其 N 端二硫键的相关性分析. *微生物学报*, 2013, 53(4): 346–353.

(本文责编 郝丽芳)