

研究报告

细菌麦芽糖淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的诱导型异源表达

杨韵霏^{1,2} 李由然^{1,2} 张梁^{1,2} 李赢^{1,2} 顾正华^{1,2} 丁重阳^{1,2} 石贵阳^{1,2*}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现地衣芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效异源表达,并研究该重组酶的酶学性质。【方法】克隆巨大芽孢杆菌木糖异构酶基因的启动子区域及其调控蛋白,构建一个大肠杆菌/芽孢杆菌穿梭型诱导表达质粒,使用该诱导型启动子介导麦芽糖淀粉酶编码基因,实现其在枯草芽孢杆菌中的功能表达。对重组枯草芽孢杆菌的诱导条件进行优化,提高麦芽糖淀粉酶的产量。【结果】获得了诱导表达麦芽糖淀粉酶基因的重组枯草芽孢杆菌菌株。最适诱导温度为 45 °C,最适诱导剂添加浓度为 1%,最适添加诱导剂时间为接种培养 9 h 后。重组酶蛋白分子量大小为 67 kD,对该酶的酶学性质研究发现,以可溶性淀粉为底物,反应生成麦芽糖和葡萄糖,其中麦芽糖含量为 60.42%。重组酶最适作用温度为 45 °C,最适作用 pH 为 6.5, Ca²⁺、Co²⁺、EDTA 对该重组麦芽糖淀粉酶具有激活作用。【结论】通过木糖诱导表达系统可以实现麦芽糖淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效诱导型表达,酶活最高可达 296.64 U/mL 发酵液,在工业上有着较好的应用前景。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 麦芽糖淀粉酶, 木糖诱导启动子, 诱导条件, 酶学性质

Inducible heterogenous expression of bacterial maltogenic amylase in *Bacillus subtilis*

YANG Yun-Fei^{1,2} LI You-Ran^{1,2} ZHANG Liang^{1,2} LI Ying^{1,2} GU Zheng-Hua^{1,2}
DING Zhong-Yang^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To achieve the efficient heterogenous expression of a bacterial maltogenic amylase in *Bacillus subtilis* and investigate the characterization of the recombinant enzyme. [Methods] We cloned the genes of xylose isomerase promoter region and its regulatory protein from *Bacillus megatherium* into an *Escherichia coli* / *Bacillus* sp. shuttle expression vector, and constructed an recombinant expression plasmid which harbored an encoding gene of maltogenic amylase from

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31401674); Autonomous Program of Jiangnan University (No. JUSRP51503)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: January 27, 2016; Accepted: May 03, 2016; Published online (www.cnki.net): May 31, 2016

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31401674); 江南大学自主重点项目(No. JUSRP51503)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-27; 接受日期: 2016-05-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-31

Bacillus licheniformis. Then we transformed the expression plasmid into *Bacillus subtilis* and optimized the induction conditions of the transformant to increase the production of the recombinant enzyme. **[Results]** The recombinant *Bacillus subtilis* which inductively expressed the maltogenic amylase was obtained. The optimal induction condition was as follow, that 1% inducer was added into fermentation medium after 9 h incubation at 45 °C. The recombinant maltogenic amylase had a molecular size of 67 kD. From the study of the enzymatic properties of the enzyme, it was found that, with soluble starch as substrate, the reaction products were 60.42% maltose and few glucose. Furthermore, the recombinant enzyme showed an optimal activity at 45 °C with pH 6.5. Ca^{2+} 、 Co^{2+} and EDTA could improve the efficiency of enzyme reaction. **[Conclusion]** With induction of xylose, the bacterial maltogenic amylase was efficiently expressed in the recombinant *Bacillus subtilis*, and the maximal yield reached 296.64 U/mL, which showed good application prospect in industry.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Maltogenic amylase, Xylose promoter, Induction conditions, Enzymatic properties

麦芽糖淀粉酶(Maltogenic amylase), 全称为 1,4- α -D-葡聚糖 α -麦芽糖基水解酶(1,4- α -D-glucan α -maltohydrolase, EC 3.2.1.133), 属于糖苷水解酶 GH13 家族, 可作用于淀粉及相关多聚糖, 能优先水解直链淀粉、环状糊精, 生成的主要产物为麦芽糖, 副产物为葡萄糖^[1-3]。当前工业上主要用曲霉等丝状真菌发酵生产麦芽糖淀粉酶, 但多采用周期较长的固态发酵, 且发酵产物为真菌 α -淀粉酶和糖化酶的混合物, 不利于后期的分离纯化。与真菌来源的麦芽糖淀粉酶相比, 细菌来源的麦芽糖淀粉酶有更高的水解效率, 在淀粉行业及食品工业有更广阔的应用前景。我国尚不能在工业上大规模生产细菌麦芽糖淀粉酶, 利用基因工程技术构建合适的表达系统是生产该酶的一条可行途径。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是革兰氏阳性菌, 其细胞壁不含内毒素, 是非致病的土壤微生物, 被认为是食品安全的微生物 GRAS (Generally recognized as safe)。其具有良好的发酵基础和成熟的生产技术, 是较为理想的工业微生物生产菌株。根据表达机制的不同, 枯草芽孢杆菌表达系统可分为组成型和诱导型, 其中组成型表达载体稳定性较低, 蛋白表达受菌体生长影响较大。诱导型启动子能够在特定条件下介导目的基因的表达, 受菌体生长状态影响小, 有利于外源蛋白的工业化生产。与芽孢杆菌中其他诱导表达系统相比, 由木糖异构酶

启动子及其阻遏蛋白所组成的木糖诱导系统, 在对目的基因的表达强度和调控方面更具优势。Ryguis 等报道了巨大芽孢杆菌木糖异构酶基因的启动子受识别木糖的阻遏蛋白的调控, 在培养基中添加木糖, 启动子转录表达的强度可提高 200 倍^[4]。

本文以大肠杆菌/枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300-PLK 为基础, 构建了芽孢杆菌诱导型表达载体; 并以地衣芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶编码基因为报告基因, 实现了其在枯草芽孢杆菌中的功能表达。进一步对重组菌的诱导产酶条件进行了初步优化, 并研究了该重组酶的酶学性质, 为其在工业中的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养基

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) ATCC14580、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) 1514、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600、质粒 pHY300-PLK 均由中国高校工业微生物资源和信息中心(CICIM)保藏。重组质粒 pHYBM、pHYBMYF、重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 为本研究构建。

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。

发酵培养基(g/L): 蛋白胨 12.0, 酵母粉 24.0, 甘油 4.0, KH_2PO_4 2.3, K_2HPO_4 16.4, 调节 pH 至 7.0。

抗性筛选时补加终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素或 30 mg/L 的四环素。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA 连接酶、克隆载体 pMD19-T Simple Vector 及各种限制性内切酶, Fermentas (立陶宛)公司; 质粒提取试剂盒、核苷酸片段纯化试剂盒及胶回收试剂盒, 博大泰克(北京)生物基因技术有限公司; 氨苄青霉素和四环素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他所用药品试剂, 国药集团(上海)有限公司。

K20 干式恒温器, 杭州奥盛仪器有限公司; CF16RX II 型冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; PICO17 型高速离心机, 美国 Thermo 公司; VCX-750 型超声波细胞破碎仪, 美国 Sonic & Materials 有限公司; V-1200 可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; DYY-6C 凝胶水平电泳仪, 北京六一仪器厂; University Hood II 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; 高效液相色谱(HPLC)系统及工作站, 美国 Dionex 公司。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取、PCR 引物及条件

以 LB 培养基培养菌种 10 h 后收集新鲜菌体, 参照 Wilson 的方法进行细菌基因组 DNA 的提取^[5]。

根据巨大芽孢杆菌 1514 基因组序列中的木糖异构酶基因的启动子区域及其调控蛋白的基因序列, 设计合成引物 Pxyl01 (5'-GCCAGATCTTAACTAATTATAGGGT-3', *Bgl* II)和 Pxyl02 (5'-CGCGGATCCTTGTCATTCCCCCTTT-3', *Bam*HI)。

以巨大芽孢杆菌 1514 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到木糖异构酶基因的启动子区域片段。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应体系 (50 µL): dNTPs (2 mmol/L) 5 µL, 10×Buffer 5 µL, 上游/下游引物 (25 µmol/L) 各 1 µL, 模板 1 µL, HiFi 聚合酶 (2.5 U/µL) 0.5 µL, ddH₂O 37.5 µL。

根据地衣芽孢杆菌 ATCC14580 基因组序列中的麦芽糖淀粉酶基因序列, 设计合成如下引物

PyvdF01 (5'-GGCAGATCTATGGAATATGCAGCGATACA-3', *Bgl* II)和 PyvdF02 (5'-ATGCCCGGGT TAGACCGCCCCCAAATGA-3', *Sma* I)。

以地衣芽孢杆菌 ATCC14580 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到麦芽糖淀粉酶基因片段。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应体系同木糖异构酶基因的启动子区域片段。

PCR 产物纯化后分别与 pMD19-T Simple 连接, 按文献[6]中方法转化大肠杆菌 JM109, 构建重组质粒 pMDBM 及 pMDYF, 经测序确认无误后用于下一步实验。

1.4 重组枯草芽孢杆菌的构建

重组质粒 pMDBM 双酶切获得木糖异构酶基因的启动子区域片段 *BM_{xyl}*, 与线性化的载体 pHY300-PLK 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 转化子经筛选鉴定正确后, 得到木糖诱导表达载体 pHYBM。重组质粒 pMDYF 双酶切获得麦芽糖淀粉酶基因片段 *yvdF*, 与线性化的重组表达载体 pHYBM 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 经筛选鉴定正确后获得重组表达质粒 pHYBMYF。

将重组表达质粒 pHYBMYF 及重组表达载体 pHYBM 通过 Bott 等^[7]的方法转化入宿主枯草芽孢杆菌 WB600 中, 转化子经筛选鉴定正确后, 将所得重组菌命名为枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 及枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBM。

1.5 重组麦芽糖淀粉酶的诱导发酵及粗酶液的制备

将重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 接种于 15 mL LB 液体培养基中, 在 37 °C、200 r/min 振荡培养, 以此作为种子液。取 1 mL 培养过夜的种子液接种于 30 mL 发酵培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养 8 h 后, 加入终浓度为 1% 的木糖, 诱导发酵 16 h。将发酵液于 12 000 r/min、4 °C 条件下冷冻离心收集菌体, 弃去上清液, 用 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (0.2 mol/L, pH 6.5) 清洗并重悬菌体至 OD₆₀₀

为 10, 采用超声破碎法破碎细胞, 冷冻离心后所得上清即为粗酶液。

1.6 麦芽糖淀粉酶酶活力检测方法、蛋白含量测定及 SDS-PAGE 电泳

取 1 mL 用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.5)配制的 1%可溶性淀粉作为底物, 于 40 °C 预热 2 min 后加入 50 μL 麦芽糖淀粉酶酶液, 40 °C 反应 30 min。取 500 μL 反应液, 加入 1.5 mL DNS 煮沸 5 min, 于 540 nm 处测定吸光值, 计算产生的还原糖量。以烘干至恒重的麦芽糖为标样绘制 DNS 标准曲线。麦芽糖淀粉酶酶活单位(U)定义为: 在 40 °C、pH 6.5 的反应条件下, 每小时分解可溶性淀粉生成相当于 1 μL 麦芽糖的还原糖所需的酶量。

蛋白质浓度测定采用 Bradford 法^[8]。SDS-PAGE 电泳参照 Schagger 等的方法^[9]。

1.7 重组表达质粒稳定性测定

将重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 单菌落接种于 30 mL 含 30 mg/L 四环素的发酵培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养 18 h, 收集菌体, 用生理盐水洗涤并重悬。洗涤后的菌体细胞接种于无抗新鲜发酵培养基中, 每隔 12 h 转接一次, 转接 7 次, 转接后使初始 OD_{600} 为 0.1, 总培养时间为 96 h。重组菌经 96 h 无选择性生长后, 菌液经稀释分别涂布无抗 LB 固体平板和 30 mg/L 四环素的抗性平板。待长出单菌落, 菌落数分别记为 A_1 和 A_2 。质粒稳定性= $A_2/A_1 \times 100\%$ 。

1.8 发酵诱导条件优化

1.8.1 诱导温度优化: 重组菌 WB600/pHYBMYF 进行摇瓶发酵实验, 接种后于 37 °C、200 r/min 培养 8 h 后, 加入 1%木糖, 保持其他条件一致, 分别于不同温度、200 r/min 诱导发酵 16 h 后, 收集菌体破碎得到粗酶液, 测其蛋白浓度和酶活力, 得到诱导温度-酶活力关系表。

1.8.2 诱导剂含量优化: 重组菌 WB600/pHYBMYF 接种后于 37 °C、200 r/min 培养 8 h 后, 加入不同浓度的木糖于 45 °C、200 r/min 进行诱导发酵, 保持其他条件不变, 16 h 后结束发酵收集菌体破碎得

到粗酶液, 测其蛋白浓度和酶活力, 得到诱导剂含量-酶活力关系表。

1.8.3 添加诱导剂时间优化: 重组菌 WB600/pHYBMYF 接种后在 37 °C、200 r/min 培养不同时间后, 添加 1%木糖继续诱导发酵, 保持其他条件一致, 总培养时间 36 h, 发酵结束后收集菌体破碎得到粗酶液, 测其蛋白浓度和酶活力, 得到添加诱导剂试剂-酶活力关系表。

1.9 麦芽糖淀粉酶酶学性质研究

1.9.1 重组麦芽糖淀粉酶的纯化: 将破碎细胞所得粗酶液经 Histrap 亲和层析进行重组麦芽糖淀粉酶的纯化。结合缓冲液(A 液): 25 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 盐酸调节 pH 至 7.4; 洗脱缓冲液(B 液): 25 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 盐酸调节 pH 至 7.4。用洗脱缓冲液以 0–100%进行线性洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集纯化后的酶液, 利用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度及分子量大小。

1.9.2 麦芽糖淀粉酶水解产物检测: 采用高效液相色谱分析法检测麦芽糖淀粉酶水解底物可溶性淀粉所得的产物。色谱柱为 Waters 公司的 XBridge Amide 氨基柱, 以 70%乙腈为流动相, 流速设为 1 mL/min, 柱温 40 °C, 以一定浓度的葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖的混合物为标样, 以示差检测器检测水解淀粉的产物。

1.9.3 最适作用温度及温度稳定性的测定: 在 pH 6.5 的条件下, 在不同温度下(20–70 °C)分别测定麦芽糖淀粉酶的酶活力, 得到温度-酶活力关系图, 确定该酶的最适作用温度。将酶在不同温度下(20–70 °C)分别保温 1 h, 检测其剩余酶活力, 以未保温的原酶液活力为参照, 得到温度-稳定性关系图。

1.9.4 最适作用 pH 及 pH 稳定性的测定: 在温度 40 °C 下, 用不同 pH (4.5–8.5)缓冲液配制 1%可溶性淀粉溶液, 将不同 pH 的底物与酶反应, 测定麦芽糖淀粉酶酶活力, 得到 pH-酶活力关系图, 确定该酶的最适作用 pH。在酶活较稳定的 20 °C, 将酶

液在不同 pH (4.5–8.5) 下保温 1 h, 检测其剩余酶活力, 以原酶液活力为参照, 得到 pH-稳定性关系图。

1.9.5 化学试剂对酶活力和酶热稳定性的影响: 在最适温度 40 °C、最适 pH 6.5 下, 在反应体系中加入不同的化学试剂分别测定其酶活力, 以未处理的原酶液酶活力为参照, 得到各种化学试剂对酶活力的影响。实验中选用几种对该酶有激活作用的化学试剂, 检测其对酶热稳定性的影响。

2 结果与讨论

2.1 麦芽糖淀粉酶表达质粒 pHYBMYF 的构建

以巨大芽孢杆菌 1514 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到大小约为 1.4 kb 的木糖启动子区域基因片段, 将此片段克隆入载体 pMD19-T Simple, 得到重组质粒, 进行核苷酸序列测定验证。通过 *Bgl* II 和 *Bam*HI 双酶切法将验证正确的启动子区域基因

片段切下并克隆入载体 pHY300-PLK, 得到重组表达载体 pHYBM, 重组质粒经酶切电泳验证正确。

以地衣芽孢杆菌 ATCC14580 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到大小约为 1.8 kb 的麦芽糖淀粉酶基因片段, 将此片段克隆入载体 pMD19-T Simple, 得到重组质粒并测序验证。*yvdF* 基因序列大小为 1 761 bp, 编码 586 个氨基酸, 理论蛋白大小为 67 kD。使用 *Bgl* II 和 *Sma* I 双酶切法将验证正确的麦芽糖淀粉酶基因片段切下并克隆入构建好的表达载体 pHYBM, 转化子经提质粒酶切电泳验证正确, 获得麦芽糖淀粉酶表达质粒 pHYBMYF。重组质粒构建图谱见图 1A, *Bgl* II 和 *Sma* I 双酶切得到 4 847 bp 的 pHY300-PLK 载体片段和 3 170 bp 的启动子区域及 *yvdF* 基因片段, 电泳鉴定图见图 1B。

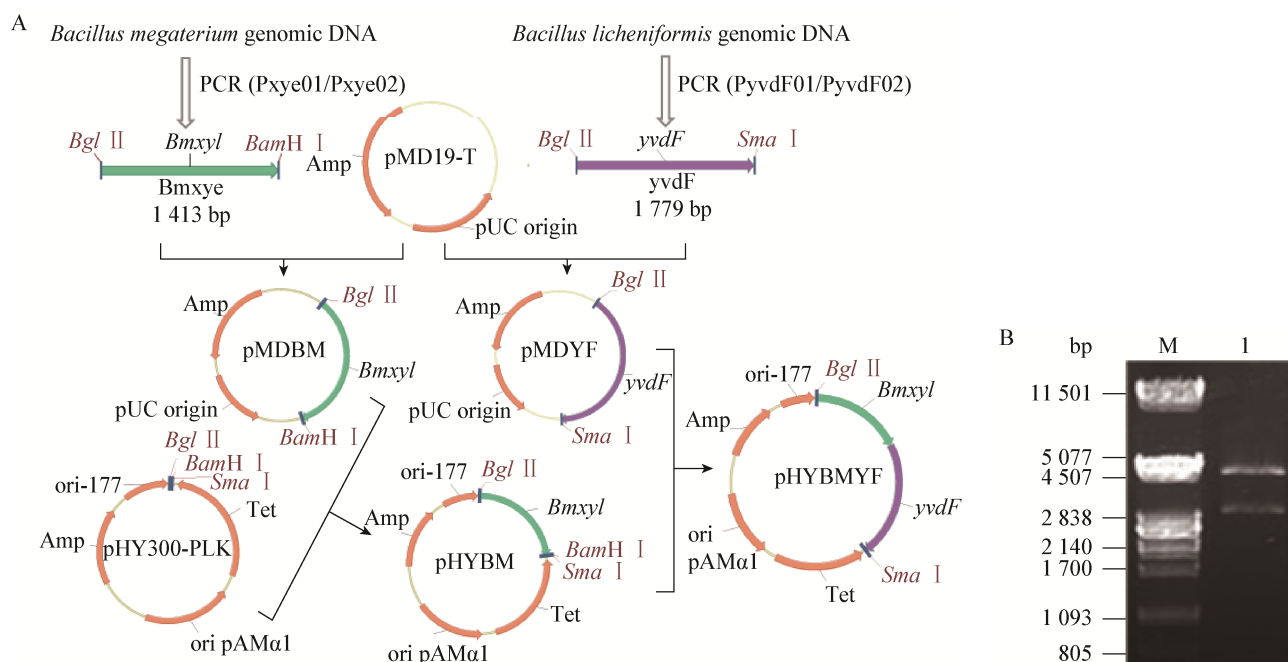


图 1 麦芽糖淀粉酶重组质粒 pHYBMYF 的构建

Figure 1 Construction of maltogenic amylase expression plasmid pHYBMYF

注: M: λ DNA/*Pst* I marker; 1: pHYBMYF 经 *Bgl* II+*Sma* I 双酶切产物。

Note: M: λ DNA/*Pst* I marker; 1: pHYBMYF/*Bgl* II+*Sma* I.

2.2 重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 的构建

将重组表达质粒 pHYBMYF 及重组表达载体 pHYBM 通过枯草芽孢杆菌转化法转化入枯草芽孢杆菌 WB600, 从所得阳性转化子中提取质粒经酶切电泳验证无误后, 将所得重组菌分别命名为枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 和枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBM。

2.3 重组麦芽糖淀粉酶的表达

将原始菌 WB600、对照菌 WB600/pHYBM 及重组表达菌株 WB600/pHYBMYF 分别进行摇瓶发酵, 后两者中加入终浓度 30 mg/L 的四环素, 接种后 8 h 三种菌发酵摇瓶中分别加入 1% 木糖诱导剂, 以不加诱导剂的重组菌株 WB600/pHYBMYF 为空白对照, 继续振荡培养 16 h, 离心收集菌体并破碎获得胞内粗酶液, 分别测定发酵上清液和胞内粗酶液的麦芽糖淀粉酶活力。结果显示, 所有发酵上清液均无酶活, 原始菌 WB600、对照菌 WB600/pHYBM 胞内和未添加诱导剂的重组菌胞内也未检测到酶活, 而只有诱导后的重组菌胞内检测到酶活力。有一些诱导表达系统并不完全受诱导剂调控, 如枯草芽孢杆菌中蔗糖果聚糖酶基因的 *PsacB* 启动子, 以蔗糖为诱导物, 其转录起始具有持续性, 并不完全受蔗糖诱导的控制, 但在蔗糖诱导下, 其表达强度能提高 100 倍^[10]。而本研究构建的木糖诱导表达系统在枯草芽孢杆菌中完全受诱导剂调控, 与前两种表达系统相比, 更利于发酵产酶过程的控制。将原始菌、对照菌、空白对照及进行诱导的重组菌发酵所得胞内产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 2。从图 2 可看出, 与其他对照相比, 只有添加木糖进行诱导发酵的重组菌的细胞破碎液在分子量为 67 kD 左右有一条明显的表达条带, 之前推测 *yvdF* 基因表达蛋白大小为 67 kD, 再次验证了重组菌将麦芽糖淀粉酶基因表达在了细胞内。

2.4 重组表达质粒 pHYBMYF 的稳定性测定

在无选择性压力下, 随着重组菌的繁殖, 外源质粒可能会出现拷贝数降低甚至丢失的现象, 所以经过对构建的重组表达质粒 pHYBMYF 在宿主枯

草芽孢杆菌中稳定性的研究, 发现重组菌在无选择压力条件下生长 96 h 后, 含有重组质粒的菌落数为总菌落数的 97% 左右。该结果表明重组表达质粒 pHYBMYF 在宿主枯草芽孢杆菌中稳定性较高, 具有工业化应用价值。

2.5 重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 发酵诱导条件优化

2.5.1 最适诱导温度: 重组菌接种后于 37 °C、200 r/min 条件下培养 8 h 后, 添加终浓度为 1% 的诱导剂后采用不同温度进行摇瓶发酵实验, 结果如表 1 所示。从表 1 可见, 诱导发酵温度在 37–45 °C 左右时, 重组酶的酶活较高, 温度低于 30 °C 时得到的酶活较低, 发酵温度为 50 °C 时得到的重组酶酶活较 45 °C 时下降明显。所以重组菌最适诱导温度在 45 °C, 后续研究中诱导发酵时均采用 45 °C。

2.5.2 最适诱导剂添加量: 重组菌接种后于 37 °C、200 r/min 条件下培养 8 h 后, 添加不同浓度的诱导剂于 45 °C 进行摇瓶发酵实验, 产酶结果见表 2。由表 2 可知, 随着所添加诱导剂的浓度增加, 酶活不断升高, 在诱导剂终浓度为 1% 时达到最高。而继续提高诱导剂浓度, 酶活非但没有升高, 反而明显下降。因此所添加的诱导剂含量最适在 1%。

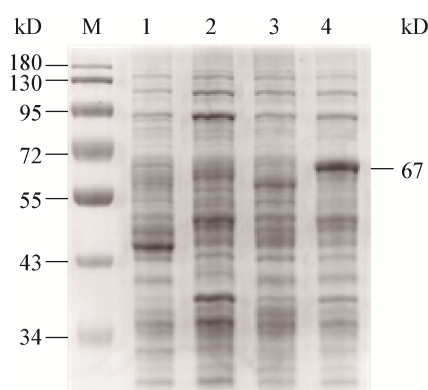


图 2 胞内粗酶液 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2 SDS-PAGE of the intracellular maltogenic amylase

注: M: 蛋白 Marker; 1: *B. subtilis* 胞内产物; 2: *B. subtilis*/pHYBM 胞内产物; 3: *B. subtilis*/pHYBMYF 未经诱导的胞内产物; 4: *B. subtilis*/pHYBMYF 诱导后的胞内产物。

Note: M: Molecular marker; 1: *B. subtilis*; 2: *B. subtilis*/pHYBM; 3: *B. subtilis*/pHYBMYF without induction; 4: *B. subtilis*/pHYBMYF with induction.

表 1 诱导温度对产酶的影响
Table 1 Effects of inducing temperature on the production of the recombinant enzyme

诱导温度 Inducing temperature (°C)	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体量 OD ₆₀₀	总蛋白量 Total protein (g/L)
20	17.11±0.27	3.43±0.33	0.81±0.02
25	38.65±1.03	6.07±1.07	0.98±0.03
30	113.81±3.77	8.50±0.67	1.20±0.04
37	211.04±3.62	10.40±1.79	0.89±0.08
45	264.67±4.38	12.36±1.32	1.00±0.01
50	24.28±0.14	3.42±0.11	0.73±0.02

表 2 诱导剂添加量对产酶的影响
Table 2 Effects of inducer addition on the production of the recombinant enzyme

诱导剂终浓度 Inducer concentration (%)	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体量 OD ₆₀₀	总蛋白量 Total protein (g/L)
0.0	0.00±0.00	6.62±1.03	0.72±0.05
0.4	23.95±0.77	6.22±0.94	1.03±0.05
0.6	83.65±0.42	8.32±1.45	1.02±0.05
0.8	156.29±2.40	10.02±0.77	1.02±0.05
1.0	247.78±1.46	12.44±0.34	1.02±0.01
1.2	87.27±0.13	6.66±1.26	1.09±0.02
1.4	55.40±0.10	6.19±0.38	0.96±0.02

表 3 诱导剂添加时间对产酶的影响
Table 3 Effects of inducer addition time on the production of the recombinant enzyme

诱导剂添加时间 Inducer addition time (h)	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体量 OD ₆₀₀	总蛋白量 Total protein (g/L)
0	0.00±0.00	12.76±1.21	0.59±0.01
3	14.08±0.59	13.42±0.98	1.10±0.03
6	204.21±1.34	13.61±0.79	1.11±0.02
9	287.00±2.85	14.43±1.33	1.12±0.05
12	276.61±0.16	15.47±1.20	1.10±0.02
15	278.43±0.78	14.32±2.90	1.09±0.07
18	269.80±0.16	13.41±1.39	1.07±0.03
21	240.29±1.18	12.53±2.34	1.07±0.04
24	201.13±1.40	11.87±1.65	0.99±0.01

2.5.3 最适添加诱导剂的时间: 在重组菌接种后的不同时间加入终浓度为 1%的诱导剂于 37 °C、200 r/min 条件下发酵, 产酶结果见表 3。从表 3 可知, 在接种后培养的前 3 h 添加诱导剂产酶效率很低, 3 h 后开始诱导发酵所得重组酶酶活逐渐升高, 在接种后 9 h 添加诱导剂发酵所得酶的酶活最高。9 h 后随着前培养时间增加, 产酶效率略有下降。所以得出最合适的添加诱导剂时间为接种培养后 9 h。

芽孢杆菌中的木糖操纵子 *xyI* 由编码木糖异构酶 XylA 以及木酮糖激酶 XylB 的两个基因构成。该 *xyI* 操纵子编码基因上游有一段 1 152 bp 的结构基因编码了该操纵子的调节蛋白 XylR。在未添加诱导物时, 调节蛋白 XylR 与操纵子上的启动子 *xyI*

operator 结合, 抑制木糖代谢基因的表达, 实现负控诱导调控。若缺失 *xyIR* 基因或 *xyI* 启动子就能使木糖代谢基因实现组成型表达^[11]。

2.6 重组麦芽糖淀粉酶的纯化

重组菌所产麦芽糖淀粉酶经亲和层析纯化后的酶在 SDS-PAGE 中显示出单一条带, 分子量约为 67 kD (图 3), 与之前推测的 *yvdF* 基因表达蛋白大小相符。

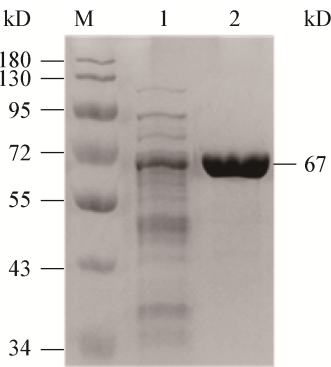


图 3 纯化后的重组麦芽糖淀粉酶 SDS-PAGE 鉴定图谱
Figure 3 SDS-PAGE of purified recombinant maltogenic amylase

注: M: 蛋白 Marker; 1: 重组麦芽糖淀粉酶粗酶液; 2: 重组麦芽糖淀粉酶纯化后酶液。
Note: M: Molecular marker; 1: Crude recombinant maltogenic amylase; 2: Purified recombinant maltogenic amylase.

2.7 重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHYBMYF 所产麦芽糖淀粉酶的基本性质

2.7.1 重组麦芽糖淀粉酶水解性质: 以 1% 可溶性淀粉为底物, 与 100 μL 重组菌诱导发酵胞内粗酶液, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.5 条件下反应 1 h, 采用高效液相色谱法分析反应产物, 标样图谱见图 4A, 反应产物液相图谱见图 4B。结果显示, 该重组麦芽糖淀粉酶水解可溶性淀粉产生 60.42% 的麦芽糖及 39.58% 的葡萄糖。可见该重组麦芽糖淀粉酶分解淀粉主要产物为麦芽糖, 还有少量葡萄糖为副产物。

2.7.2 温度对酶活力及酶热稳定性的影响: 在 pH 6.5 的条件下, 测定 20–70 $^{\circ}\text{C}$ 范围内的麦芽糖淀粉酶的酶活力, 得到温度-酶活力关系, 如图 5A 所示, 该重组酶的最适反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 反应温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 酶活力大大降低。将酶液置于不同温度下保温 1 h, 检测剩余酶活力, 以原酶液活力为对照, 结果见图 5B。该酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下稳定性良好, 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后残余酶活力仍能达到 96.0%, 但

45 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后酶活损失近 27.2%, 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后酶活损失近 70.0%, 表明该酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 以上稳定性下降较多。据报道, 同为地衣芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶在大肠杆菌中的最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ ^[12], 而本文获得的重组酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时稳定性下降较多, 这表明该酶基因经克隆表达后性质略有改变。芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) US149^[13] 及黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[14] 来源的麦芽糖淀粉酶最适温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 后酶热稳定性大幅下降。另有嗜热芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoleovorans*) 来源的麦芽糖淀粉酶, 在细菌麦芽糖淀粉酶中其温度稳定性最好, 80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 35 h 后仍有 50% 的酶活力^[15]。细菌淀粉酶常是单亚基蛋白, 而如黑曲霉这类真菌来源的淀粉酶往往能形成多聚体^[16], 嗜热芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶因形成这种多聚体使得酶热稳定性提高。本文获得的重组麦芽糖淀粉酶也可以通过定向突变来提高其酶热稳定性。

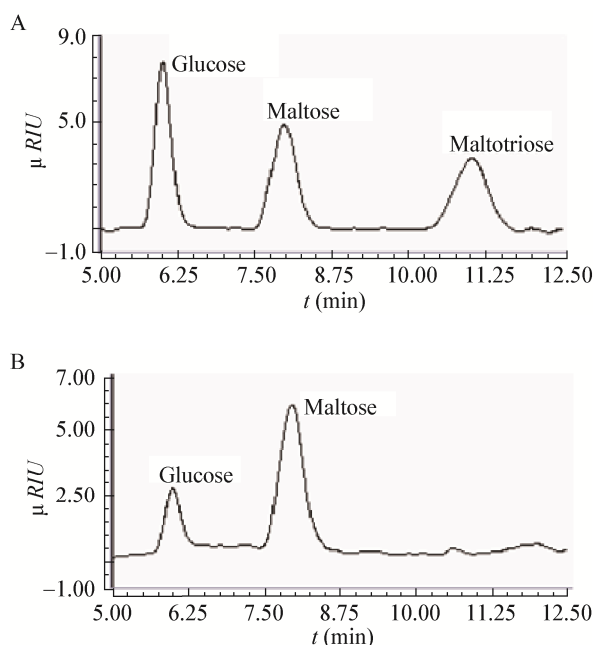


图 4 重组酶分解淀粉产物分析

Figure 4 Product analysis of recombinant enzyme reaction with starch

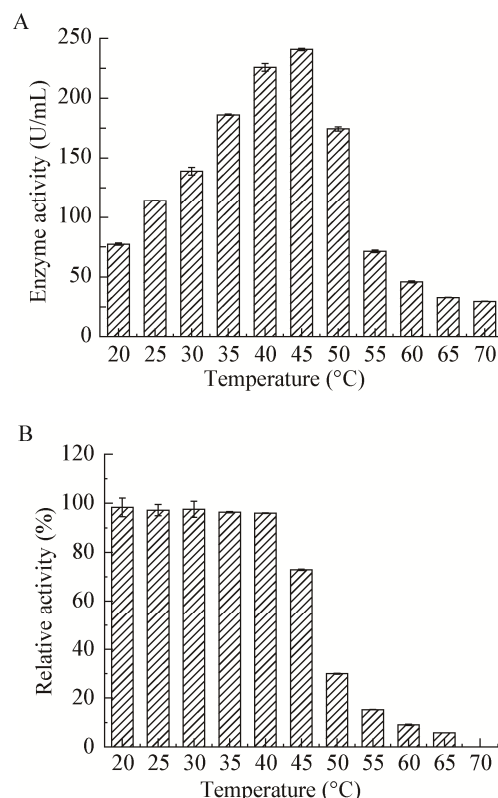


图 5 温度对重组酶活力和稳定性的影响

Figure 5 Effects of temperature on the activity and stability of the recombinant enzyme

2.7.3 pH 对酶活力及酶稳定性的影响: 在温度 40 °C 下, 测定在 pH 4.5–8.5 范围内的重组酶活力, 得到 pH-酶活力关系。如图 6A 所示, 发现该酶的最适反应 pH 为 6.5 左右, pH 低于 5.0 酶活力基本丧失, pH 高于 7.0 酶活力开始下降。20 °C 下, 将不同 pH 的酶液保温 1 h 后测定其残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为对照, 结果如图 6B 所示。由图 6B 可见, pH 6.0–7.0 之间该酶稳定性相对较好, pH 低于 5.0 酶活力完全丧失, pH 高于 7.5 酶稳定性明显降低。已报道的不同来源多数麦芽糖淀粉酶均在 pH 6.0–7.0 之间稳定性较好, 超出此范围稳定性下降明显^[17-19]。

2.7.4 化学试剂对酶活力和酶热稳定性的影响: 以原酶液为对照, 得到化学试剂对酶活力的影响如表 4 所示。由表 4 可知, 在试验浓度下, Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、EDTA 对该重组麦芽糖淀粉酶具有激活作用, 其中 EDTA 对酶激活作用较为明显; Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、SDS、Tween-80 对该酶有较强抑制作用, 其中 10 mmol/L 的 Cu^{2+} 、SDS 几乎使该酶完全失活。研究几种对酶有激活作用的 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、EDTA 对酶热稳定性的影响, 结果表明这 3 种试剂虽对酶有

激活作用, 但并没有保护作用, 其中 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 反而使酶活力下降。对于许多 α -淀粉酶, Ca^{2+} 能在一定程度上提高酶的热稳定性, 对酶有保护作用, 如一种巨大芽孢杆菌来源的中温 α -淀粉酶, Ca^{2+} 对其有激活作用, 浓度为 10 mmol/L 时能显著提高酶热稳定性, 而 EDTA 能抑制其活性^[20]。 Li^{+} 和 K^{+} 能提高一种杆菌属(*Geobacillus* sp.) 来源的麦芽糖淀粉酶的酶活力^[19], 而对于另一种栖热菌属(*Thermus* sp.) 来源的麦芽糖淀粉酶, 10 mmol/L 的 EDTA 能提高其稳定性^[21], 在性质上与地衣芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶有相似性。

2.7.5 重组酶的底物特异性: 以 1 mL 2% 可溶性淀粉、马铃薯淀粉、麦芽糊精、 β -环状糊精、糖原和 1% 支链淀粉为底物, 在 40 °C、pH 6.5 的条件下与 100 μL 麦芽糖淀粉酶反应 1 h, 分别测定其酶活力, 以 2% 可溶性淀粉为底物测得的酶活力为 100%, 结果见表 5。如表 5 所示, 该重组麦芽糖淀粉酶可以水解可溶性淀粉、马铃薯淀粉、麦芽糊精和 β -环状糊精, 但不能利用糖原、支链淀粉, 说明该酶几乎不能作用于含有支链的多糖。从相对酶活来看, 该重组麦芽糖淀粉酶的最适作用底物为 β -环状糊精。

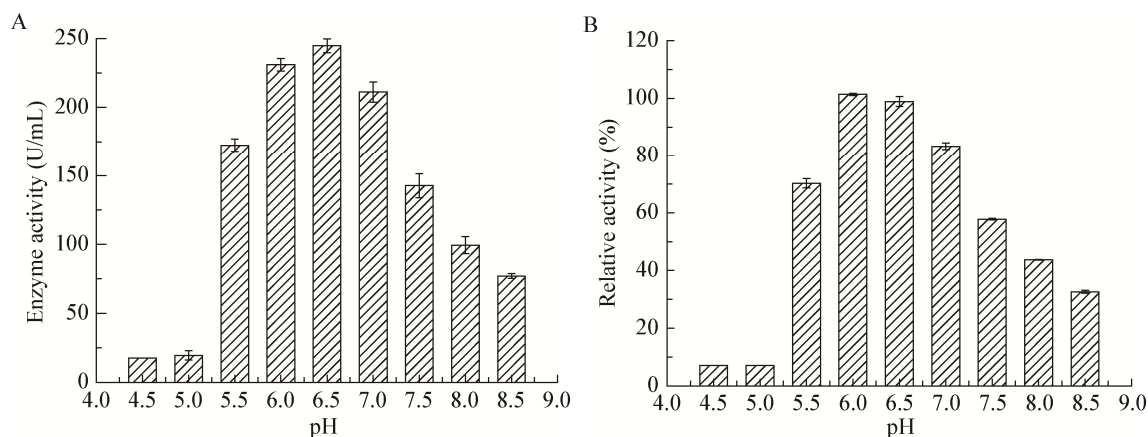


图 6 pH 对重组酶活力和稳定性的影响

Figure 6 Effects of pH on the activity and stability of the recombinant enzyme

表 4 化学试剂对重组酶活力的影响
Table 4 Effects of chemical reagents on the activity of the recombinant enzyme

化学试剂 Chemical reagents	浓度 Concentration (mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)
Li ⁺	5	105.35±1.56
	10	101.27±1.23
K ⁺	5	107.20±1.00
	10	104.32±1.68
Mg ²⁺	5	100.51±1.09
	10	102.33±0.60
Zn ²⁺	5	53.14±1.14
	10	48.96±0.63
Ca ²⁺	5	105.71±0.93
	10	110.50±1.62
Mn ²⁺	5	89.87±0.79
	10	87.55±0.92
Cu ²⁺	5	0.00
	10	0.00
Co ²⁺	5	99.20±0.40
	10	111.03±0.63
Fe ³⁺	5	98.67±1.79
	10	62.27±2.88
EDTA	5	119.30±1.26
	10	136.20±1.90
SDS	5	8.88±0.32
	10	16.11±1.00
Triton-X 114	5	87.19±0.99
	10	103.13±2.25
Tween-80	5	51.84±0.45
	10	49.45±1.40

表 5 重组酶底物特异性关系
Table 5 The substrate specificity of the recombinant enzyme

底物 Substrate	相对酶活 Relative activity (%)
可溶性淀粉 Soluble starch	100
马铃薯淀粉 Potato starch	145.48±2.39
麦芽糊精 Maltodextrin	20.05±0.48
β-环状糊精 β-Cyclodextrin	289.32±4.43
糖原 Glycogen	0
支链淀粉 Amylopectin	0

3 结论

本研究构建了一种能高效表达外源基因的大肠杆菌/芽孢杆菌穿梭型诱导表达载体 pHYBM, 实现了一种细菌麦芽糖淀粉酶在枯草芽孢杆菌细胞内的诱导表达, 胞内酶活最高达到 296.64 U/mL。前期报道中, 相同来源的麦芽糖淀粉酶基因实现了在大肠杆菌中的表达, 其胞内酶活为 227.82 U/mL^[22], 本研究发酵所得重组酶酶活提高了约 30.2%, 在工业上具有一定的应用前景。后续研究中可以继续改良这一诱导型表达载体, 使其能将目的蛋白分泌到细胞外, 并对发酵条件进行优化, 以期能进一步提高其表达量。

参 考 文 献

- [1] Lee HS, Auh JH, Yoon HG, et al. Cooperative action of α-glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltotriose production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(10): 2812-2817
- [2] Igarashi K, Ara K, Saeki K, et al. Nucleotide sequence of the gene that encodes a neopullulanase from an alkalophilic *Bacillus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(3): 514-516
- [3] Oguma T, Matsuyama A, Kikuchi M, et al. Cloning and sequence analysis of the cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus sphaericus* and expression in *Escherichia coli* cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(2): 197-203
- [4] Rygus T, Scheler A, Allmansberger R, et al. Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization[J]. Archives of Microbiology, 1991, 155(6): 535-542
- [5] Wilson GA, Young FE. Isolation of a sequence-specific endonuclease (*Bam* I) from *Bacillus amyloliquefaciens* H[J]. Journal of Molecular Biology, 1975, 97(1): 123-125
- [6] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557-580
- [7] Bott KF, Wilson GA. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system[J]. Journal of Bacteriology, 1967, 94(3): 562-570
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [9] Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368-379
- [10] Zukowski MM, Miller L. Hyperproduction of an intracellular heterologous protein in a *sacU*^h mutant of *Bacillus subtilis*[J]. Gene, 1986, 46(2/3): 247-255
- [11] Sizemore C, Wieland B, Götz F, et al. Regulation of *Staphylococcus xylosus* xylose utilization genes at the molecular level[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(9): 3042-3048
- [12] Kim IC, Cha JH, Kim JR, et al. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(31): 22108-22114
- [13] Mabrouk SB, Ayadi DZ, Hlima HB, et al. Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone

- PCR[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 601-606
- [14] Ravi-Kumar K, Venkatesh KS, Umesh-Kumar S. The 53-kD proteolytic product of precursor starch-hydrolyzing enzyme of *Aspergillus niger* has Taka-amylase-like activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(5): 1011-1015
- [15] Mehta DP, Shetters C, Bouldin DW. Meta-algorithms for scheduling a chain of coarse-grained tasks on an array of reconfigurable FPGAs[J]. VLSI Design, 2013: Article ID 249592
- [16] Vihinen M, Mantsila P. Microbial amylolytic enzyme[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1989, 24(4): 329-418
- [17] Xue B, Wang ZB, Liu ZD, et al. Study on gene cloning, expression and enzymatic characterization of a high maltose-producing alpha-amylase from *Thermobifida fusca*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 214-218 (in Chinese)
- 薛蓓, 王治宾, 刘振东, 等. 褐色喜热裂孢菌 *Thermobifida fusca* 产麦芽糖 α -淀粉酶基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 214-218
- [18] Wang XB, Li MR, Li X, et al. Gene cloning, expression and enzymatic characterization of a high maltose-producing α -amylase from *Saccharomonospora viridis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(2): 342-345 (in Chinese)
- 汪小波, 李美蓉, 李雪, 等. 绿色糖单孢菌高产麦芽糖 α -淀粉酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(2): 342-345
- [19] Nasrollahi S, Gholizadeh L, Sajedi RH, et al. Substrate preference of a *Geobacillus* maltogenic amylase: a kinetic and thermodynamic analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 1-9
- [20] Liu Y, Shen W, Shi GY, et al. Enzymatic properties of mesophilic α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* M23[J]. Food Science, 2008, 29(9): 373-377 (in Chinese)
- 刘洋, 沈微, 石贵阳, 等. 中温 α -淀粉酶的酶学性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 373-377
- [21] Kim TJ, Kim MJ, Kim BC, et al. Modes of Action of Acarbose Hydrolysis and transglycosylation catalyzed by a thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1644-1651
- [22] Zi N, Shen W, Shi GY, et al. Gene cloning and characterization of *Bacillus licheniformis* maltogenic α -amylase[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009, 15(1): 130-133 (in Chinese)
- 訾楠, 沈微, 石贵阳, 等. 地衣芽孢杆菌生麦芽糖 α -淀粉酶的基因克隆与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(1): 130-133

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012、2013、2014、2015年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续4年获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2017年每册定价80元,全年960元,我们免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413